

2. Gallamini A., Hutchings M., Rigacci L. et al. Early interim 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: A report from a joint Italian-Danish study // J. Clin. Oncol. – 2007. – 25. – P. 3746-3752.

3. Carr R., Barrington S.F., Madan B. et al. Detection of lymphoma in bone marrow by whole-body positron emission tomography // Blood. – 1998. – 91. – P. 3340-3346.

4. Мухортова О.В. Доклад, представленный на V Российской конфе-

ренции "Злокачественные лимфомы": новые возможности в диагностике и лечении. – М., 2008.

5. Jerusalem G., Beguin Y., Fassotte M.F. et al. Whole-body positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for posttreatment evaluation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging // Blood. – 1999. – 94. – P. 429-433.

6. Filmont J., Ko Yang F., Yap C. et al. Prediction of malignancy grade using 18FDG PET in Non Hodgkin's lymphoma patients: An urban legend? // J. Nucl. Med. – 2002. – Vol. 43. – P. 79.

УДК 616.5 – 006.81

Кукушкіна М.М., Коровін С.І., Палівець А.Ю.

НИЗЬКОДОЗОВИЙ ЦИКЛОФОСФАН В АД'ЮВАНТНІЙ ТЕРАПІ ІВ-ІІС СТАДІ МЕЛАНОМИ ШКІРИ

Національний інститут раку МОЗ України, м. Ки

НИЗЬКОДОЗОВИЙ ЦИКЛОФОСФАН В АД'ЮВАНТНІЙ ТЕРАПІ ІВ-ІІС СТАДІ МЕЛАНОМИ ШКІРИ – Меланома шкіри володіє різними механізмами "вислизання" з-під імунного контролю, включаючи імунологічну толерантність, велике значення в розвитку яко надається регуляторним Т-клітинам (CD4+CD25+FOXP3+Tcells). Видалення CD4+CD25+ регуляторних Т-клітин у мишей, викликає сильну протипухлинну імунну відповідь, що приводить до регресії пухлини. Доведено, що циклофосфан (ЦФ) в низьких дозах має пряму інгібуючу дію на популяцію регуляторних клітин, впливаючи не тільки на кількість клітин, але й на супресорну функцію виживших клітин. У дослідження включено 79 хворих з меланомаю шкіри ІВ-ІІС стадії, які після широкого видалення первинно пухлини, рандомізовані в досліджувану та контрольну групи в співвідношенні 1:1. Хворі досліджували групи отримували ендолімфатичну терапію: ЦФ по 100 мг/м² в 1 і 3 дні та α-2b-інтерферон по 3 млн. ОД в 5 і 7 дні з подальшою інтерферонотерапією по 3 млн. ОД тричі на тиждень п/ш впродовж 12 місяців. Хворі контрольної групи отримували α-2b-інтерферон п/ш по 3 млн. ОД тричі на тиждень 12 місяців. У хворих досліджували групи 2-річна безрецидивна виживаність склала (80,9+6,3)% порівняно з контрольною групою – (75,8+6,7)%. 2-річна загальна виживаність в досліджуваній групі склала (97,4+2,7)%, в контрольній – (91,9+4,3)%. Таким чином, ендолімфатична терапія меланоми шкіри низькодозовим циклофосфаном і α-2b-інтерфероном може бути перспективним напрямом в лікуванні даного захворювання і вимагає подальшого вивчення.

НИЗКОДОЗОВИЙ ЦИКЛОФОСФАН В АД'ЮВАНТНОЇ ТЕРАПІІ ІВ-ІІС СТАДІІ МЕЛАНОМИ КОЖИ – Меланома шкіри володіє різними механізмами "ускользання" от иммунного контроля, включая иммунологическую толерантность, большое значение в развитии которой придается регуляторным Т-клеткам (CD4+CD25+FOXP3+Tcells). Удаление CD4+CD25+ регуляторных Т-клеток у мышей, вызывает сильнейший противоопухолевый иммунный ответ, приводящий к регрессии опухоли. Доказано, что циклофосфан (ЦФ) в низких дозах оказывает прямое ингибирующее действие на популяцию регуляторных клеток, влияя не только на количество клеток, но и на супрессорную функцию выживших клеток. В исследование включено 79 больных с меланомой кожи ІВ-ІІС стадии, которые после широкого иссечения первичной опухоли, рандомизированы в исследуемую и контрольную группы в соотношении 1:1. Больные исследуемой группы получали эндолимфатическую терапию: ЦФ по 100 мг/м² в 1 и 3 дни и α-2b-интерферон по 3 млн. ЕД в 5 и 7 дни с последующей интерферонотерапией по 3 млн. ЕД 3 раза в неделю п/к на протяжении 12 месяцев. Больные контрольной группы получали α-2b-интерферон п/к по 3 млн. ЕД 3 раза в неделю 12 месяцев. У больных исследуемой группы 2-летняя безрецидивная выживаемость составила (80,9+ 6,3)% по сравнению с контрольной группой – (75,8+6,7)%. 2-летняя общая выживаемость в исследуемой группе составила (97,4+2,7)%, в контрольной – (91,9+4,3)%. Таким образом, эндолимфатическая терапия меланомы кожи низкодозовым циклофосфаном и α-2b-интерфероном может быть перспективным направлением в лечении данного заболевания и требует дальнейшего изучения.

LOW-DOSE CYCLOPHOSPHAMIDE IN TREATING PATIENTS WITH SKIN MELANOMA STAGE ІВ-ІІС – Skin melanoma is one of the most immunogenic tumors. Melanoma as other malignant tumors has the different mechanisms of "slip off" from the immune control including the immunological tolerance. A great importance is attached to the regulatory T-cells (CD4+CD25+FOXP3+Tcells) in the development of immunological tolerance. The removal of the CD4+CD25

regulatory T-cells induces the very strong antitumor immune reaction, resulting into the tumor regression. Low doses of cyclophosphamide have the direct inhibitory effect on the population of regulatory cells by affecting not only the cell number but also the suppressive function of cells survived. Investigation consisted of 79 patients with skin melanoma of ІВ-ІІС stages who after the wide dissection of primary tumor were randomized into the main group for examination and control group with ratio 1:1. Cyclophosphamide in a dose of 100 mg/m² were endolymphic injected at the 1st and the 3rd days and α-2b-interferon in a dose of 3 mln U at the 5th and the 7th days in patients of examined group. Then α-2b-interferon in a dose of 3 mln U was subcutaneously injected 3 times a week for 12 months. Patients of control group were received α-2b-interferon in a dose of 3 mln U 3 times a week for 12 months. 2-year disease-free survival rate consisted of (80,9+ 6,3)% in patients of examined group comparing to control group – (75,8+6,7)%. 2-year overall survival rate consisted of (97,4+2,7) % in patients of examined group comparing to control group – (91,9+4,3)%. Endolymphic therapy for skin melanoma with low doses of cyclophosphamide and α-2b-interferon may be the perspective direction for treating this disease and is needed in further investigations.

Ключові слова: меланома шкіри, рекомбінантний α-2b-інтерферон, низькодозовий циклофосфан, виживаність.

Ключевые слова: меланома кожи, рекомбинантный α-2b-интерферон, низкодозовый циклофосфан, выживаемость.

Key words: skin melanoma, α-2b-интерферон, low-dose cyclophosphamide, survival.

ВСТУП Відомо, що меланома шкіри є однією з найбільш агресивних онкологічних захворювань. Для не характерні короткі періоди ремісії та здатність метастазувати практично в усі органи і тканини [1].

Меланома шкіри складає 3 % від усіх злоякісних пухлин людини, але за темпами росту захворюваності посідає одне з перших місць в країнах Західно Європи, США і в Україні [2, 3]. У 2008 році в нашій країні зареєстровано 2547 випадки меланоми шкіри та 1075 смертей, а за відсотком приросту захворюваності ця нозологічна форма посіла одне з перших місць серед усіх злоякісних новоутворень [4]. Це робить актуальним розробку більш ефективних методів діагностики та лікування хворих з даною патологією.

Основним методом лікування хворих на меланомаю шкіри є хірургічний. Локальні рецидиви після видалення первинно пухлини виникають в порівняно малому відсотку випадків (2-5 %), тому головною проблемою є запобігання розвитку метастазів [5].

Наді, що були пов'язані з ад'ювантною хіміотерапією у вирішенні цього питання, не виправдалися. Використання післяопераційно системно хіміотерапії не поліпшило, а за даними ряду дослідників навіть погіршило віддалені результати лікування [6].

В той же час меланомаю шкіри викликає великий інтерес в плані використання імунотерапевтичних методів. Про іму-

ногенність меланоми свідчать динаміка розвитку пухлини (висока частота спонтанних регресій), паранеопластичні синдроми (витилигоподібна депігментація шкіри пов'язана з протипухлинною реакцією на хіміопрепарати й імунотерапією), дані патологічних досліджень (лімфо дна інфільтрація диспластичних невусів і первинно меланоми), а також серологічні і клітинні реакції при меланомі [7].

Найбільш ефективним засобом ад'ювантно імунотерапії злоякісно меланоми шкіри на сьогодні вважається рекомбінантний α -2b-інтерферон, який володіє прямою антипроліферативною дією на пухлинні клітини, пригнічує експресію онкогенів і вироблення пухлинних чинників зростання, стимулює клітинне диференціювання, підвищує активність природних клітин-кілерів, макрофагів, Т-лімфоцитів, а також бере участь в пригніченні ангіогенезу [8]. Його ефективність (підвищення безрецидивно виживаності та помірне підвищення загальної виживаності) доведена рандомізованими дослідженнями при застосуванні у хворих меланою шкіри ІІВ-ІІІ стадій [9].

Слід зазначити, що меланома разом з іншими злоякісними пухлинами володіє різними механізмами "визливання" з-під імунного контролю, включаючи імунологічну толерантність, велике значення в розвитку яко надається регуляторним Т-клітинам [10]. Велика кількість цих клітин формується в ході імунної відповіді і позначається як адаптивні регуляторні Т-клітини [11]. Природні регуляторні Т-клітини були описані в 1995 році S.Sakagushi, який довів, що CD4+CD25+Т-лімфоцити запобігають аутоімунним захворюванням у мишей [12]. На відміну від адаптивних природні регуляторні Т-клітини формуються в процесі нормального диференціювання в тимусі, а не під впливом антигенно стимуляції. Виявилось, що ці клітини перешкоджають розвитку аутоімунних процесів і реакції організму матері на антигени плода і в той же час перешкоджають розвитку повноцінного протипухлинного імунітету. У експериментах на тваринах було показано, що збільшення пухлинного навантаження асоціюється з різким збільшенням кількості Т-регуляторних клітин, а видалення CD4+CD25+Т-лімфоцитів підсилює протипухлинну імун-

ну відповідь [13]. У людини підвищений вміст CD4+CD25+ регуляторних Т-клітин визначається у хворих на злоякісну меланому, ходжкінську лімфому, рак яєчника, шлунку, молочно та підшлунково залози [14].

Одним із шляхів впливу на Т-регуляторні клітини є використання циклофосфану, який у високій дозі проявляє імуносупресивні властивості, а в низькій – імуномодельюючі [15]. У 2004 році F.Ghirginelli продемонстрував, що низькодозовий ЦФ істотно зменшує кількість CD4+CD25+ регуляторних Т-клітин у щурів з пухлинами і викликає сильну протипухлинну імунну відповідь, що приводить до регресії пухлини [16]. У експериментах на тваринах показано, що ЦФ має пряму інгібуючу дію на популяцію регуляторних клітин, впливаючи не тільки на кількість клітин, але й на супресорну функцію виживших клітин, шляхом ді на молекули, що беруть участь в передачі сигналу або регуляторно функції (Foxp3) [17]. Слід відзначити, що ефективність ді циклофосфану залежить не тільки від дози, але й від шляхів введення. Так, при локальному введенні низьких доз деривату ЦФ Z-7557 відмічено збільшення в дренажних лімфатичних вузлах кількості В- і Т-клітин поряд із селективним виснаженням Tregs і активацією дендритних клітин [18].

Враховуючи вищесказане, нам представилося доцільним доповнити схему ад'ювантно інтерферонотерапії хворих на ІВ-ІІС стадію меланоми шкіри ендолімфатичним введенням низькодозового циклофосфану з метою поліпшення результатів лікування (підвищення загальної та безрецидивно виживаності), а також оцінити кількісний характер змін в популяціях Т-лімфоцитів з урахуванням регуляторних Т-клітин при застосуванні комбінованого хіміоімунотерапевтичного лікування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ У дослідження включено 79 хворих на меланому шкіри ІВ-ІІС стадії (Т1вN0M0-T4вN0M0, за класифікацією AJCC 2002 року), яких після широкого видалення первинно пухлини та гістологічного підтвердження діагнозу розділено в дослідну та контрольну групи. Характеристика хворих за статтю, віком, локалізацією первинно пухлини та стадією захворювання представлена в таблиці 1.

Таблиця 1. Характеристика хворих

Характеристика		Дослідна група	Контрольна група
Стать	Чоловіки	18 (46,2%)	15 (37,5%)
	Жінки	21 (53,8%)	25 (62,5%)
Вік	18-30 років	4 (10,3%)	6 (15,0%)
	31-50 років	20 (51,3%)	17 (42,5%)
	> 50 років	15 (38,4%)	17 (42,5%)
Локалізація	Кінцівки	23 (58,9%)	26 (65,0%)
	Тулуб	16 (41,1%)	14 (35,0%)
Стадія	ІВ	7 (17,9%)	5 (12,5%)
	ІІА	12 (30,8%)	10 (25,0%)
	ІІВ	9 (23,1%)	16 (40,0%)
	ІІС	11 (28,2%)	9 (22,5%)

В дослідну групу увійшло 39 хворих. Методика лікування полягала в наступному. На 8-9 день після операції під місцевою анестезією виконувалась катетеризація лімфатично судини кінцівки, де була розташована первинна пухлина. В разі локалізації пухлини на тулубі катетеризувалась судина кінцівки з найближче розташованим регіонарним лімфоколектором. В катетер перистальтичним насосом в перший та третій дні вводилося 200 мг циклофосфану, розчиненого в 20,0 мл фізіологічного розчину (швидкість 0,2 мл/хв) На п'ятий та сьомий день вводилося по 6x10⁶ОД рекомбінантного α -2b-інтерферону, розчиненого в 20,0 мл фізіологічного розчину, зі швидкістю 0,2 мл/хв. Після останнього, четвертого введення катетер вилучався, і в подальшому хворий отримував інтерферон підшкірно по 3x10⁶ОД, розведених в 1,0 мл води для

ін'єкцій, тричі на тиждень протягом наступних 12 місяців.

В контрольну групу увійшло 40 хворих, які з 8-9 дня після операції отримували α -2b-інтерферон підшкірно по 3x10⁶ОД тричі на тиждень 12 місяців.

Для визначення імунного фенотипу лімфоцитів периферично крові використовувався метод проточно цитофлуориметрії. Кількість регуляторних клітин визначали в периферичній крові до операції, через 1 тиждень після операції та після завершення ендолімфатично терапії. Були використані наступні антитіла, мічені флюорохромом: анти-CD3 -CD4, -CD25 and -FoxP3.

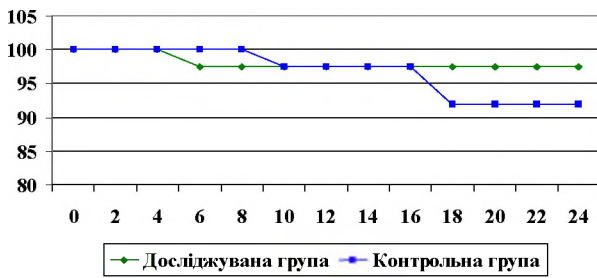
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ Під час лікування в обох групах мали місце типові для інтерферонотерапії ускладнення: підвищення температури тіла, озноб, міалгія, загальна слабкість. Ці явища відміча-

лися на початку лікування у 100 % хворих та знімалися прийомом нестероїдних протизапальних препаратів. У 3 (7,7 %) хворих дослідно групи та у 2 (5 %) хворих контрольно мали місце анемія та лейкопенія I-II ступеня, які не вимагали переривання лікування. Слід зазначити, що в усіх випадках гематологічні ускладнення відмічалися у хворих старше 60 років.

В обох групах вивчалася 2-річна безрецидивна та за-

гальна виживаність (графіки 1,2). У хворих дослідно групи 2-річна безрецидивна виживаність склала (80,9+6,3) % порівняно з контрольною групою – (75,8+6,7) %, при чому різниця починається з 22 місяця спостереження. 2-річна загальна виживаність в досліджуваній групі склала (97,4+2,7) %, в контрольній – (91,9+4,3) %. Покращання результатів виживаності простежується починаючи з 16 місяця. Однак ці результати не є достовірними ($p > 0,05$).

2-річна загальна виживаність



Графік 1.

Відносно кількості регуляторних клітин слід відзначити наступне. Після висічення первинно пухлини, кількість CD4+FOXP3+ Т-клітин значно знижувалася порівняно з х кількістю до операції. Кількість CD4+CD25+FOXP3+ Т-клітин також зменшувалася після хірургічного втручання. Ендолімфатичне введення циклофосфану та α -2b-інтерферону призводило до подальшого зменшення кількості CD4+FOXP3+ та CD4+CD25+FOXP3+ Т-клітин. Кількість CD4+клітин достовірно підвищувалась. В той же час кількість CD4+CD25+FOXP3- і CD4+CD25- FOXP3+ Т-клітин не змінювалась після проведено терапі.

ВИСНОВКИ Використання ендолімфатично терапі низькодозовим циклофосфаном призводить до тенденції покращання 2-річних результатів лікування хворих на меланому шкіри ІВ-ІІС стадії. Вона задовільно переноситься пацієнтами, не супроводжується ускладненнями і може розглядатися як перспективний напрямок в лікуванні даного захворювання. Остаточні висновки будуть зроблені після ретроспективного аналізу дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вагнер Р.И., Анисимов В.В., Барчук А.С. Меланома кожи. В 2-х томах. – С.Пб., Наука, 1995. – 432 с.
2. De Vita V., Hellmann S., Rosenberg. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th Edition // Published by Lippincott Williams & Wilkins (Copyright), 2001.
3. Коровин С.И., Гулак Л.О., Толстопятов Б.А. Заболеваемость меланомой кожи в Украине. Онкология. – 2006. – 6(1). – С. 18-21.
4. Щепотін І.Б., Гайсенко А.В., Федоренко З.П., Гулак Л.О. Бюлетень національного канцер-реєстру Укра ни № 10. – Ки в. – 2009. – 104 с.

2-річна безрецидивна виживаність



Графік 2.

5. Демидов Л.В., Алиев М.Д., Мартынова Е.В. Прогностические факторы в оценке первичной меланомы кожи и их значение для выбора оперативного вмешательства. VIII Российский онкологический конгресс. – Москва, 22-24 ноября 2004 г.
6. Барчук А.С. Хирургическое лечение меланом // Практическая онкология. – 2001. – 4(8). – С. 30-36.
7. Биологические методы лечения онкологических заболеваний. – Москва: Медицина, 2002. – С. 403-429.
8. Ворноцова А.Л., Кудрявец Е.И., Жильчук В.Е. Интерфероны и их применение в клинической онкологии // Здоровье женщины. – 2003. – 4(16). – С. 8-12.
9. Kirkwood J.M., Manolaj., Ibrahim J. Clinical Cancer Research. – 2004. – Vol. 10. – P. 1670-1677.
10. Ярилин А.А. Естественные регуляторные клетки. Российский медицинский журнал 2007. – (1). – P. 43-48.
11. Ghiringhelli F. et al. (c) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. Eur. J. Im-munol. – 2004. – 34. – P. 336-344.
12. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. J. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor β -chains (CD25). Immunology. 1995. – Vol. 155. – P. 1151-1164.
13. Lutsiak M., Semmani R., Pascalis R. Inhibition of CD4+CD25+T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. Blood 2005. – Vol. 105 (7). – P. 2862-2868.
14. Taieb J., Chaput N., Scharz N. et al. Chemoimmunotherapy of Tumors: Cyclophosphamide Synergizes with Exosome Based Vaccines. The Journal of Immunology. – 2006, 176. – P. 2722-2729.
15. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saiton O. Different mechanisms for antitumor effects of low- and high- dose cyclophosphamide. Oncology Reports 2006. – Vol. 16. – P. 141-146.
16. Limpens J. et al. Alterations in dendritic cell phenotype and function associated with immunoenhancing effects of a subcutaneously administered cyclophosphamide derivate. Immunology. – 1991. – 73. – P. 255-263.