

ADJUVANT IMMUNOTHERAPY OF STAGE II MELANOMA PATIENTS WITH LOW DOSE OF RGM-CSF: DYNAMICS OF IMMUNOLOGICAL AND HEMATOLOGICAL VALUES

*L. V. Demidov, G. Y. Harkevich, I. V. Timofeev
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*

ABSTRACT

We evaluated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in adjuvant postoperative setting, its drug toxicity, and the dynamics of the immunological and hematological values in patients with skin melanoma. Thirty patients with stage of skin melanoma ($pT_4N_0M_0$) were treated with low-doses of GM-CSF for 1 year after surgical resection of the primary one. The GM-CSF (Leukomax™) was administered subcutaneously three days per week (1 mkg/kg). The patients were evaluated for toxicity, time to progression, overall survival and immune system activity. Despite the fact that both groups developed regional and distant metastasis, the survival of the study group patients was higher. The immunological and hematological values reflected involving of specific antitumor immune response.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ МЕТАСТАЗОВ МЕЛАНОМЫ КОЖИ РЕКОМБИНАНТНЫМ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ИССЕЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ: ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

*Л.В. Демидов, Г.Ю. Харкевич, И.В. Тимофеев
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН*

РЕЗЮМЕ

В работе проведена оценка применения гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в качестве адъювантной иммунотерапии у больных с хирургически излеченной меланомой кожи II стадии, а также токсичность длительного применения малых доз ГМ-КСФ, динамику иммунологических и гематологических показателей. В исследование включено 30 пациентов, которым подкожно в дозе 1 мкг/кг веса после хирургического иссечения первичной опухоли ($pT_4N_0M_0$) вводился ГМ-КСФ (Лейкомакс™) 3 раза в неделю на протяжении 1 года. Несмотря на недостоверное различие в частоте прогрессирования болезни у пациентов контрольной и лечебной групп, выживаемость больных лечебной группы была выше. Иммунологические и гематологические показатели свидетельствуют об активации специфического звена иммунного ответа в рамках противоопухолевого иммунитета у пациентов, получавших ГМ-КСФ. Переносимость длительного применения малых доз ГМ-КСФ - удовлетворительная.

Введение. Меланома - злокачественная пигментная опухоль, относительно хорошо реагирующая на иммунотерапию, поэтому в настоящее время все чаще для лечения меланомы используется интерферон- $\alpha 2$ и интерлейкин-2.

К сожалению, рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) в терапии меланомы не нашел широкого распространения. Между тем, ГМ-КСФ является мощным биологическим модификатором иммунного ответа при злокачественных заболеваниях. Главная функция ГМ-КСФ - усиление пролиферации предшественников гранулоцитов, макрофагов и их активности. Так,

исследования *in vitro* показывают, что моноциты периферической крови, культивируемые в среде с ГМ-КСФ, становятся цитотоксическими по отношению к клеткам человеческой меланомы. Важнейшим свойством ГМ-КСФ является медиаторное воздействие на пролиферацию, созревание и миграцию дендритных клеток, в результате чего антигенпрезентирующая способность последних возрастает, соответственно, усиливается индукция первичного и вторичного Т-клеточного иммунного ответа. Использование ГМ-КСФ в адъювантной терапии меланомы по классификации S. Rosenberg относится к методам активной неспецифической биотерапии опухолей.

Эффективность применения ГМ-КСФ как адъювантного агента в комбинированном лечении меланомы оценена в нескольких мультицентровых исследованиях. Так, в одном из них, пациенты с меланомой III-IV стадий после хирургического лечения получали ГМ-КСФ подкожно, в дозе 125 (мкг/м², ежедневно, в течение 14 дней с 14-ти дневным перерывом на протяжении года. Контрольная группа больных не получала ГМ-КСФ. Только у двух больных отмечена эритема на месте введения препарата, как побочный эффект. Медиана выживаемости лечебной группы составила 37,5 месяцев, контрольной - 12,2 месяца (Lynn E. Spittler).

Каковы иммунологические механизмы действия ГМ-КСФ в таких группах, обеспечивающие пролонгирование выживаемости больных меланомой?

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики иммунологических и гематологических показателей больных меланомой IIa и IIb стадий на фоне адъювантной иммунотерапии ГМ-КСФ; оценка результатов иммунотерапии ГМ-КСФ по частоте метастазирования и прогрессирования меланомы, а также оценка выраженности побочных реакций и качества жизни больных на фоне проводимой иммунотерапии ГМ-КСФ.

Материалы и методы. В исследование было включено 15 больных меланомой кожи с хирургически излеченной первичной опухолью в стадии pT₄N₀M₀ (за исключением двух больных со стадией pT₃N₀M₀), получавших в послеоперационном периоде рекомбинантный ГМ-КСФ (ЛейкомаксTM - подкожно, в дозе 1 мкг/кг веса, 3 раза в неделю на протяжении 1 года), и 15 больных контрольной группы, не получающих ГМ-КСФ после иссечения первичной опухоли в РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина.

Критериями отбора больных были: 1) уровень инвазии первичной опухоли по Clark $\geq$ III 2) толщина опухоли по Breslow $\geq$ 4 мм; 3) локализация первичного очага на коже туловища и конечностей; 4) отсут-

ствие метастазов; 5) отсутствие специфического противоопухолевого лечения в анамнезе; 6) возраст больных до 65 лет; 7) отсутствие сердечно-сосудистой патологии и аллергических реакций в анамнезе. Контрольная группа больных была составлена по принципу подбора пар, схожих с больными лечебной группы по полу и порядку толщины опухоли.

Соотношение мужчин и женщин в обеих группах было одинаковым - 5:10. Средний возраст больных лечебной группы - 41,2 лет, в контрольной - 47,1 лет.

В лечебной группе меланомы локализовалась на туловище у 11 больных и на конечностях - у 4 больных. В группе контроля первичный очаг опухоли располагался на туловище у 8 больных и на конечностях - у 7 больных.

В послеоперационном периоде после заживления операционной раны начинался курс иммунотерапии ГМ-КСФ по указанной схеме.

В течение первого месяца лечения больные обследовались 1 раз в неделю. Обследование включало в себя общий осмотр, измерение артериального давления, частоты сердечно-сосудистых сокращений и дыхания, а также общий и биохимический анализы крови. При оценке побочных эффектов использовались рекомендации ВОЗ и Международного противоракового союза.

В последующие 11 месяцев больные проходили обследование 1 раз в месяц. Флюорография легких и УЗИ зон регионарного метастазирования производились 1 раз в 3 месяца.

Иммунологический статус до лечения, в процессе и после терапии оценивался на основании количественного определения популяций, субпопуляций и фракций Т-лимфоцитов с использованием реакции непрямой иммунофлюоресценции, цитофлюорометрия (Fascan). В работе использованы моноклональные антитела серии ИКО, полученные в лаборатории клинической иммунологии РОНЦ.

Статистическая обработка цифровых данных про-

Таблица 1

Динамика показателей иммунитета больных в процессе иммунотерапии ГМ-КСФ

Антигены лимфоцитов	Доноры		До лечения		Лечебная группа в процессе терапии ГМ-КСФ (по месяцам)	
	n=20	n=15	2 месяца n=13	3 месяца n=3	6 месяцев n=10	12 месяцев n=9
	% $\pm$ m	% $\pm$ m	% $\pm$ m	% $\pm$ m	% $\pm$ m	% $\pm$ m
CD3	67.0 $\pm$ 2.4	63.1 $\pm$ 4.5	55.7 $\pm$ 8.1	61.0 $\pm$ 7.5	61.2 $\pm$ 5.4	61.5 $\pm$ 5.5
CD5	65.0 $\pm$ 2.0	64.6 $\pm$ 7.5	60.8 $\pm$ 4.4	59.2 $\pm$ 5.0	53.6 $\pm$ 9.6	49.6 $\pm$ 5.3
CD7	67.0 $\pm$ 2.6	71.3 $\pm$ 0.2	58.2 $\pm$ 9.9	61.1 $\pm$ 4.0	71.4 $\pm$ 5.7	78.3 $\pm$ 0.0
CD4	38.9 $\pm$ 1.5	30.8 $\pm$ 3.7	38.1 $\pm$ 5.6	42.7 $\pm$ 9.0	34.6 $\pm$ 3.8	32.5 $\pm$ 5.1
CD8	28.0 $\pm$ 1.8	32.7 $\pm$ 3.7	29.4 $\pm$ 6.9	29.9 $\pm$ 5.3	22.4 $\pm$ 4.8	21.4 $\pm$ 4.6
NK	16.6 $\pm$ 1.1	29.3 $\pm$ 1.4	12.2 $\pm$ 6.7	11.7 $\pm$ 2.1	12.4 $\pm$ 4.7	12.1 $\pm$ 9.1
HLA I	94.0 $\pm$ 1.3	87.8 $\pm$ 3.5	93.4 $\pm$ 8.9	89.3 $\pm$ 9.8	91.7 $\pm$ 1.3	92.8 $\pm$ 4.1
CD22	5.6 $\pm$ 2.3	2.3 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 2.1	4.6 $\pm$ 1.6	3.1 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 1.4
CD45	95.0 $\pm$ 3.1	86.4 $\pm$ 3.5	87.7 $\pm$ 8.5	95.7 $\pm$ 4.2	94.5 $\pm$ 1.1	91.4 $\pm$ 6.3
CD45RA	56.0 $\pm$ 4.9	54.4 $\pm$ 6.2	43.9 $\pm$ 6.9	65.2 $\pm$ 5.2	28.8 $\pm$ 6.5	29.8 $\pm$ 2.2
CD38	38.0 $\pm$ 3.1	20.2 $\pm$ 4.0	27.7 $\pm$ 3.2	29.8 $\pm$ 7.6	30.9 $\pm$ 2.5	32.1 $\pm$ 5.1
CD71	6.0 $\pm$ 2.0	5.0 $\pm$ 3.9	2.8 $\pm$ 1.8	6.1 $\pm$ 2.6	1.4 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 2.3
CD25	3.0 $\pm$ 1.5	5.0 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 2.6	4.9 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 2.4	2.6 $\pm$ 1.6

Таблица 2

Динамика гематологических показателей в первый месяц лечения ГМ-КСФ

Формула крови	Норма	До лечения n=15	1 неделя n=13	2 неделя n=13	3 неделя n=13	4 неделя n=13
		% ± m	% ± m	% ± m	% ± m	% ± m
лейкоциты	4,0-8,8×10 ⁹	6.7±0.3	10.7±1.3	14.0±1.8	13.1±1.5	12.9±1.5
нейтрофилы	45 – 70	60.2±2.8	59.0±2.0	65.5±2.2	63.0±2.1	66.0±2.3
палочки	1 – 5	4.3±0.6	10.1±1.6	11.2±1.8	9.1±1.5	8.0±1.0
лимфоциты	20 – 40	27.0±2.2	18.9±2.1	12.2±1.7	14.7±2.6	15.2±2.4
моноциты	2 – 10	6.1±0.8	8.5±1.1	4.9±0.6	5.3±0.9	5.3±0.9
эозинофилы	0 – 5	2.2±0.4	2.8±0.6	5.5±1.2	6.5±0.8	4.8±1.0
базофилы	0 – 1	0.3±0.2	0.2±0.1	0.0±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1

водилась с помощью специализированного компьютерного пакета программ «Аста» и «STATISTICA».

Результаты и обсуждение. В иммунном статусе 15 больных лечебной группы на протяжении иммунотерапии ГМ-КСФ был выявлен ряд изменений (табл. 1).

В исходном иммунном статусе больных лечебной группы регистрируется увеличение количества НК-клеток по сравнению со здоровыми донорами. Наблюдается достоверное снижение количества НК-клеток в процессе лечения в сравнении с показателями тех же больных до лечения ($t \geq 2$, $p \leq 0,05$) и группой доноров ($t \geq 2$, $p \leq 0,05$).

Кроме того, при статистической обработке полученных данных выявлена сильная отрицательная корреляционная взаимосвязь между значениями НК-клеток и молекул HLA I типа ($r = -0,74$; $p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что снижение НК-клеток в процессе лечения гранулоцитарно-макрофагальным колонизирующим фактором сопровождается повышением уровня молекул HLA I типа.

На фоне незначительного снижения CD3+, CD5+, CD7+лимфоцитов происходила нормализация показателей Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических лимфоцитов (CD8+). Также получена корреляционная зависимость между НК-клетками и CD4, CD8 - лимфоцитами ($r = -0,6$ и $r = -0,58$ соответственно; $p < 0,05$). Увеличение Т-лимфоцитов (особенно CD4+) отмечается при снижении НК-клеток в процессе иммунотерапии.

Между тем, выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь CD4, CD8 и молекул HLA I ($r = -0,6$, $r = -0,65$ соответственно; $p < 0,05$).

Показатели В-лимфоцитов и их предшественников (CD22+), а также цитотоксических клеток (CD38+) возросли по сравнению с исходным уровнем. Эти изме-

нения сохранялись на протяжении 3-6 месяцев лечения, а к 12 месяцу терапии происходит их нормализация. Существует корреляция CD38+ с НК-клетками ($r = -0,94$) и HLA I ($r = 0,68$).

Остальные показатели иммунного статуса статистически не различимы.

Кроме иммунологических, нами были изучены гематологические показатели в процессе профилактического лечения больных. Они оценивались в течение первого месяца лечения еженедельно (табл. 2), а в последующем 1 раз в 3 месяца (табл. 3).

Несмотря на использование малых доз ГМ-КСФ, отмечается умеренный лейкоцитоз уже к концу первой недели. Выявлено статистически значимое увеличение лейкоцитов с начала лечения и в течение первого месяца ($p < 0,05$).

Количество моноциты на протяжении трех недель лечения остаются в пределах нормы.

Обращает внимание развитие лимфопении у больных на фоне иммунопрофилактики ГМ-КСФ. Снижение количества лимфоцитов за 3 недели достоверно ($p < 0,05$), но уже с четвертой недели это количество начинает увеличиваться. Прослеживается достоверное ($t = 2,66$; $p < 0,05$) увеличение уровня моноцитов в процессе применения ГМ-КСФ в течение 12 месяцев.

В то же время выявлена корреляционная зависимость моноцитов от HLA I: увеличение молекул HLA I типа сопровождается увеличением моноцитов ($r = 0,34$; $p < 0,05$). Как уже говорилось, наблюдается резкое снижение относительного количества лимфоцитов в первые три недели применения ГМ-КСФ (с 27,0% до 12,2%), которое сменяется в дальнейшем достоверным ($t = 2,29$; $p < 0,05$) повышением относительного количества лимфоцитов (14,7% - 28,6%). В динамике других

Таблица 3

Динамика гематологических показателей в процессе всего курса лечения ГМ-КСФ

Формула крови	До лечения	3 месяца лечения n=13	6 месяцев лечения n=10	9 месяцев лечения n=9	12 месяцев лечения n=9
	% ± m	% ± m	% ± m	% ± m	% ± m
лейкоциты	6.7±0.3	9.9±1.0	7.0±1.0	11.4±1.7	6.9±0.5
нейтрофилы	60.2±2.8	62.2±2.4	56.7±3.1	49.2±3.4	55.7±1.4
палочки	4.3±0.6	7.4±1.1	6.4±1.4	11.4±2.5	4.8±0.5
лимфоциты	27.0±2.2	20.8±3.4	26.2±3.1	24.8±3.2	28.6±1.4
моноциты	6.1±0.8	4.0±0.6	4.9±0.5	5.7±0.8	7.1±1.0
эозинофилы	2.2±0.4	6.8±1.6	4.1±1.0	12.5±2.7	3.8±0.9
базофилы	0.3±0.2	0.3±0.2	0.0±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1

Таблица 4

Трехлетняя частота метастазирования и летальных исходов у больных после иммунопрофилактики ГМ-КСФ и без нее

Статус больных	Лечебная группа		Контрольная группа	
	N	%	n	%
соответствовали протоколу	13	100	15	100
с метастазами	6	46.2	7	46.6
смерть от прогрессирования	2	15.4	5	33.3
живы с метастазами	4	30.8	2	13.3
без метастазов	7	53.8	8	53.3

форменных элементов крови какой-либо закономерности выявить не удалось.

Непосредственные результаты иммунопрофилактики с помощью ГМ-КСФ оценивались по частоте выявляемости метастазов у больных лечебной группы в сравнении с контрольной группой.

Из 15 больных профилактическая иммунотерапия ГМ-КСФ была полностью проведена у девяти больных, что составило 60%. Лечение не завершено у остальных шести больных по разным причинам. Один больной был исключен из исследования из-за сердечно-сосудистых осложнений. У четырех больных в процессе лечения выявлены метастазы (у трех - метастазы обнаруживались в регионарных лимфатических узлах (после прерывания лечения этим больным выполнялась стандартная лимфаденэктомия), у одного пациента диагностирован генерализованный метастатический процесс с развитием летального исхода через 3 месяца). Из-за нарушения графика введения препарата из состава лечебной группы исключена одна больная.

Частота метастазирования представлена в таблице 4. После окончания двенадцатимесячного курса ГМ-КСФ у 2 из 9 полностью пролеченных больных возникли метастазы. В одном случае - солитарный подкожный метастаз в мягкие ткани через 5 месяцев после операции; в другом - регионарные метастазы в лимфатические узлы через 18 месяцев. Оба больных были оперированы и находятся в настоящее время без признаков болезни. Таким образом, в период от 30 до 42 месяцев с момента удаления первичной опухоли 7 больных, закончивших лечение в полном объеме, не имеют признаков болезни (53,8%). У шести больных срок появления метастазов варьировал от 3 до 36 месяцев. Два из них погибли от прогрессирования, четыре - живы с метастазами. В контрольной группе из 15 больных к настоящему моменту зарегистрировано появление метастазов у семи больных, пять из которых умерли от прогрессирования болезни.

Достоверных различий при сравнении полученных результатов не отмечено, но прослеживается тенденция более длительной выживаемости в лечебной группе.

При оценке переносимости малых доз ГМ-КСФ учитывался факт появления приступов стенокардии и бронхоспазма у больных, а также некоторых менее грозных побочных эффектов.

Частота основных побочных симптомов, выявленных при иммунотерапии ГМ-КСФ, представлена в таблице 5. За исключением одного случая стенокардии выраженной степени тяжести все остальные побочные явления были 1-2 степени тяжести и не требовали отмены или коррекции доз препарата.

Кроме описанных выше симптомов, у четырех больных наблюдалось увеличение размеров лимфатических узлов, которые могли быть регионарными по отношению к локализации первичного очага опухоли, но проведенная биопсия с гистологическим исследованием выявила только их гиперплазию без очагов атипии.

Выводы. Повышение NK-клеток у больных меланомой почти в два раза в исходном иммунном статусе можно объяснить реакцией неспецифического иммунологического звена на опухоль. Это подтверждается сниженным уровнем лимфоцитов различных CD-популяций, в том числе цитотоксических. Уровень молекул HLA I класса также исходно снижен, что, очевидно, и является определяющим пусковым фактором к повышению NK-клеток и запуску неспецифического иммунного ответа.

После применения ГМ-КСФ количество NK-клеток уменьшается и становится ниже нормы. Уровень лимфоцитов, в т.ч. активированных, и молекул HLA I класса возрастает, коррелируя со снижением NK-клеток. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о переходе с неспецифического механизма иммунологического звена противоопухолевой защиты на спе-

Таблица 5

Побочные симптомы на фоне длительной иммунотерапии ГМ-КСФ в малых дозах

Симптомы	Количество больных	%
Повышение температуры	7	46,7
Гриппоподобный синдром	14	93,3
Эритема	6	40,0
Повышение печеночных ферментов	2	13,3
Повышение креатинина в сыворотке крови	1	6,7
Стенокардия	1	6,7
Бронхоспазмы	0	0

цифический, более «качественный», механизм иммунологического противоопухолевого надзора организма в результате применения в течение года малых доз ГМ-КСФ. Увеличение числа моноцитов (предшественников антигенпрезентирующих клеток) подтверждает предположение о необходимости применения ГМ-КСФ в качестве иммунного адъюванта, запускающего каскад специфических иммунных реакций. Повышение относительного числа моноцитов происходит в пределах границ нормы. Гиперплазия регионарных периферических лимфатических узлов после применения ГМ-КСФ также может быть проявлением специфической стимуляции иммунной системы.

Несмотря на то, что частота метастазирования в группе контроля и лечебной группе - приблизительно одинаковая, смерть от прогрессирования регистрировалась чаще в группе контроля. Общее же количество больных без признаков болезни выше в лечебной группе.

Соответственно, клинически также отмечена эффективность применения ГМ-КСФ при удовлетворительной переносимости малых доз ГМ-КСФ в течение 12 месяцев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здоровье мира в конце второго тысячелетия. Отчет Всемирной Организации Здравоохранения за 2000 год // Медицинская картотека, 2000, 37, № 6, С. 4-10.
2. Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Роль (2а-интерферона в профилактике метастазов у больных с локальной меланомой кожи (IIA-IIВ), также с регионарными метастазами (III стадия) // Клиническая онкология, 1999, 1, № 1, С. 28-30.
3. Grabstein KH, Urdal DL, Tushinski RJ et al. Induction of tumoricidal activity by granulocyte macrophage colony stimulating factor // Science, 1992, 232, P. 506-508.
4. Kleinerman ES, Knowles RD, Lachman L et al. Effect of recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor on human monocyte activity in vitro and following intravenous administration // Cancer Res, 1990, 48, P. 2604-2609.
5. Masucci G, Wersall P, Ragnhammer P, Mellstedt H. Granulocyte macrophage colony stimulating factor augments cytotoxic capacity of lymphocytes and monocytes in antibody dependent cellular cytotoxicity // Cancer Immunol Immunother, 1989, 29, P. 288-292.
6. Lynn E. Spittler. Adjuvant Therapy of Stage III and IV Malignant Melanoma Using Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor // Clin Oncol, 2001, 18, P. 1614-1621.
7. Rosenberg S. Principles and practice of the biologic therapy of cancer. Third edition. Ibid, 2000