УТВЕРЖДАЮ:
Заместитель директора по науке
У Российского онкологического
научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН
чл. корр. РАН, д.м.н., профессор
М.Р. Личиницер _____

Российская Академия Медицинских Наук
У Российский Онкологический Научный Центр
им. Н.Н. Блохина

Отчет

Клиническое изучение Ингарона (гамма - интерферона)

в сочетании с химиотерапией:

Ломустин + Дакарбазин + Цисплатин

при диссеминированной меланоме кожи

оглавление

1.	База исследования	
2.	Исполнители	
3.	Основания для проведения исследования	
4.	Фармакологические свойства рекомбинантного интерферона гамма человека – Ингарона	
5.	Цель исследования	
6.	Задачи исследования	
7.	Отбор больных с диссеминированной меланомой кожи	
7.1.	Критерии включения в исследование	
7.2.	Критерии исключения из исследования	
7.3	Прекращение исследования	
8.0.	Режим лечения больных с диссеминированной меланомой кожи (Ингарон + Дакарбазин + Ломустин + Цисплатин)	
9.0	Материалы и методы I	
10.0	Группа сравнения: химиотерапия Нидраном, Дакарбазином и Цисплатином у больных с метастазами меланомы кожи	
10.1	Режим лечения	
11.	Методы оценки безопасности препарата	
12.	Критерии оценки результатов лечения	
13.	Статистическая обработка цифровых данных и анализ выживаемости больных	
13.1.	Многофакторный анализ	
14.	Клинико – фармакологическое изучение Ингарона при диссеминированной меланоме кожи	
15.	Побочные эффекты комбинации химиотерапии и Ингарона при лечении диссеминированной меланоме кожи	

16.	Влияние химиотерапии с включением Ингарона на показатели иммунного статуса больных диссеминированной меланомой кожи	
16.1	Материалы и методы II	
16.1.1.	Выделение клеток из цельной крови на градиенте плотности фиколл - верографина	
16.1.2.	Непрямая реакция поверхностной иммунофлуоресценции	
16.1.3.	Проточно - цитофлуориметрический анализ	
16.1.4.	Изучение цитотоксической активности естественных киллеров (NK- клеток)	
16.1.5.	Определение концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови	
16.2	Статистическая обработка результатов	
16.3	Результаты	
17.	Заключение	
18.	Выводы	
19.	Библиография	

1. База исследования

Исследование проводилось в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина Российской Академии медицинских наук.

Исследование проводилось с 01.2006г по 09.2008 г.

2. Ответственные исполнители

- Заведующий отделением комбинированных методов лечения и химиотерапии злокачественных опухолей У РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, чл.-корр. РАН, профессор, **М.Р. Личиницер**.
- Ведущий научный сотрудник отделения комбинированных методов лечения и химиотерапии злокачественных опухолей У РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, кандидат медицинских наук, **С.Л. Гуторов.**

- Старший научный сотрудник отделения комбинированных методов лечения и химиотерапии злокачественных опухолей У РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, кандидат медицинских наук, **М.Е. Абрамов.**

- Заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом У РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, академик РАЕН, профессор **З.Г. Кадагидзе**

- Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии опухолей У РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, **Е.Г. Славина**.

3. Основания для проведения исследования

Основанием для проведения исследования препарата Ингарон, производства ООО «Фармаклон», Россия, является приказ Росздравнадзора №63-Пр-рег/05 от 18 ноября 2005г. Ингарон (интерферон гамма) выпускается в виде лиофилизата для внутримышечного и подкожного введения, во флаконах, в дозе: 100 000 МЕ, 500 000 МЕ, 1 000 000 МЕ, 2 000 000 МЕ.

4. Фармакологические свойства рекомбинантного интерферона гамма человека – Ингарона

Роль γ-ИФН в лечении диссеминированной меланомы кожи до последнего времени остается мало изученной, несмотря на явную привлекательность цитокина для клинической практики.

В эксперименте были показаны выраженные антипролиферативные и иммуномодулирующие эффекты γ-ИФН. При этом было отмечено, что антипролиферативный эффект γ-ИФН более выражен, чем таковой у α-ИФН или ß-ИФН [12].

В ранних клинических исследованиях у 11 больных различными злокачественными опухолями, резистентными к ранее проводимому лечению, вводили γ-ИФН в дозах от 0.05 мг/м^2 до 10 мг/м^2 (1 мг = 10х10^6 ЕД ИФН) - 2 раза в неделю (у 6 больных внутримышечно и у 5 больных - внутривенно, 5 мин.введение). Побочные эффекты были представлены повышением температуры тела, ознобом, слабостью, анорексией и гранулоцитопенией.

Гриппоподобный синдром был аналогичен таковому при введении α-ИФН, но был существенно менее выраженным. Гранулоцитопения была кратковременной и наблюдалась в период 48-72 час. после введения γ-ИФН. При внутривенном введении пик уровня γ-ИФН в плазме был в конце инфузии, период полужизни составил 30 мин. При внутримышечном введении пик концентрации достигался через 4-8 часов, период полужизни составил 4,5 час. Пик уровня γ-ИФН коррелировал с максимумом проявления побочных эффектов. У одного больного была отмечена частичная регрессия метастазов меланомы в кожу [6].

В дальнейшем было показано, что при метастазах меланомы кожи частота эффекта γ-ИФН при самостоятельном применении в различных дозах достигает 12% [3,5,9,15].

Оптимальная доза γ-ИФН до сих пор не определена, а рекомендуемое назначение γ-ИФН в дозе 100 μg/m^2 основано на экспериментальных данных. При этой дозе у больных наблюдалась максимальная иммунологическая активность γ-ИФН: активация лимфоцитов и моноцитов [8], антитело-зависимая цитотоксичность моноцитов, экспрессия рецепторов Fc [17] и индукция в плазме ß-2-микроглобулина и уровня неоптерина [3], и такие эффекты сочетались с достижением лечебного результата.

В экспериментах на животных было показано, что ежедневное введение γ-ИФН было менее эффективным, чем введение 3 раза в неделю [16]. Лабораторные и клинические данные показали, что ежедневные инъекции препарата в конечном счете повышают иммунные параметры исходно повышенные после введения γ-ИФН [16,10,13].

Эти результаты были подтверждены в другой работе, где введение γ-ИФН в дозах 10-500 μg 3 раза в неделю вначале повышало исходно сниженный в плазме уровень неоптерина и μ-2-микроглобулина, однако при продолжении лечения наблюдалась их супрессия. При введении γ-ИФН один раз в неделю индуцировалась продленная иммунная активация без ее снижения при повторных аппликациях препарата [2]. В исследовании на больных было показано, что IFN-γ повышает HLA экспрессию. Это было отмечено на 7 день

после первого введения и при продолжении лечения изменения HLA носили персистирующий характер. Был достигнут значимый иммуномодулирующий эффект, однако корреляций между клиническим эффектом и суррогатными маркерами авторами не установлено.

При диссеминированной меланоме кожи 17 больных получали γ-ИФН внутривенно в ежедневной дозе 1,0-2,6x10^6 Е. Побочные эффекты были не выражены и заключались в повышении температуры тела I-II ст. (WHO). Были достигнуты 2 полных и 2 частичных эффекта, общий эффект составил 23,5%, при средней продолжительности 8,9 мес. (от 1,5 до 21) [7]. Попытка установить оптимальную терапевтическую дозу γ-ИФН при внутривенном введении была неудачной. При метастазах меланомы 98 больных, ранее получавших не более 1 линии химиотерапии были рандомизированы на 7 дозовых уровней γ-ИФН от 0,01 до 0,90 мг/$м^2$. Препарат вводили внутривенно, 1 час. инфузия 3 раза в неделю в течении 8 недель или до прогрессирования болезни. Эффект был оценен у 81 больного и составил 5%: у 2 больных при дозе 0,01 мг/$м^2$, у 1 при 0,5 мг/$м^2$ и у 1 при 0,9 мг/$м^2$. Длительность эффекта варьировала от 5 до 58 нед. Взаимосвязь дозы γ-ИФН с эффектом и связь изменений иммунологического статуса с эффектом лечения в исследовании не установлена [15].

При подкожном введении γ-ИФН самостоятельное применение γ-ИФН в дозе 100 μg/m^2 1 раз в неделю у 23 больных при метастазах меланомы индуцировало 3 полных ремиссии, продолжительностью 53, 36 и 25 мес. Побочные эффекты режима не превышали II ст. токсичности и проявлялись в виде гриппоподобного синдрома длительностью до 24 час. после введения. Парацетамол в значительной степени предотвращал или уменьшал этот эффект [11].

При непрямом сравнении, было показано, что низкие еженедельные дозы γ-ИФН оказались не менее эффективны чем его высокие дозы [11].

Ежедневный режим введения γ-ИФН был не более эффективен, чем его введения 3 раза в неделю. Введение γ-ИФН ежедневно в дозе 0,25 мг/$м^2$ с последующим, при хорошей переносимости, повышением дозы до 0,5 мг/$м^2$ с 1 по 7 день недели у 27 больных диссеминированной меланомой кожи

индуцировало 3 частичных эффекта, длительностью 8, 4, и 4^{+} мес. Побочные эффекты – умеренное или выраженное повышение температуры у всех больных, слабость – 59%, озноб – 37% и умеренная или выраженная миальгия у 64% больных [3].

Большой интерес вызвала комбинация γ-ИФН с химиотерапией при метастазах меланомы кожи. В частности, эффект комбинации γ-ИФН и Дакарбазина был продемонстрирован при лечении метастазов меланомы в головной мозг [14]. Необходимо учесть, совместное применение γ-ИФН и цитостатиков не приводит к существенному усилению токсичности лечения [18].

В настоящее время возрастает интерес к клиническому изучению γ-ИФН, учитывая его механизмы действия и особое положение в системе интерфероновой физиологической системы. Особенно привлекает изучение комбинации γ-ИФН и химиотерапии.

Задачей исследования была оценка побочных эффектов и клинической эффективности лечения Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином в комбинации с Ингароном. Ранее проведенное в нашей клинике исследование, свидетельствовало о безопасности этой комбинации [1].

Ингарон – рекомбинантный интерферон гамма человека, состоит из 144 аминокислотных остатков, лишен первых 3 аминокислотных остатков Cys-Tyr-Cys, замененных на Met. Молекулярная масса 16,9 кДа. Получен микробиологическим синтезом в рекомбинантном штамме Escherichia coli и очищен колоночной хроматографией.

Интерферон - γ является важнейшим цитокином, продуцентами которого в организме человека являются естественные киллерные клетки CD4 Th1 клетки и CD8 цитотоксические супрессорные клетки. Рецепторы к интерферону гамма имеют макрофаги, нейтрофилы, натуральные киллерные клетки, цитотоксические Т-лимфоциты. Этот препарат активирует эффекторные функции этих клеток, в частности их микробиоцидность, цитотоксичность, продукцию ими цитокинов, супероксидных и нитрооксидных радикалов.

Интерферон - γ, как и интерфероны α и β, обладает противоопухолевым и противовирусным действием. Интерферон γ в большей степени стимулирует процесс распознавания опухолевых антигенов (усиливая экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости как I-го, так и II-го классов). Являясь гуморальным продуктом цитотоксических Т- и NK-клеток, он, по-видимому, участвует в реализации цитотоксического эффекта.

Особый интерес представляют сведения о том, что применение Интерферона - γ, при метастатической меланоме повышает экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости на опухолевых клетках, индуцирует повышение маркеров моноцитоидной активации и усиливает эффективность цитостатической химиотерапии.

Результаты клинических исследований при диссеминированной меланоме кожи, полученные в последнее время, показали новые возможности современной химиотерапии при этом заболевании.

Существует перспектива улучшения режимов лечения при использовании современной химиотерапии и иммунотерапии, в частности гамма – интерферона.

5. Цель исследования

Улучшение результатов лечения больных диссеминированной меланомой кожи при комбинации химиотерапии и Ингарона, характеристика иммуно-модулирующего действия Ингарона у онкологических больных.

6. Задачи исследования

6.1 Изучить эффективность комбинации Ингарон + химиотерапия (Ломустин + Дакарбазин + Цисплатин) при диссеминированной меланоме кожи.

6.2 Дать характеристику побочных эффектов комбинации Ингарон + химиотерапия (Ломустин + Дакарбазин + Цисплатин).

6.3 Дать характеристику показателей иммунитета и уровня цитокинов при использовании комбинации Ингарон + химиотерапия (Ломустин + Дакарбазин + Цисплатин) при диссеминированной меланоме кожи.

6.4 Сравнить эффективность и токсичность комбинированной химиотерапии с и без Ингарона при диссеминированной меланоме кожи.

7. Отбор больных с диссеминированной меланомой кожи.

В данное исследование включено 84 больных диссеминированной меланомой кожи. Из них 41 больной получал химиотерапию с включением Ингарона и 43 больных получали аналогичный режим химиотерапии без Ингарона.

7.1 Критерии включения в исследование

- Больные диссеминированной меланомой кожи.
- Морфологическое (гистологическое или цитологическое) подтверждение диагноза.
- Возраст не более 70 лет.
- Общее состояние 0-2 (ВОЗ).
- Предполагаемая продолжительность жизни не менее 3 мес.
- Число гранулоцитов более 1 500/мм^2, тромбоцитов более 150 000/мм^2.
- Уровень креатинина не должен превышать 1,5 норм, печеночные ферменты (АЛТ, АСТ и ЩФ) не должны превышать 3 норм.
- Согласие на лечение по данному протоколу.
- По поводу распространенной болезни пациенты ранее не должны получать никакого лечения.
- Допускалось в анамнезе нео – и адъювантное лечение (химиотерапия Дакарбазином или иммунотерапия).

7.2 Критерии исключения из исследования

- Тяжелые проявления сердечно-сосудистых заболеваний в прошлом и в настоящее время (инфаркт миокарда, гипертония, инсульт, флеботромбоз, коронарная недостаточность, требующая лекарственного контроля и др.).
- Аллергические реакции,
- Язвенная болезнь желудка, 12-перстной кишки (в фазе обострения), не корригируемый сахарный диабет.
- Психические и неврологические заболевания, препятствующие пониманию плана лечения.

- Беременность.
- Метастазы злокачественной опухоли в головной мозг (по клиническим данным).
- Предшествующее лечение по поводу распространенной болезни.
- Постоянный прием кортикостероидов или иммуносупресантов.

7.3 Прекращение исследования.

Больной будет исключен из исследования при следующих условиях:

- в случае установленного прогрессирования заболевания
- если, по мнению исследователя в интересах больного необходимо изменить терапию
- если больной требует прекратить участие в исследовании
- при проявлении непереносимой токсичности
- если интервал между курсами составляет более чем 9 недель
- при редукции доз препаратов вследствие гематологической или другой токсичности более 50 %
- оценка эффективности будет проводиться по критериям RECIST.

8.0. Режим лечения больных с диссеминированной меланомой кожи (Ингарон + Дакарбазин + Ломустин + Цисплатин).

Первая неделя: Ингарон 500×10^3 МЕ внутримышечно, ежедневно течение 5 дней.

Вторая неделя:

Ломустин 80 мг/м^2 внутрь день 1, через 3 часа после Дакарбазина.

Дакарбазин 250 мг/м^2 внутривенно струйно (в 40 мл физиологического раствора хлорида натрия, сразу после разведения) в дни 1, 2, 3.

Цисплатин 80 мг/м^2, внутривенно в 400 мл физиологического раствора хлорида натрия 1 часовая инфузия (с предварительной гидратацией в течение 3 часов: 2,4 л физиологического раствора хлорида натрия и последующим, после

Цисплатина, введением 400 мл этого раствора). Начало инфузии Цисплатина через 1 час после введения Дакарбазина.

В первый и второй дни за 30 минут до введения Дакарбазина вводили Дексаметазон 8 мг внутривенно струйно, затем Зофран 8 мг. В день 3 за 30 мин до Дакарбазина – Зофран 24мг внутривенно, капельно и Дексаметазон 8 мг внутривенно струйно.

Третья, четвертая и пятая недели: Ингарон 500×10^3 МЕ внутримышечно, три раза в неделю.

Следующий курс начинали на 6 неделе с ежедневного введения Ингарона.

При тромбоцитопении менее 80×10^3 клеток введения Ингарона прекращали до повышения числа тромбоцитов не менее 100×10^3.

Лечение проводили до прогрессирования или развития лимитирующих побочных эффектов.

9.0. Материалы и методы I

В исследование был включен 41 больной, (21 женщина и 20 мужчин) диссеминированной меланомой кожи, имеющих гистологическое подтверждение диагноза, наличие измеряемых проявлений болезни. Средний возраст составил 52,8 лет (от 18 до 68). Все пациенты к моменту начала лечения имели удовлетворительное общее состояние (0 – 1 по классификации ВОЗ), нормальные гематологические и биохимические показатели крови, функцию печени и почек. Характеристика больных представлена в таблице 2.

Всего проведено 152 курса лечения, 1 курс получили 3 больных, 2 курса получили - 14, 3 курса – 7, 4-6 курсов – 12 больных, 7-10 курсов – 5 больных. Лечение завершили 35 больных, 6 продолжают терапию.

Оценку лечебного эффекта проводили после каждого 2 курса.

Описанию подлежали все проявления болезни с использованием двойного измерения, УЗИ-томографии, рентгенографии, компьютерной томографии, фотографии и т.д. Измерение и описание проводили пред каждым курсом.

Иммунологические тесты проводили до начала лечения и после каждого 2 курса лечения, а также через 4 недели после завершения лечения.

В качестве группы сравнения использованы результаты лечения 43 больных диссеминированной меланомой кожи, получивших в нашей клинике 173 курса химиотерапии Нидраном, Дакарбазином и Цисплатином в трехдневном режиме.

10. ГРУППА СРАВНЕНИЯ: ХИМИОТЕРАПИЯ НИДРАНОМ, ДАКАРБАЗИНОМ И ЦИСПЛАТИНОМ У БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАЗАМИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

К одному из наиболее эффективных вариантов химиотерапии диссеминированной меланомы кожи по праву относится комбинация включающая Нидран (или другие производные нитрозомочевины), Дакарбазин и Цисплатин. Режим был разработан и апробирован в отделении химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей ГУ РОНЦ РАМН и успешно применяется в рутинной лечебной практике ряда лечебных учреждений России. В связи с отсутствием в настоящее время на фармацевтическом рынке России Нидрана, исследование с Ингароном было проведено с комбинацией, где Нидран был заменен на препарат из той же группы (нитрозопроизводных) и со сходной эффективностью и токсичностью – Ломустин.

При диссеминированной меланоме кожи в I линии химиотерапию получили 43 больных, 23 мужчины и 20 женщин, средним возрастом 50,9 лет (от 22 до 75).

10.1 Режим лечения.

Дакарбазин 250 мг/м^2 внутривенно струйно (в 40 мл. физиологического раствора хлорида натрия, сразу после растворения) дни 1, 2, 3

Нидран 1мг/кг внутривенно струйно (в 20 мл. физиологического раствора хлорида натрия, сразу после растворения), через 3 часа после Дакарбазина, день 1.

Цисплатин 80 мг/м^2, внутривенно в 400 мл. физиологического раствора хлорида натрия, 1 часовая инфузия (с предварительной гидратацией 2,4 л.

физиологического раствора хлорида натрия) через 1 час после Дакарбазина, день 3.

В первый и второй дни за 30 минут до Дакарбазина вводили Дексаметазон 8 мг внутривенно и Зофран 8 мг (или Навобан 5 мг, Китрил 3 мг). В день 3 за 30 мин до Дакарбазина – Зофран 24 мг и Дексаметазон 8 мг внутривенно.

Планируемый интервал между курсами составлял 4-6 недель.

Лечение прекращали при развитии жизнеопасной токсичности или при прогрессировании болезни.

Оценка лечебного эффекта, побочных эффектов, причины прекращения лечения, алгоритм обследования больных были одинаковыми как в группе с Ингароном.

11. Методы оценки безопасности препарата

Токсичность режимов лечения оценивалась по шкале токсичности Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC), version 3.

12. Критерии оценки результатов лечения

Оценка эффективности лечения проводилась по критериям **RECIST** на каждом из этапов: в период лечения, непосредственно после его завершения.

Измеряемые проявления болезни:

- Полная регрессия — полная регрессия первичной опухоли.
- Частичная регрессия — уменьшение первичной опухоли в наибольшем диаметре на 30% и более.
- Прогрессирование — увеличение первичной опухоли в наибольшем диаметре на 20% и более или появление новых проявлений заболевания.
- Стабилизация — изменения не соответствующие ни частичной регрессии, ни прогрессированию заболевания.

Неизмеряемые проявления болезни:

•Полная регрессия — полная регрессия.

•Стабилизация болезни

•Прогрессирование — увеличение существующего или появление новых очагов.

Таблица №1

Оценка лечебного эффекта

Измеряемая опухоль	Неизмеряемая опухоль	Новые очаги	Общий эффект
Полная регрессия	Полная регрессия	Нет	Полная регрессия
Полная регрессия	Неполная регрессия	Нет	Частичная регрессия
Частичная регрессия	Неполная регрессия	Нет	Частичная регрессия
Стабилизация	Неполная регрессия	Нет	Стабилизация
Прогрессирование	Любой	Да или нет	Прогрессирование
Любой	Прогрессирование	Да или нет	Прогрессирование

Лечебный эффект (контроль болезни) – расценивался у больных, которые достигли полного и частичного эффекта и стабилизацию болезни.

Время до прогрессировании болезни – время от начала лечения до установления прогрессирования болезни.

Общая выживаемость – время от начала лечения до смерти больного или на момент окончания исследования.

Длительность эффекта – от момента его установления до прогрессирования болезни или прекращения исследования.

13. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ЦИФРОВЫХ ДАННЫХ И АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ

Все сведения о продолжительности жизни больных были внесены в базу данных, распределены по группам в соответствии с разработанным нами кодификатором. Анализ выживаемости больных проведен по методу Каплан-Мейера. Для оценки степени достоверности различий между медианами выживаемости больных в сравниваемых группах использовался критерий Стьюдента (t).

13.1. Многофакторный анализ.

Материал был обработан в лаборатории медицинской кибернетики ГУ РОНЦ РАМН совместно с научным сотрудником Ротобельской Л.Е. с помощью программ медикобиологической статистики «АСТА». В комплекс исследования входили:

1) программа многомерной статистики;
2) программа выживаемости онкологических больных в зависимости от различных признаков;
3) программа многофакторного анализа.

Статистический анализ данных состоял в построении решающих правил (по методу Байеса) [1], применяющих различные наборы признаков. Для вычисления коэффициентов решающих правил использовались данные о 189 больных по 34 признакам. Было испытано 12 решающих правил с различными наборами признаков. Доверительные интервалы вычислялись с помощью биноминального распределения. Достоверный интервал для лучшего правила из N правил определялся по методу Бонферрона (Учет «Многократных сравнений») [38]. Вычислялись коэффициенты информативности Вапника-Червоненкиса [1].

Тесты χ-квадрат и точный критерий Фишера использовались для проверки достоверности различий значений признаков в группах.

Достоверность различий в нашем исследовании определялась с помощью доверительного коэффициента t (критерий Стьюдента). Различия считались статистически достоверными при $t>2,0$, т.е. с уровнем значимости $P<0,05$ (95% точности).

14. КЛИНИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИНГАРОНА ПРИ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

Лечение включало ежедневное введение Ингарона 500×10^3 МЕ в течение 5 дней первой недели. На второй неделе проводили химиотерапию, включающую Ломустин 80 мг/м^2, в день 1; Дакарбазин 250 мг/м^2, в дни 1, 2, 3 и Цисплатин 80 мг/м^2, в день 3. Затем, продолжали введения Ингарона 500×10^3 три раза в неделю на протяжении 3, 4 и 5 недель. Следующий курс начинали на 6 неделе с ежедневного введения Ингарона.

В исследование был включен 41 больной, (21 женщина и 20 мужчин), средним возрастом 52,8 лет (от 18 до 78). Характеристика больных представлена в таблице 2.

Эффективность лечения оценена у 39 больных. У 4 (10.3%) больных была достигнута полная регрессия опухоли, у 9 (23,1%) – частичная, у 16 (41,0%) индуцирована стабилизация болезни на срок не менее 3-х мес. Прогрессирование болезни было у 10 (25,6%) больных. Полная + частичная регрессия опухоли достигнута в 33,3% случаев, общий лечебный эффект (полная + частичная регрессия + стабилизация болезни) – в 74,4% случаев.

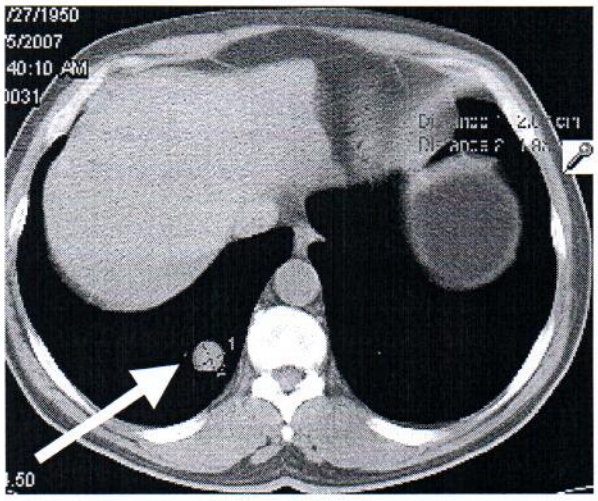
Полный эффект был достигнут у 4 больных, из них у 3 при метастазах только в мягкие ткани/лимфатические узлы и у 1 больного при солитарном метастазе в легкое (как единственного проявления болезни). Всего проведено 4, 5, 6 и 9 курсов лечения. Эффект при метастазах в мягкие ткани/ лимфатические узлы реализовался после 2, 5 и 7 мес. лечения. При метастазе в легкое его полная регрессия установлена через 6 мес. от начала терапии (рис.12).

У 3 больных при метастазах только в мягкие ткани после проведения 4,5 и 6 курсов было выполнено оперативное лечение в объеме лимфаденэктомии/удалении предполагаемой остаточной опухоли. При гистологическом исследовании опухолевая ткань во всех случаях не выявлена.

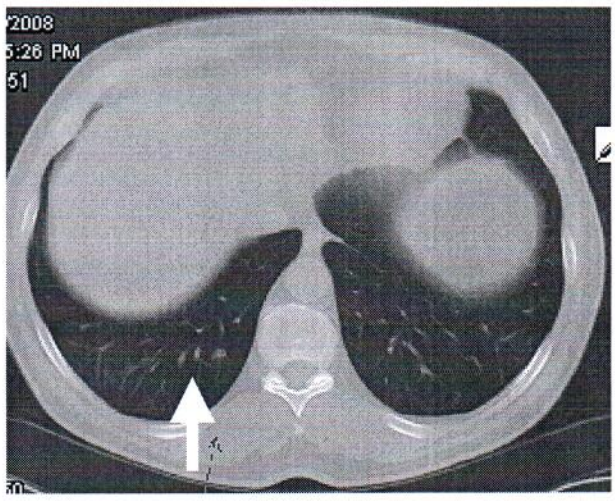
Таблица 2

Характеристика больных диссеминированной меланомой кожи, получивших лечение Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном

Возраст (лет)	52,8 (18-78)
Пол	
мужчины	20
женщины	21
Предварительное лечение	
оперативное (удаление первичного очага ± метастазов)	
только оперативное	13
адъювантная химиотерапия	3
адъювантное введение α-ИФН	14
адъювантная химиотерапия + α-ИФН	3
ранее лечения не было	7
Локализация метастазов	
только в мягкие ткани и лимфатические узлы	24
только во внутренние органы	6
мягкие ткани, лимфатические узлы, кости и внутренние органы	11



А.



Б.

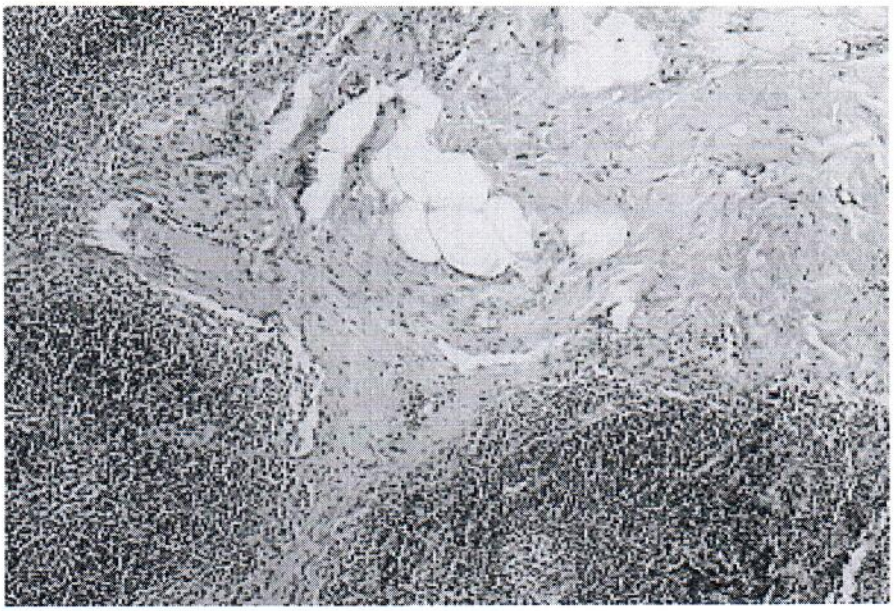
А. до начала лечения. В правом легком солитарный метастаз размером 1,3×1,0 см.
Б. после 6 мес. лечения. На месте ранее определяемого метастаза фиброзный тяж.

Рис. 1. Больной Ч. Полная регрессия метастаза в правое легкое на фоне терапии Ингароном, Ломустином, Дакарбазином и Цисплатином.

Среди 4 больных с достигнутым полным эффектом прогрессирование болезни было установлено у 1 больного спустя 7,5 мес. после завершения лекарственного лечения. Длительность эффекта составила 7,7, 15 и 25 мес.

К окончанию исследования все больные были живы и завершили лечение, длительность наблюдения составляет 12, 17, 29 и 29 мес.

В качестве примера приводим наблюдение. ***Больная А., 56 лет.*** В декабре 2005 г. по поводу меланомы кожи спины T2N0M0 выполнено иссечение опухоли. При гистологическом исследовании установлена эпителиоидноклеточная пигментная меланома с участками веретеноклеточного строения. В январе 2006 г. выявлены (и подтверждены при цитологическом исследовании) метастазы в подмышечные и шейнонадключичные лимфоузлы слева размером от 1,0 до 1,4 см. После 4 курсов лечения по данным ультразвукового исследования установлена полная регрессия лимфатических узлов. При пункции выявлен только детрит.



В ткани лимфоузла склероз, клетки опухоли не определяются.
Гематоксилин-эозин х40

Рис. 2. Больная А. Лечебный патоморфоз IVст. в ткани лимфатического узла после 5 курсов лечения Ингароном, Ломустином, Дакарбазином и Цисплатином.

После 5 курсов лечения выполнена подмышечная лимфаденоэктомия слева. При гистологическом исследовании установлен лечебный патоморфоз IV ст. (рис. 19). На момент завершения исследования больная жива без признаков прогрессирования. Длительность ремиссии составила 25 мес.

Частичный эффект был достигнут у 9 больных, из них у 4 при метастазах только в мягкие ткани/лимфатические узлы, у 1 в легкие, у 1 в легкие, печень и кости, у 3 больных во внутренние органы и мягкие ткани. Эффект при метастазах в мягкие ткани/лимфатические узлы реализовался после 2,2, 3 и 5 мес. лечения; при метастазах только во внутренние органы – через 2 и 5 мес. лечения; при метастазах в мягкие ткани/лимфатические узлы и внутренние органы через 2,2 и 7 мес. соответственно. Больные получили от 3 до 10 курсов лечения, 3 курса получили 2 больных, 4 курса – 3 больных, 7 курсов – 2 больных, 9 и 10 курсов – по одному больному, соответственно.

У 1 больной лечение было прекращено после 4 курса в связи с развившейся после 3 последовательных редукций доз препаратов панцитопении и печеночной токсичности II ст. После коррекции осложнений было продолжено лечение α-ИФН, на фоне которого прогрессирование болезни было установлено через 12 мес. от момента установления частичного эффекта.

У 1 больной лечение завершено по причине гематологической токсичности IV ст. после 2 последовательных редукций доз препаратов. В дальнейшем больная получала лечение только Ингароном, длительность частичного эффекта составила 6 мес. Время от начала лечения у 6 больных с частичной ремиссией до прогрессирования составило 6, 9, 12, 12 и 14 мес. У 4 больных прогрессирования не было.

Стабилизация болезни (≥ 3 мес.) была установлена у 16 больных.

Метастазы только в мягкие ткани/лимфатические узлы были у 9 больных, только во внутренние органы у 4 больных, одновременно в мягкие ткани/лимфатические узлы и внутренние органы у 3 больных.

Два курса лечения получили 5 больных, 3 курса – 5 больных, 4 курса – 1 больной, 5 курсов 3 больных и 6 курсов – 2 больных. Лечение завершили 15

больных, одна продолжает терапию. Длительность сохранения эффекта составила 3,4,4^{+},5,6,6,6,6^{+},6^{+},7,7,7,8^{+},10,16^{+} и 17^{+} мес.

У 10 из 16 больных установлено прогрессирование болезни. У 3 больных после 2,2 и 3 курсов было выполнено хирургическое удаление метастазов в мягкие ткани/лимфатические узлы. У 1 из них в последующем установлено прогрессирование болезни через 8 мес. от начала лечения; у 2 отсутствуют признаки прогрессирования в течение 4 и 16 мес.

На момент завершения исследования умерло 9 больных, из которых 8 от прогрессирования болезни и 1 от острой сердечной недостаточности, живы 7 больных.

Прогрессирование болезни установлено у 10 больных. Метастазы только в мягкие ткани/ лимфатические узлы были у 6 больных, в мягкие ткани и внутренние органы у 4 больных. У 8 больных проведено 2 курса лечения, у двух – один курс. Время до прогрессирования составило 2 мес. (от 1 до 2).

В анализ выживаемости включено 39 больных. Медиана времени до прогрессирования составила во всей группе 9,2 мес., а медиана общей выживаемости 15,2 мес. (рис. 3, 4).

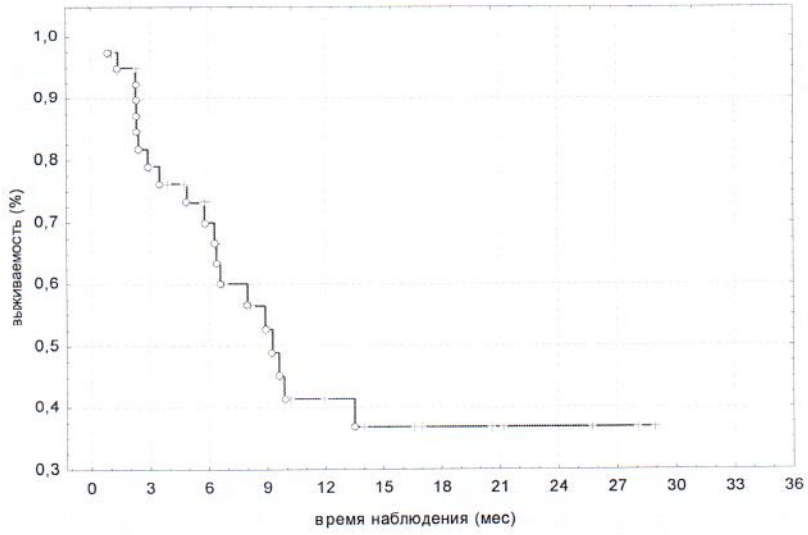


Рис. 3. Медиана времени до прогрессирования больных диссеминированной меланомой кожи, получивших лечение Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном.

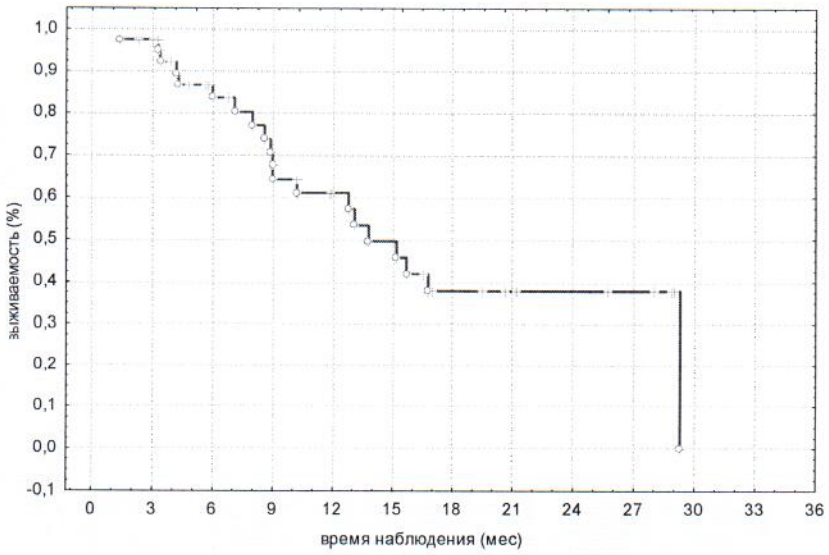
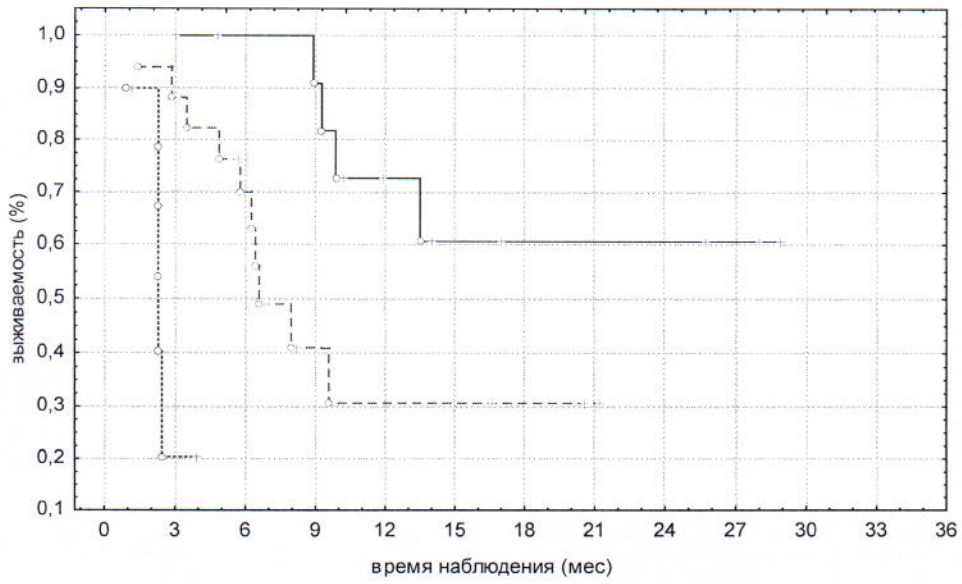


Рис. 4. Медиана общей выживаемости больных диссеминированной меланомой кожи, получивших лечение Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном.

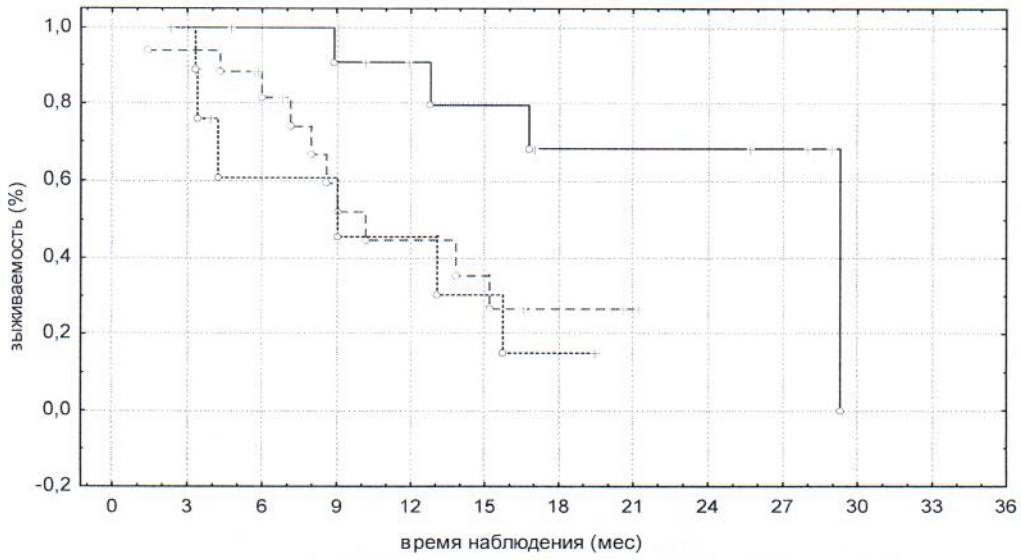
При достижении объективного (полного + частичного) эффектов медиана времени до прогрессирования не достигнута, при стабилизации составила 6,8 мес., и при прогрессировании – 2,5 мес. (рис. 5). Разница была статистически достоверна в сравнении эффективных и неэффективных случаев (χ^2=8,37, p= 0,015).



- эффектное лечение
- стабилизация
- прогрессирование

Рис. 5. Медиана времени до прогрессирования в зависимости от эффекта лечения Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном.

При достижении объективного эффекта больные жили достоверно дольше (рис. 6). Медиана выживаемости больных с объективным эффектом составила 28,3 мес., при стабилизации болезни – 10,2 мес., а при прогрессировании 9,1 мес. (χ^2=7,89, p=0,019).



- эффектное лечение
- стабилизация
- прогрессирование

Рис. 6. Медиана выживаемости в зависимости от эффекта лечения Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном.

Полученные высокие результаты клинической эффективности режима с включением Ингарона подтвердились анализом времени дожития больных. Во всей группе вероятность дожить до 7 мес. составила 80,5%, до 14 мес. 53,1 (±9,0)%, до 29 мес. 36,7%.

15. Побочные эффекты комбинации химиотерапии и Ингарона при лечении диссеминированной меланоме кожи

Побочные эффекты оценены у 41 больного на протяжении 152 курсов. Частота развития негематологических побочных эффектов представлена в таблице 4.

Рвота осложнила 24 (15,8%) курса из них II ст. в 8,6%. Тошнота возникала при проведении 40 (26,3%) курсов, включая II ст. в 12,5%. Потерю аппетита отметили больные после 11,8% курсов.

Клинически незначимое повышение уровней АЛТ и АСТ было при 10,5% курсах, в 1 случае было III ст., что послужило дополнительным основанием для прекращения лечения (см. ниже). Слабость возникала после 16,4% курсов лечения.

Таблица 4

Негематологические побочные эффекты 152 курсов химиотерапии диссеминированной меланомы Ингароном, Ломустином, Дакарбазином и Цисплатином

Побочный эффект/степень	I, n (%)	II, n (%)	III, n (%)	Всего, n (%)
Рвота	11 (7,2)	13 (8,6)	–	24 (15,8)
Тошнота	21 (13,8)	19 (12,5)	–	40 (26,3)
Анорексия	12 (7,9)	6 (3,9)	–	18 (11,8)
Повышение ферментов печени	14 (9,2)	2 (1,3)	1 (0.7)	17 (11,2)
Повышение билирубина	4 (2,6)	–	–	4 (2,6)
Повышение креатинина	6 (3,9)	1 (0,7)	–	7 (4,6)
Повышение мочевины	2 (1,3)	–	–	2 (1,3)
Повышение глюкозы	4 (2,6)	1 (0,7)	–	5 (3,3)
Аллергическая реакция	1 (0,7)	–	1 (0.7)	2 (1,3)
Слабость	16 (10,5)	9 (5,9)	–	25 (16,4)
Алопеция	2 (1,3)	1 (0,7)	–	3 (2,0)
Озноб	7 (4,6)	–	–	7 (4,6)

Повышение температуры	6 (3,9)	–	–	6 (3,9)
Головные боли	4 (2,6)	3 (2,0)	–	7 (4,6)
Миальгия	4 (2,6)	2 (1,3)	–	6 (3,9)

Невыраженные проявления нейротоксичности (I ст. – снижение сухожильных рефлексов, парастезии) были при 3 (2,0%) курсах лечения у 2 больных после проведения 5 и 6 курсов лечения соответственно и не требовали редукции доз Цисплатина.

Дозолимитирующей токсичностью режима была нейтропения и тромбоцитопения (табл. 28). Клинически незначимая (I-II ст.) нейтропения осложняла 31,6% курсов лечения, средней длительностью 14 дней (от 8 до 21 дня); выраженная (III-IV ст.) после 29,0% курсов, длительностью в среднем 12 дней. В 1 случае была фебрильная нейтропения. У 4 больных нейтропения была причиной редукции доз всех препаратов на 25%, у 5 – на 50%.

Таблица 5

Гематологические побочные эффекты 152 курсов химиотерапии диссеминированной меланомы Ингароном, Ломустином, Дакарбазином и Цисплатином

Побочный эффект/ степень	I, n (%)	II, n (%)	III, n (%)	IV, n (%)	Всего, n (%)
Нейтропения	19 (12,5)	29 (19,1)	31 (20,4)	13 (8,6)	92 (60,5)
Тромбоцитопения	48 (31,6)	26 (17,1)	23 (15,1)	24 (15,8)	121 (79,6)
Анемия	46 (30,3)	38 (25,0)	20 (13,2)	12 (7,9)	116 (76,3)

Тромбоцитопения после проведения 48,7% курсов была I-II ст. выраженности, длительностью в среднем 10 дней (от 7 до 21 дня). Значимая (III-IV ст.) была установлена после 30,9% курсов, при 4 из которых был геморрагический синдром (в 3 – петехиальная сыпь и в одном – маточное кровотечение). Длительность тромбоцитопении III и IV ст. была в среднем 9 дней (от 7 до 21). У 4 больных тромбоцитопения была причиной снижения доз всех препаратов на 25% и у 3 – на 50%. Заместительная трансфузия

тромбоконцентрата была выполнена у 3 больных после 3, 4 и 5 курсов, соответственно.

Анемия осложнила проведение 76.3% курсов лечения. При этом умеренной степени выраженности (I и II ст.) была после 55,3% курсов. Значимая анемия (III и IV ст.) развилась после 21,1% курсов, что потребовало заместительной терапии эритроцитарной массой после 4 курсов.

Нарушения кроветворения привели к увеличению интервалов перед 46 (30,2%) курсами. Из них на одну неделю был отложен 29 (19,1%) курс, на две недели – 14 (9,2%), на 3 недели – 2 (1,3%) и на 4 недели – 1 (0,7%) курса.

Гематологическая токсичность была кумулятивной, нарастала по мере увеличения числа курсов лечения. Частота развития нейтропении II – III ст. возрастала к 3-4 курсу, а тромбоцитопении III-IV ст. к 4-6 курсу.

Развитие побочных эффектов, у 3 больных послужили причиной прекращения лечения. У 1 больного из-за развития аллергической реакции III ст. на введение Цисплатина. У 1 больной из-за длительной кумулятивной тромбоцитопении и нейтропении IV ст., осложненных геморрагическим синдромом после 2 редукций доз препаратов. У 1 больной из-за повторных случаев развития анемии, нейтропении и тромбоцитопении IV ст., печеночной (III ст.) и почечной недостаточности II ст. несмотря редукцию доз препаратов.

В целом, наиболее значимыми проявлениями побочных эффектов режима были нейтропения и тромбоцитопения. Их длительность не превышала в среднем двух недель, что позволило в большинстве случаев соблюдать планируемые интервалы. Редукция доз химиопрепаратов была необходима у 12 (29,3%) больных.

Результаты химиотерапии с включением Ингарона и контрольной группы, приведены в таблице 6. За группу контроля был принят аналогичный трехдневный режим химиотерапии, включавший Нидран, Дакарбазин и Цисплатин (см. выше).

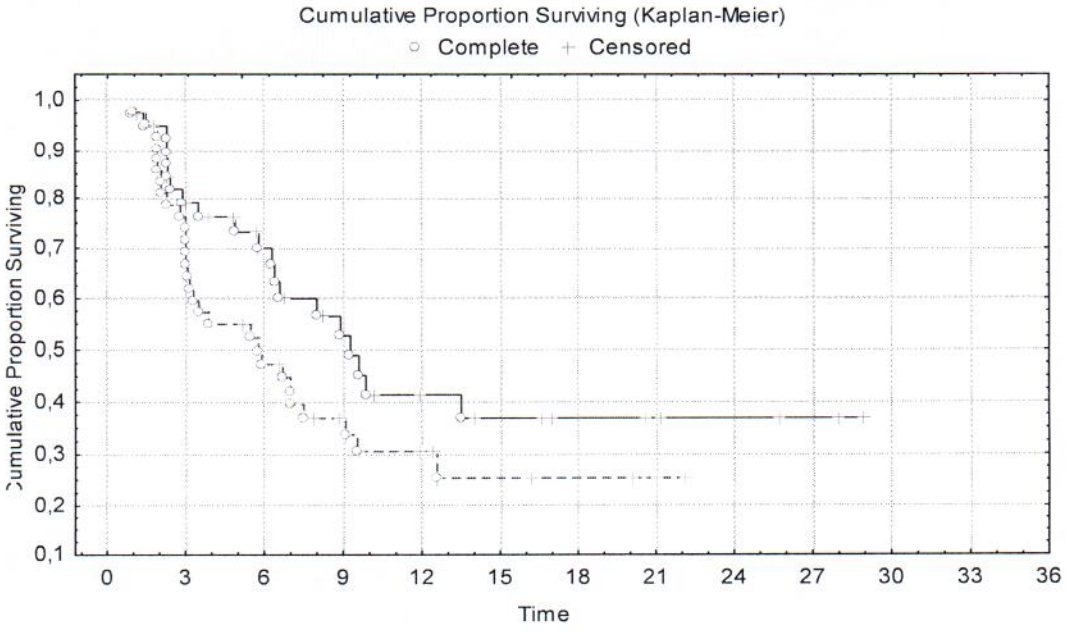
Таблица 6

Частота достижения эффекта химиотерапии и химиотерапии с включением Ингарона при диссеминированной меланоме кожи

Режим лечения	Число больных	Полный + частичный эффект	Полный + частичный эффект + стабилизация
Химиотерапия	43	20,9%	62,8%
Химиотерапия + Ингарон	39	33,3%	74,4%

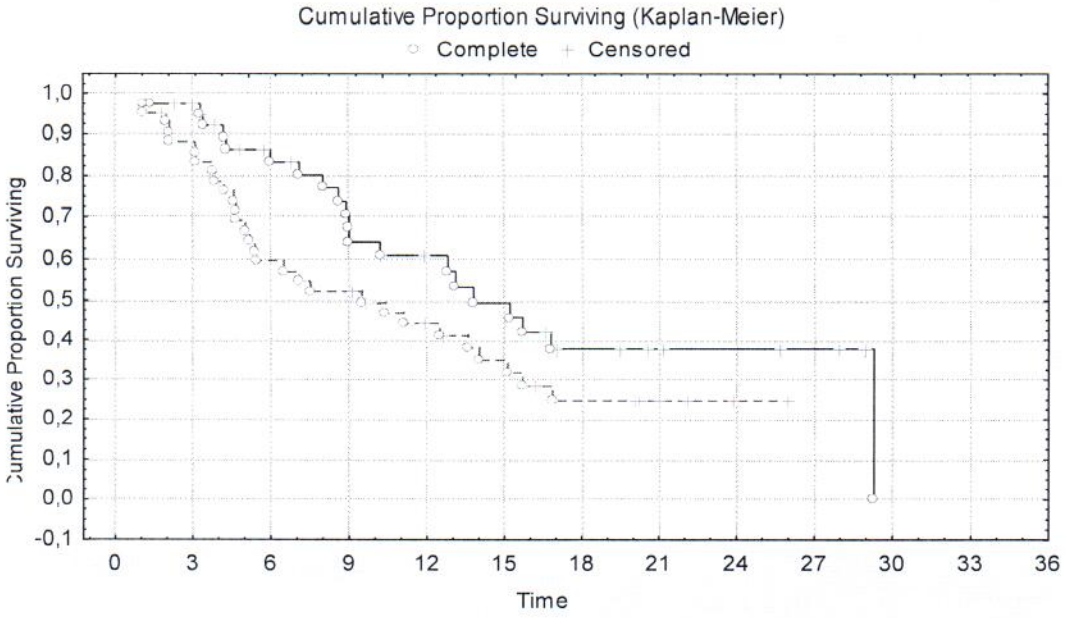
Из приведенных данных следует, что как частота достижения объективного эффекта (полный + частичный эффект) 33,3% против 20,9%, так и лечебного (полный + частичный эффект + стабилизация болезни) была выше у больных, получивших Ингарон.

Преимущество химиотерапии с включением Ингарона наиболее полно проявилось при сравнении выживаемости больных. Медиана времени до прогрессирования у 43 больных, получивших только химиотерапию, составила 5,8 мес. против 9,2 мес. при проведении химиотерапии с включением Ингарона. Разница была статистически достоверна, p = 0,03 (рис. 7 А. Б).



- химиотерапия с включением Ингарона
- только химиотерапия

А.



- химиотерапия с включением Ингарона
- только химиотерапия

Б.

Рис. 7. Медиана времени до прогрессирования (А) и общей выживаемости (Б) у больных, получавших только химиотерапию и химиотерапию в комбинации с Ингароном.

Медиана общей выживаемости при проведении химиотерапии составила 9,3 мес., а у больных, получавших лечение с Ингароном – 15,2 мес., разница также была достоверна (p= 0,02), рисунок 7Б.

При сопоставлении частоты возникновения негематологических побочных эффектов у больных, получавших химиотерапию с включением Ингарона и контрольной группы, статистически значимых различий найдено не было (табл. 7). Отмечено только достоверное увеличение частоты развития астении (χ^2=5,79, p=0,016) при включении в режимы Ингарона.

Таблица 7

Негематологические побочные эффекты курсов лечения диссеминированной меланомы кожи (все степени токсичности)

Побочный эффект	ХТ* (n=173)	И+ХТ** (n=152)
Рвота	24 (13,9%)	24 (15,8)

Тошнота	36 (20,8%)	40 (26,3)
Диарея	4 (2,4%)	–
Анорексия	10 (5,8%)	18 (11,8)
Повышение ферментов печени	29 (16,8%)	17 (11,2)
Повышение билирубина	6 (3,5%)	4 (2,6)
Повышение креатинина	6 (3,5%)	7 (4,6)
Повышение мочевины	4 (2,3%)	2 (1,3)
Повышение глюкозы	18 (10,4%)	5 (3,3)
Аллергическая реакция	–	2 (1,3)
Слабость	11 (6,4%)	25 (16,4)
Алопеция	8 (4,6%)	3 (2,0)
Озноб	1 (0,6%)	7 (4,6)
Повышение температуры	–	6 (3,9)
Головные боли	–	7 (4,6)
Миальгия	–	6 (3,9)

* – ХТ – только химиотерапия

** – И+ХТ – химиотерапия с включением Ингарона

Таблица 8

Гематологическая токсичность курсов химиотерапии диссеминированной меланомы кожи.

А. Контрольная группа, химиотерапия Нидраном, Дакарбазином и Цисплатином, 173 курсов

Побочный эффект/ степень	I, n (%)	II, n (%)	III, n (%)	IV, n (%)	Всего, n (%)
Нейтропения	33 (19,0)	66 (38,2)	28 (16,1)	3 (1,7)	130 (75,0)
Тромбоцитопения	39 (22,5)	36 (20,8)	27 (15,6)	9 (5,2)	111 (64,1)
Анемия	58 (33,5)	42 (24,2)	18 (10,4)	4 (2,3)	122 (70,5)

Б. Химиотерапия Нидраном, Дакарбазином и Цисплатином с включением Ингарона, 152 курса

Побочный эффект/ степень	I, n (%)	II, n (%)	III, n (%)	IV, n (%)	Всего, n (%)
Нейтропения	19 (12,5)	29 (19,1)	31 (20,4)	13 (8,6)	92 (60,5)
Тромбоцитопения	48 (31,6)	26 (17,1)	23 (15,1)	24 (15,8)	121 (79,6)

Анемия	46 (30,3)	38 (25,0)	20 (13,2)	12 (7,9)	116 (76,3)

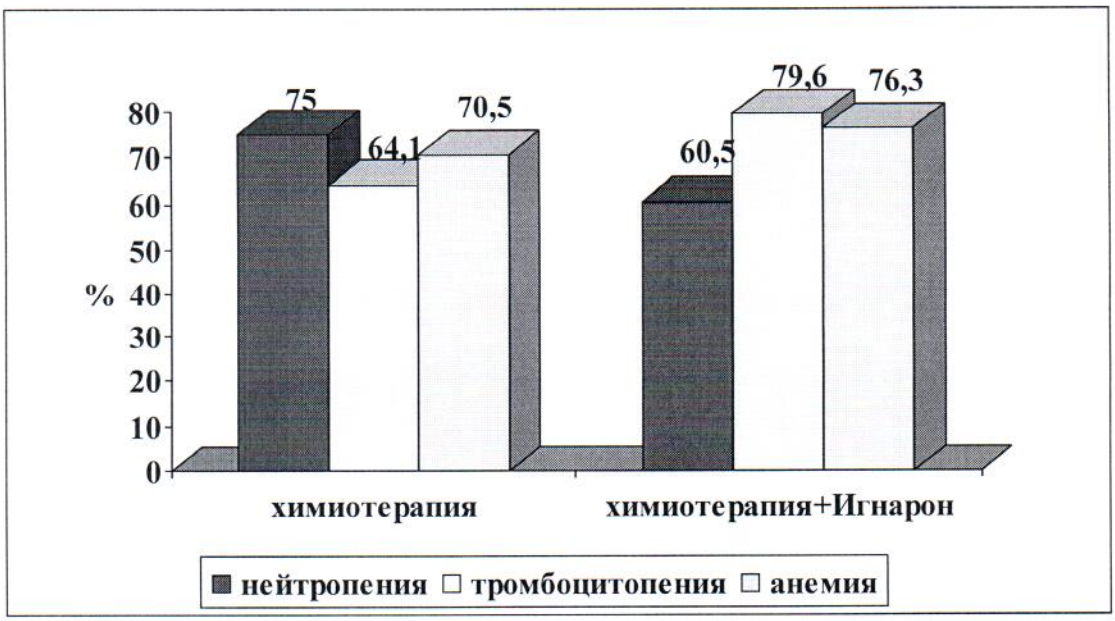


Рис.8. Частота встречаемости гематологических осложнений курсов химиотерапии диссеминированной меланомы кожи.

При сравнении режимов химиотерапии и таковой с включением Ингарона достоверной разницы в частоте развития нейтропении, тромбоцитопении и анемии не установлено (табл. 8; рис. 8). При этом процент курсов, осложненных развитием побочных эффектов III и IV ст. не имел достоверных различий между группами.

Таким образом, показано увеличение лечебного эффекта химиотерапии за счет включения в режим Ингарона. Объективный эффект и стабилизация болезни были достигнуты у 74,4% получивших лечение больных. Особенно важно отметить статистически достоверное увеличение времени до прогрессирования и общей выживаемости. Достоверное преимущество в общей выживаемости у больных получавших Ингарон составило + 5,9 мес. При этом, совместное применение Ингарона и химиотерапии не приводило к значимому увеличению частоты и степени выраженности побочных эффектов.

16. Влияние химиотерапии с включением Ингарона на показатели иммунного статуса больных диссеминированной меланомой кожи

16.1 Материалы и методы II.

16.1.1. *Выделение клеток из цельной крови на градиенте плотности фиколл-верографина.*

Выделение мононуклеарной фракции клеток периферической крови проводили в градиенте плотности фиколл-верографин (d=1.076 г/л). Гепаринизированную кровь разводили в 2 раза PBS и осторожно наслаивали на фиколл в следующих соотношениях: 3 объема разведенной крови на 1 объем фиколла и центрифугировали при 1500 об/мин (30 мин) при комнатной температуре. Мононуклеарные клетки собирали из интерфазы автоматической пипеткой. Клетки отмывали первый раз PBS (20 мин) при 1500 об/мин, а затем еще 2 раза по 10 мин при 1000 об/мин при комнатной температуре.

16.1.2. *Непрямая реакция поверхностной иммунофлуоресценции.*

На первом этапе $5x10^5$ клеток инкубировали в 96- луночных культуральных планшетах (Costar, США) с 20 мкл МКА (моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов) в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем клетки отмывали в 150 мкл PBS центрифугированием в течение 7 мин. при 1000 об/мин. На втором этапе клетки инкубировали 30 мин при 4^oC с 20 мкл F(ab)2 фрагментов кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченых FITC, (производство ООО «Сорбент»). После чего клетки дважды отмывали PBS и ресуспендировали в 150 мкл PBS, содержащем 1 % формалин.

Процентное содержание основных субпопуляций лимфоцитов [$CD3^+$ (Т клетки), $CD5^+$ (Тклетки), $CD7^+$ (Т клетки, NK-клетки), $CD4^+$ (Т хелперы), $CD8^+$ (цитотоксические Т лимфоциты, NK клетки), HLA-DR^+ (В лимфоциты, активирование Т лимфоциты), $CD38^+$ (активированные лимфоциты, NK-клетки), $CD25^+$ (активированные Т и В клетки, регуляторные Т клетки), $CD20^+$

(В клетки), $CD16^+$ (NK клетки), $CD11b^+$ (NK клетки), $CD95^+$ (Fas/Apo-1 антиген, опосредующий апоптоз) и $CD71^+$ (рецептор трансферрина) $CD45RA^+$ (наивные Т- и В-лимфоциты, NK- клетки), $CD50^+$ (молекула адгезии)] анализировали методом проточной цитофлуориметрии (Таблица 8).

16.1.3. *Проточно-цитофлуориметрический анализ*

Проточно-цитофлуориметрический анализ проводили на проточных цитофлуориметрах FACScan и FACSCalibur производства корпорации Becton Dickinson, США. укомплектованных воздухо-охлаждаемым аргоновым лазером (длина волны возбуждения - 488 нм). Сбор и анализ материала проводили с использованием коммерческого программного обеспечения Lysis II и CELLQuest. Клетки анализировали на основе параметров, измеряемых проточной цитофлуориметрией. В момент прохождения через луч лазера клетки рассеивают свет во всех направлениях и испускают небольшое количество света за счет флуоресценции. Прямое рассеивание света (FCS) (количество света в направлении лазерного пучка под углом 0^o) определяет размер и форму клеток, тогда как боковое (SSC) (под углом 90^o по отношению к лазерному пучку) определяет структурные особенности различных популяций клеток. На цитограмме устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), в котором на основании FSC и SSC вырезали основной пул клеток с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. Интенсивность флуоресценции проводилась с учетом анализа гистограмм. В каждом образце накапливали не менее 5-10 тысяч событий в зависимости от цели исследования. Длина волны для зеленой флуоресценции (FITC) устанавливалась в канале FL1 (515-545 нм). Данные получали в логарифмическом измерении для канала FL1 (FITC).

Таблица№9.

Субпопуляции лимфоцитов периферической крови.

Маркер лимфоцитов	**Субпопуляции лимфоцитов**
CD3	**Т лимфоциты**

CD5	**Т лимфоциты**
CD7	**Т лимфоциты, NK клетки**
CD4	**Т хелперы**
CD8	**Т лимфоциты (цитотоксические)**
HLA-DR	**В-лимфоциты, активированные Т лимфоциты**
CD38	**Активированные лимфоциты**
CD25	**α – цепь рецептора IL-2, активированные Т лимфоциты, регуляторные Т клетки**
CD50	**Все лейкоциты (молекула адгезии)**
CD16	**NK клетки**
CD11b	**C3bi рецептор комп. комплемента)**
CD20	**В лимфоциты**
CD95	**(Fas/Apo-1 – антиген, опосредующий апоптоз).**
CD45RA	**Т и В лимфоциты, NK клетки**
CD71	**Рецептор трансферрина. Активированные лейкоциты.**

16.1.4. *Изучение цитотоксической активности естественных киллеров (NK- клеток).*

Активность NK-клеток изучали в цитотоксическом тесте против линии клеток эритролейкемии К-562 в модификации, с помощью полуавтоматического спектрофотометрического МТТ-теста, основанного на способности митохондрий живых клеток редуцировать растворимую соль тетразолия (МТТ) в нерастворимый окрашенный формазан. Цитотоксическую активность NK клеток оценивали при соотношении эффектор: мишень равном 5:1, 10:1, 20:1 и 40:1, соответственно. Оптическую плотность определяли с помощью планшетного восьмиканального вертикального фотометра (Мультискан MS, Labsystem, Финляндия) при длине волны 540 нм. Цитотоксическую активность клеток рассчитывали по стандартной формуле.

16.1.5. *Определение концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови*

Концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли по методу Манчини.

16.2 Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни, связь между факторами определяли путем вычисления коэффициента корреляции при помощи пакета статистических программ «Статистика».

16.3 Результаты

Исходно до лечения у больных отмечались определенные отличия в популяционном составе Т-лимфоцитов от группы здоровых лиц. Статистически значимо различались пропорции $CD3^+$, $CD5^+$, $CD7^+$, $CD8^+$, $CD38^+$, $CD25^+$, $CD45RA^+$ и $CD95^+$ клеток (табл. 7,8). Сравнительный анализ групп больных, не имевших и имевших эффект лечения показал, что по некоторым параметрам они различались между собой. Так у больных, получавших лечение без эффекта, пропорция $CD25^+$ клеток была достоверно выше, чем в контроле (табл. 10), чего не было у больных второй группы. У больных, леченных с эффектом (табл. 9), процент $CD8^+$ Т-лимфоцитов, а также В-клеток ($CD20^+$) исходно был достоверно выше, чем у здоровых лиц, чего не было у больных, получивших лечение без успеха. В обеих группах было статистически значимое снижение пропорции $CD3^+$,$CD5^+$, $CD7^+$ клеток и повышение $CD38^+$ клеток по сравнению с контрольной группой.

Таблица 9

Динамика основных показателей иммунного статуса у больных с достигнутым лечебным эффектом

Маркер	Контроль	До лечения	После 2 курса	После 4 курса	После 6 курса
CD3	71,8 ± 1,5	65,06 ± 2,2*)	66,6 ± 3,6	65,22 ± 5,9	48,0 ± 5,85
CD5	70,1 ± 1,8	62,3 ± 2,6*)	55,98 ± 2,86	67,03 ± 4,6	47,0 ± 2,4**)
CD7	73,1 ± 1,4	67,6 ± 1,8*)	63,17 ± 3,18	58,9 ± 5,0	57,18 ± 5,5***)
CD4	43,1 ± 1,4	40,89 ± 2,4	37,37 ± 2,4	37,2 ± 4,1	30,87 ± 4,6***)
CD8	24,9 ± 1,9	19,89 ± 1,5*)	22,3 ± 2,1	24,8 ± 5,4	20,77 ± 3,7
CD4/CD8	2,0 ± 0,13	2,4 ± 0,2	1,97 ± 0,17	2,5 ± 0,7	2,04 ± 0,8
HLA-DR	8,8 ± 0,72	10,7 ± 0,9	14,8 ± 2,15	14,56 ± 3,6	15,5 ± 6,9
CD38	27,1 ± 2,2	36,9 ± 2,6*)	41,82 ± 4,7	38,14 ± 6,0	35,7 ± 4,8
CD25	4,86 ± 0,45	6,25 ±1,3	6,9 ± 0,86	5,78 ±1,11	9,0 ± 2,5

CD50	91,7 ± 1,25	87,7 ±2,6	81,5 ± 3,5	85,8 ±6,8	71,0 ± 11,0
CD16	18,13 ± 1,13	17,28 ± 2,1	10,65 ± 1,0	10,7 ± 2,0	15,53 ± 2,97
CD20	7,4 ± 0,7	10,02 ±0,97*)	7,3 ± 1,0	5,01 ± 1,12	9,6 ± 0,42
CD11b	20,1 ± 3,1	19,09 ± 2,1	14,02 ± 1,65	13,7 ± 2,9	20,9 ± 4,7
CD45RA	53,4 ± 2,1	48,3 ±2,2	38,9 ± 3,0	40,42 ± 4,8	33,8 ± 5,2***)
CD95	53,14 ± 2,6	42,14 ± 3,4	45,3 ± 3,13	46,56 ± 4,5	31,0 ± 10,7
CD71		2,2 ± 0,5	3,4 ± 0,6	2,37 ± 0,47	5,8 ± 1,15***)
Акт-ть NK	40,82 ± 1,4	38,15 ± 3,7	46,7 ± 5,2	44,9 ± 7,6	49,3 ± 5,6
IgG	12,08 ± 0,85	16,99 ± 1,44	16,9 ± 1,9	16,63 ± 2,83	16,9 ± 4,8
IgA	2,26 ± 0,321	3,19 ± 0,37	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,45	2,32 ± 0,47
IgM	1,43 ± 0,13	1,67 ± 0,25	1,63 ± 0,24	1,48 ± 0,25	1,06 ± 0,2

**)* – *$p \leq 0,05$ между показателем в контрольной группе и у больных до лечения*
***)* – *$p \leq 0,05$ между показателем по окончании лечения (после 6 курса) и после предыдущего исследования*
****) $p \leq 0,05$ между показателем до лечения и по окончании лечения*

Таблица 10

Динамика основных показателей иммунного статуса у больных, получавших лечение без эффекта

Маркер	Контроль	До лечения	После 2 курсов
CD3	71,8 ± 1,5	56,0 ± 4,4*)	69,7 ± 4,1**)
CD5	70,1 ± 1,8	57,6 ± 4,2*)	66,7 ± 2,8
CD7	73,1 ± 1,4	66,2 ± 5,5*)	77,2 ± 2,6
CD4	43,1 ± 1,4	35,8 ± 3,8	39,2 ± 4,2
CD8	24,9 ± 1,9	21,8 ± 9,9	26,5 ± 2,6
CD4/CD8	2,0 ± 0,13	2,0 ± 0,48	1,7 ± 0,3
HLA-DR	8,8 ± 0,72	8,5 ± 0,9	10,7 ± 1,5
CD38	27,1 ± 2,2	43,3 ± 4,0*)	42,3 ± 7,1
CD25	4,86 ± 0,45	8,1 ± 1,5	14,2 ± 5,5
CD50	91,7 ± 1,25	87,14 ± 3,2	94,8 ± 1,15
CD16	18,13 ± 1,13	14,3 ± 2,7	20,6 ± 3,9
CD20	7,4 ± 0,7	8,3 ± 0,7	5,7 ± 0,6**)
CD11b	20,1 ± 3,1	19,0 ± 3,0	18,5 ± 3,6
CD45RA	53,4 ± 2,1	53,8 ± 2,7	53,95 ± 3,3
CD95	53,14 ± 2,6	43,3 ± 4,2	41,8 ± 7,2
CD71	-	2,8 ± 0,9	2,12 ± 0,44
Акт-ть NK	40,82 ± 1,4	43,4 ± 7,4	52,9 ± 5,8
IgG	12,08 ± 0,85	20,4 ± 4,0	19,6 ± 2,2
IgA	2,26 ± 0,321	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2
IgM	1,43 ± 0,13	1,54 ± 0,47	2,01 ± 0,34

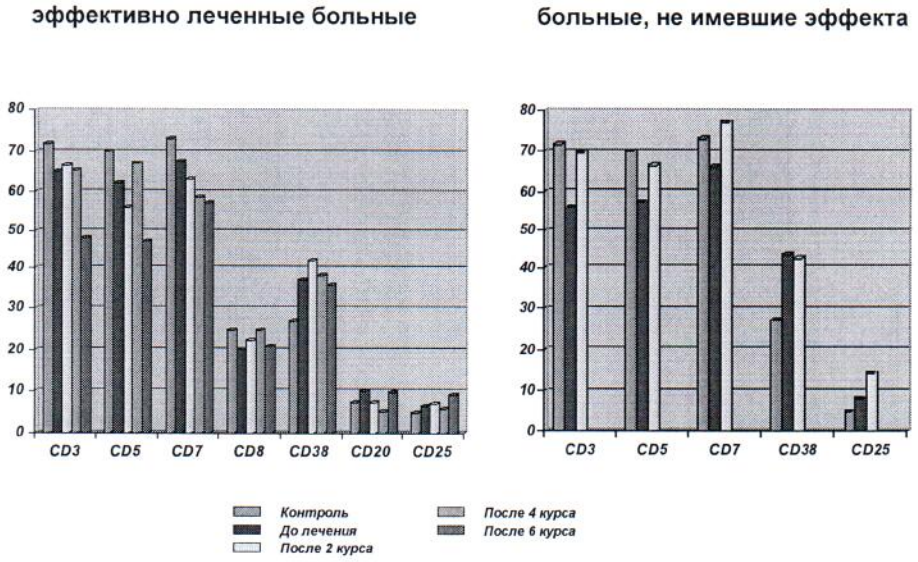
**) $p \leq 0,05$ между показателем в контрольной группе и у больных до начала лечения*
***) $p \leq 0,05$ между показателем до и после лечения*

Лечение Ингароном и химиотерапией привело к определенным изменениям в каждой из групп больных, и эти изменения различались в зависимости от исхода терапии.

У больных с прогрессированием заболевания удалось проследить только 2 курса терапии, после чего она была прекращена, поэтому данные, полученные при тестировании после второго курса, можно считать предшествующими прогрессированию. До лечения у больных этой группы было снижено процентное содержание $CD3^+$, $CD5^+$ и $CD7^+$-клеток. После двух курсов лечения оно поднялось до уровня контроля, но наступило прогрессирование заболевания. Количество $CD38^+$-лимфоцитов осталось таким же высоким, значительно выше, чем у здоровых лиц, а повышенная пропорция $CD25^+$ клеток еще дополнительно возросла. Иными словами, иммунокоррегирующего действия γ-ИФН у больных этой группы не наблюдалось.

Рисунок 9

Динамика пропорций некоторых субпопуляций лимфоцитов у больных меланомой при лечении Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном



Больные, достигшие лечебного эффекта, получили от 2 до 10 курсов лечения. Исходно сниженная у них пропорция $CD3^+$, $CD5^+$ и $CD7^+$ -клеток оставалась сниженной на протяжении 4 курсов лечения и снижалась в еще

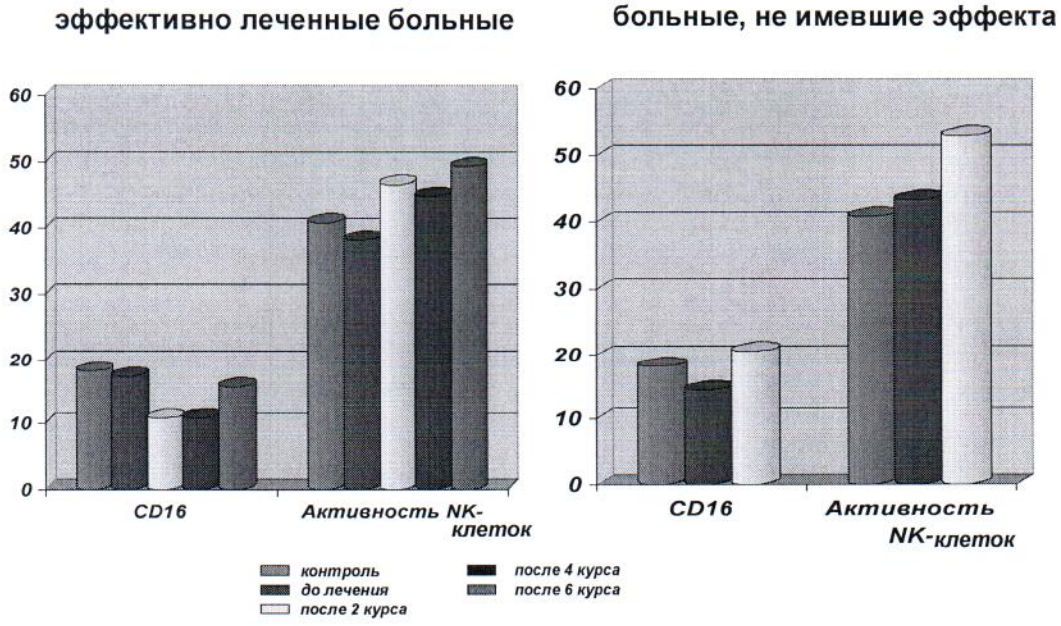
большей степени после 6-го курса, когда прогрессирование болезни было у 53,6% больных. Процент лимфоцитов с маркером CD38, исходно повышенный, увеличивался после 2-го курса, а затем снижался после 6 курса (т.е. перед прогрессированием).

Также к моменту прогрессирования повышалась пропорция лимфоцитов, экспрессирующих рецептор для интерлейкина-2 ($CD25^+$-клетки). Количество этих клеток немного нарастало на протяжении эффективного лечения, но перед прогрессированием резко повышалось. Это же имело место и в группе больных, получивших лечение без эффекта. По-видимому, нарастание $CD25^+$ лимфоцитов было связано с прогрессированием меланомы.

Особенный интерес представляет соотношение динамики количеств NK-клеток ($CD16^+$) и их цитотоксической активности. У больных обеих групп исходно пропорция этих клеток была ниже, чем у здоровых лиц. На фоне неэффективной терапии она увеличивалась с одновременным возрастанием их цитотоксичности (рис. 10). В то же время у больных, получавших лечение с эффектом, количество $CD16^+$-клеток снижалось, параллельно с повышением их цитотоксичности, что говорит о повышении их цитотоксического противоопухолевого потенциала.

Рисунок 10

Динамика пропорций CD16+-лимфоцитов и цитотоксической активности NK-клеток у больных на фоне лечения Ломустином, Дакарбазином, Цисплатином и Ингароном



И только после 6 курса (перед прогрессированием) возрастало как количество CD16+-клеток, так и в небольшой степени, их цитотоксическая активность. Иными словами, реализация эффекта лечения Ингароном и химиотерапией совпадала с увеличением цитотоксического потенциала NK-клеток

и, возможно, с ним и связана. Прогрессирование же заболевания происходит на фоне возрастания количества этих клеток, но без их активации, а видимое возрастание цитотоксичности NK-клеток является результатом увеличения их количества в общей популяции лимфоцитов.

17. Заключение.

Проведенное исследование влияния терапии Ингароном на основные показатели иммунологической реактивности показало, что Ингарон оказывает иммуномодулирующее действие у больных меланомой: наблюдается тенденция к повышению % лимфоцитов, экспрессирующих CD5, нормализация % $CD3^+$, $CD38^+$, $CD71^+$, $CD25^+$ и $HLA\text{-}DR^+$ лимфоцитов. Наиболее интересным является влияние Ингарона на естественные киллеры. Препарат приводит к нормализации как повышенного, так и пониженного % $CD16^+$ клеток. При этом цитотоксическая активность NK- клеток возрастает по отношению к исходному уровню не только у больных, у которых % этих клеток повышается, но и у больных, у которых он снижается до нормы. Таким образом, включение в режим химиотерапии Ингарона повышает цитотоксический эффект естественных киллеров, что играет ключевую роль в достижении клинического эффекта терапии. Ингарон обладает уникальными эффектами на иммунитет у онкологических больных.

18. Выводы

1. Разработан высокоэффективный режим химиотерапии в комбинации с Ингароном при лечении диссеминированной меланомы кожи. Полный эффект достигнут в 10,3% случаев, частичная регрессия опухоли - в 23,1% случаев, стабилизация болезни ($\geq$ 3 мес.) – в 41% случаев. Общий лечебный эффект (полная + частичная регрессия + стабилизация болезни) – в 74,4% случаев.
2. Включение в комбинацию химиотерапии (Дакарбазин + Ломустин + Цисплатин) Ингарона приводило к достоверному увеличению медианы общей выживаемости, достигшей 15,2 мес., что на 4,5 мес. выше, чем в группе контроля. При достижении объективного эффекта медиана выживаемости составила 28,3 мес.

3. Побочные эффекты режима были умеренными, предсказуемыми и обратимыми. Включение в режим лечения Ингарона не увеличивало гематологическую токсичность химиотерапии.

4. Достижение эффекта лечения Ингароном и химиотерапией было связано с увеличением цитотоксического потенциала NK-клеток ($CD16^+$).

5. Доказано уникальное иммуномодулирующее действие Ингарона на иммунитет у онкологических больных.

6. Можно рекомендовать к использованию в рутинной клинической практике данный режим химиотерапии в сочетании с Ингароном: Ломустин 80 мг/м^2 внутрь день 1, Дакарбазин 250 мг/м^2 внутривенно струйно в дни 1, 2, 3, Цисплатин 80 мг/м^2, внутривенно капельно со стандартной водной нагрузкой – 3 день. Ингарон 500×10^3 МЕ внутримышечно, 1 – 5 дни до химиотерапии и со 2 недели три раза в неделю на 3 – 5 неделе.

19. Библиография

1. *Абрамов М.Е., Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г. и соавт.* Ингарон (интерферон гамма) в сочетании с химиотерапией в лечении онкологических больных. // Фарматека. 2006, **(126)** №11 С. 38-42

2. *Aulitzky W. E., Aulitzky W. K., Frick J., et al.* Treatment of cancer patients with recombinant interferon-γ induces release of endogenous tumor necrosis factor-α. // Immunobiology, 1990, **180** P 385–394

3. *Aulitzky W., Gastl G., Aulitzky W. E., et al.* Interferon- γ for the treatment of metastatic renal cancer: dose-dependent stimulation and downregulation of ß-2 microglobulin and neopterin responses. // Immunobiology, 1987. **176**.P 85–95

4. *Creagan, E. T., Ahmann, D. L., Long, et al.* Phase II study of recombinant interferon-γ in patients with disseminated malignant melanoma. // Cancer Treat. Rep., 1987 Sep;**71**(9), P843-844

5. *Creagan, E.T., Schaid, D. J., Ahmann, D. L., et al.* Disseminated malignant melanoma and recombinant interferon: analysis of seven consecutive Phase II investigations. // J. Investig. Dermatol., 1990. **95** (Suppl. 6). P 188–192

6. *Foon K.A., Sherwin S.A., Abrams P.G. et al.* A phase I trial of recombinant gamma interferon in patients with cancer. // Cancer Immunol Immunother. 1985. **20**. P 193-197

7. *Haase KD, Lange OF, Scheef W.* Interferon-gamma treatment of metastasized malignant melanoma. // Anticancer Res. 1987 May-Jun;**7**(3 Pt B). P335-336

8. *Kleinerman E. S., Kurzrock R., Wyatt D., et al.* Activation or suppression of the tumoricidal properties of monocytes from cancer patients following treatment with human recombinant γ-interferon. // Cancer Res., 1986. **46**. P 5401–5405

9. *Kopp W. C., Smith, J. W., Ewel, C. H. et al.* Immunomodulatory effects of interferon- γ in patients with metastatic malignant melanoma. // J. Immunother., 1993. **13**.P 181–190
10. *Maluish, A. E., Urba, W. J., Longo, et al.* The determination of an immunologically active dose of interferon- γ in patients with melanoma. // J. Clin. Oncol., 1988. **6.** P 434–445
11. *Propper D.J., Chao D.,Braybrooke J.P. et al.* Low-Dose IFN-γ Induces Tumor MHC Expression in Metastatic Malignant Melanoma. // Clinical Cancer Research. 2003.Vol. **9**, P 84–92
12. *Rubin BY, Gupta SL.* Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. // Proc Natl Acad Sci USA. 1980. **77.** P 5928
13. *Saiki I., Murata J., Saito S., et al.* Effect of systemic administration of mouse recombinant interferon- γ on the lung tumor metastases in mice. // Mol. Biother., 1989. **1.** P 261–267
14. *Schadendorf D, Worm M, Czarnetzki BM.* Brain metastases of metastatic malignant melanoma: response to DTIC and interferon-gamma. // J Neurooncol. 1993 Apr; **16**(1). P 77-9
15. *Schiller, J. H., Pugh, M., Kirkwood, et al.* Eastern Cooperative Group trial of interferon- γ in metastatic melanoma—an innovative study design. // Clin. Cancer Res., 1996. **2**. P 29–36
16. *Talmadge J. E., Black P. L., Tribble H., et al.* Preclinical approaches to the treatment of metastatic disease: therapeutic properties of rH TNF, rM IFN- γ, and rH IL-2. // Drugs Exp. Clin. Res., 1987. **13**. P 327–337
17. *Weiner L. M., Steplewski Z., Koprowski H., et al.* Biologic effects of γ-interferon pre-treatment followed by monoclonal antibody 17-1A administration in patients with gastrointestinal carcinoma. // Hybridoma, 1986. **5** (Suppl. 1). P 65–77
18. *Windbichler, G. H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., et al.* Interferon-γ in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized Phase III trial. // Br. J. Cancer, 2000. P 1138–1144

Исполнители:

- Заведующий отделением комбинированных методов лечения и химиотерапии злокачественных опухолей У РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, чл.-корр. РАН, профессор, **М.Р. Личиницер**.

- Ведущий научный сотрудник отделения комбинированных методов лечения и химиотерапии злокачественных опухолей У РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, кандидат медицинских наук, **С.Л. Гуторов.**

- Старший научный сотрудник отделения комбинированных методов лечения и химиотерапии злокачественных опухолей У РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, кандидат медицинских наук, **М.Е. Абрамов.**

- Заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом У РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, академик РАЕН, профессор **З.Г. Кадагидзе**

- Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии опухолей У РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, **Е.Г. Славина**.

Список опубликованных работ

1. М.Е. Абрамов, З.Г. Кадагидзе, Е.Г. Славина, А.И. Черткова, М.Р. Личиницер Ингарон (гамма– интерферон) в сочетании с химиотерапией при лечении онкологических больных. «Фарматека» 2006г.

2. Abramov M.E., Chernoglazova E.V., **Gutorov S.L.**, Kadagidze Z.G., Slavina E.G., Chertkova A.I. γ-Interferon (Ingaron) in combination with chemotherapy in patients with matastatic skin malanoma. // 19th International Congress on Anti-Cancer Treatment. Paris, France. 2008. P.192.

3. Абрамов М.Е., Личиницер М.Р., Черноглазова Е.В., **Гуторов С.Л.**, Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г., Черткова А.И. γ-интерферон (Ингарон) в сочетании с химиотерапией при лечении метастазов меланомы кожи. // V-съезд онкологов и радиологов СНГ. Ташкент, 2008. С. 333.

4. Абрамов М.Е., **Гуторов С.Л.**, Славина Е.Г., Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Черноглазова Е.В., Ротобельская Л.Е., Личиницер М.Р. Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением Ингарона (γ-ИФН). Клинико-иммунологическое исследование. // Российский биотерапевтический журнал, 2009. №1, С. 68-75.

5. M. Abramov S.Gutorov, A.Chertkova, E.Slavina, T.Zabotina, A.Borunova, H.Bigvava, E.Shoua, Z.Kadagidze, M.Lichinitser. The influence of the combination of recombinant interferon-g (Ingaron) and chemotherapy on survival of melanoma patients. 19h International Congress on Anti-Cancer Treatment 02.2009. Paris, France.