

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ

КУКУШКІНА СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА

УДК 616.5–006.81–085.37–037:612.017.1

**ІМУНОЛОГІЧНІ КРИТЕРІЇ ПРОГНОЗУ ЕФЕКТИВНОСТІ
ІНТЕРФЕРОНОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ**

14.01.07 – онкологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному інституті раку

Науковий керівник доктор медичних наук
Фільчаков Феодосій Вікторович,
Національний інститут раку,
завідувач науково-дослідної лабораторії
клінічної імунології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Абраменко Ірина Вікторівна,
ДУ «Національний науковий центр
радіаційної медицини НАМН України»,
головний науковий співробітник лабораторії
молекулярної біології відділу клінічної імунології

доктор медичних наук, професор
Лукач Ервін Венцелович,
ДУ «Інститут отоларингології
імені проф. О.С. Коломійченка НАМН України»,
завідувач відділу онкопатології ЛОР-органів

Захист відбудеться « 6 » червня 2018 року о 13 годині
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.560.01
в Національному інституті раку (03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці
Національного інституту раку (03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43).

Автореферат розісланий « 25 » квітня 2018 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

С.О. Родзаєвський

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Меланома шкіри (МШ) посідає одне з перших місць за темпами зростання захворюваності в багатьох країнах світу (Erdmann F. et al., 2013; Garbe C. et al., 2016). В Україні показник захворюваності на МШ в 2015 р. склав 7,7 на 100 тис. населення порівняно з 4,9 на 100 тис. населення у 2002 р. (Федоренко З.П. та співавт., 2004; 2017). МШ обумовлює 65–80 % випадків смерті від злоякісних новоутворень шкіри (Коровін С.І. та співавт., 2010; Пак М.Б. и соавт., 2016; Титов К.С. и соавт., 2017). За даними Національного канцер-реєстру, протягом року в Україні помирає 10,9 % хворих, яким вперше встановлено діагноз МШ (Федоренко З.П. та співавт., 2017).

Основним методом лікування хворих на МШ є хірургічний (Miller K.D. et al., 2016), який у пацієнтів з первинною МШ дає стійкевилікування в діапазоні від 90 до 40 % (Демидов Л.В. и соавт., 2012). Місцеве рецидивування після висічення МШ розвивається у невеликій кількості випадків (1,0–2,6 % при товщині пухлини за Breslow менше 2,0 мм), тому основним напрямом підвищення ефективності лікування хворих на МШ є запобігання розвитку регіонарних та віддалених метастазів (Коровін С.І. та співавт., 2010; Демидов Л.В. и соавт., 2012).

Стандартом ад'ювантної терапії хворих на МШ з високим ризиком прогресування захворювання є інтерферонотерапія (ІФН-терапія) (Коровін С.І. та співавт., 2012; Семенова А.И., 2012; Di Trollo R. et al., 2015). Незважаючи на більш ніж 30-річний досвід використання інтерферону альфа (ІФН- α) в онкологічній практиці (Gnjatic S. et al., 2017), питання його застосування у всіх хворих цієї категорії залишається відкритим (McArthur G.A., 2014; Di Trollo R. et al., 2015; Ives N.J. et al., 2017; Trinh V.A. et al., 2017). Це пов'язано з суперечливими результатами рандомізованих контрольованих досліджень терапевтичної ефективності ІФН- α у хворих на МШ щодо покращення безрецидивної та загальної виживаності (Garbe C. et al., 2008; Tarhini A.A. et al., 2012; Ascierto P.A. et al., 2014). Крім того, висока ефективність ад'ювантної ІФН-терапії спостерігається лише у частини хворих на МШ (Семенова А.И., 2012; Eggermont A.M. et al., 2012), зокрема у тих, у яких первинна пухлина має поверхневе вираження (Ives N.J. et al., 2017).

З метою покращення ефективності ІФН-терапії у онкологічних хворих вивчається можливість застосування ІФН- α в комбінації з основними методами протипухлинного лікування (Barker C.A. et al., 2014; Karagöz B. et al., 2015; Lucarini V. et al., 2017), таргетними препаратами (Sabbatino F. et al., 2016) та іншими імунотерапевтичними засобами (Tarhini A.A. et al., 2012).

Одним з можливих шляхів підвищення ефективності терапії, в тому числі імунотерапії, хворих на злоякісні новоутворення є персоніфікація лікування з урахуванням прогностичних факторів, зокрема імунологічних (Fox V.A. et al., 2011; Weinstein D. et al., 2014; Stroncek D.F. et al., 2017). Але відсутність єдиної методології оцінки імунного статусу пацієнтів та консенсусу щодо потенційних імунологічних прогностичних факторів, а також суто технічні моменти їх

визначення (тривалість, висока вартість методу) обмежують практичне застосування таких біомаркерів (Fox V.A. et al., 2011; Малышевская Н.П. и соавт., 2014; Gnjatic S. et al., 2017).

Таким чином, ІФН-терапія продовжує викликати як науковий, так і практичний інтерес. Різні погляди на цю проблему пов'язують з емпіричним призначенням ІФН-терапії усім хворим без достатнього обґрунтування, і, певно, з цієї причини застосування імунотерапії не дає бажаних результатів. Тому визначення імунологічних критеріїв ефективності ІФН-терапії хворих на МШ для відбору пацієнтів, які отримають найбільшу користь від комбінованого лікування, є перспективним напрямом дослідження та може стати підґрунтям для розробки більш ефективних методів лікування цієї категорії хворих.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана за планами науково-дослідних робіт Національного інституту раку «Дослідити особливості біологічної відповіді організму в динаміці інтерферонотерапії у хворих на меланому шкіри та визначити імунологічні критерії ефективності комбінованого лікування» (номер держреєстрації 0110U002207; 2010–2012 рр.), «Розробити технологію отримання меланома-специфічних трансферфакторних поліпептидів та обґрунтувати доцільність їх застосування у хворих на меланому шкіри» (номер держреєстрації 0113U002146; 2013–2015 рр.), «Дослідити адаптивну Т-клітинну імунну відповідь організму у хворих на меланому шкіри та визначити імунологічні критерії прогнозу перебігу захворювання для оптимізації тактики лікування» (номер держреєстрації 0116U002410; 2016–2018 рр.).

Мета дослідження. Визначити особливості змін в імунній системі хворих на МШ під впливом ІФН-терапії для прогнозування ефективності комбінованого лікування.

Завдання дослідження:

1. Дослідити особливості зрушень в імунній системі хворих на МШ та визначити клініко-лабораторні критерії її дисфункції на різних стадіях захворювання.

2. Визначити особливості імунореактивності організму хворих на МШ з урахуванням наявності поверхневого вираження первинної пухлини.

3. Вивчити вплив ІФН-терапії на імунну систему хворих на первинно-локалізовану МШ (ПЛМ) в динаміці комбінованого лікування із застосуванням різних схем ІФН-терапії.

4. Вивчити вплив ІФН-терапії на імунну систему хворих на МШ з метастазами в регіонарних лімфатичних вузлах (ММРЛВ) в динаміці комбінованого лікування із застосуванням різних схем ІФН-терапії.

5. Дослідити особливості локальної імунної реакції у хворих на МШ та їх зв'язок з відповіддю на ІФН-терапію.

6. Дослідити зміни системної імунної відповіді в динаміці ІФН-терапії у хворих на МШ та визначити найбільш інформативні лабораторні показники для прогнозування ефективності комбінованого лікування.

Об'єкт дослідження: лімфоцити периферичної крові (ЛПК) та лімфоцити, що інфільтрують пухлину, у хворих на МШ кінцівок та тулуба.

Предмет дослідження: імунофенотип та функціональна активність ЛПК, імунофенотип лімфоцитів, що інфільтрують пухлину.

Методи дослідження: імунологічні, у тому числі цитофлуориметричний, для дослідження імунологічних показників; імуногістохімічний для визначення імунофенотипу лімфоцитів, що інфільтрують пухлину; культури клітин; морфологічний для верифікації діагнозу; клінічний для оцінки перебігу захворювання, ефективності проведеного лікування; статистичні для обробки та аналізу даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше розроблені клініко-лабораторні критерії дисфункції імунної системи залежно від розповсюдження пухлинного процесу у хворих на МШ.

Вперше з'ясовані зрушення в імунній системі хворих на МШ залежно від наявності вираження первинної пухлини з урахуванням статусу «сторожових» лімфатичних вузлів (ЛВ).

Визначено, що особливостями впливу комбінованого застосування ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$ на формування клітинно-опосередкованої імунної відповіді у хворих на ПЛМ є збереження кількості циркулюючих цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) (рівень яких знижується при монотерапії ІФН- $\alpha 2b$), відновлення мітоген-індукованої проліферації ЛПК та посилення їх здатності продукувати фактор, що пригнічує міграцію лейкоцитів.

Встановлено, що у хворих на ММРЛВ при застосуванні індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ в ад'ювантному режимі, на відміну від його проведення в неoad'ювантному режимі, відбувається зниження в циркуляції відсотка регуляторних Т-клітин (Трег), що сприяє відновленню співвідношення ефекторних і регуляторних ланок імунної системи.

Розроблено імунологічні критерії прогнозу несприятливого перебігу захворювання на тлі ІФН-терапії у хворих на МШ залежно від стадії захворювання.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано комплекс імунологічних показників в якості додаткових лабораторних критеріїв прогнозу ефективності ІФН-терапії у хворих на МШ.

Дослідження щільності інфільтрації $CD8^+$ - та $CD45RO^+$ -лімфоцитами первинної пухлини дозволяє визначити хворих на ПЛМ, які є більш чутливими до ІФН-терапії.

Розроблені методичні підходи можуть бути використані у моніторингу хворих з ІВ–ІІ та ІІІ стадіями МШ в динаміці комбінованого лікування для прогнозування перебігу захворювання на тлі ІФН-терапії.

Отримані результати імунологічного моніторингу хворих на МШ можуть бути використані для розробки відповідних клінічних рекомендацій щодо застосування ІФН-терапії в схемах основного лікування хворих на МШ.

Впровадження результатів роботи в практику. Результати дослідження впроваджені в практику ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України».

Особистий внесок здобувача. Здобувач дібрала та проаналізувала наукову літературу з теми дисертації, провела інформаційно-патентний пошук,

сформулювала мету і завдання, розробила дизайн дослідження, проаналізувала усю сукупність одержаних даних. Спільно з науковим керівником сформулювала основні положення та висновки роботи. Автор брала безпосередню участь у лабораторному обстеженні хворих, підготовці до публікації наукових праць за темою дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені на: XII (Київ, 2011) та XIII (Київ, 2012) Українських науково-практичних конференціях з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації, науково-практичних конференціях молодих вчених «Современные методы диагностики и лечения больных злокачественными новообразованиями» (Київ, 2012), «Новітні методи діагностики, профілактики та лікування онкологічних захворювань» (Харків, 2013), «Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах» (Київ, 2015); на III (Київ, 2014) та IV (Київ, 2015) Міжнародних медичних конгресах «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України»; на XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016); 6th World Meeting of Interdisciplinary Melanoma Skin Cancer Centres & 8th EADO Congress (Барселона, 2012), 2nd European Post-Chicago Melanoma Meeting 2012 (Мюнхен, 2012), 10th Congress of European Association of Dermatologic Oncology (Вільнюс, 2014), The European Cancer Congress 2015 (Відень, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 статей у наукових фахових виданнях України та 2 статті у наукових фахових виданнях інших держав; 12 тез у матеріалах вітчизняних та міжнародних конгресів, з'їздів та конференцій; методичні рекомендації. Отримано 4 патенти України на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена українською мовою на 187 сторінках машинопису, складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел (275 найменувань, з яких 61 кирилицею), 3 додатків; ілюстрована 37 таблицями та 27 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дисертаційна робота ґрунтується на результатах обстеження 158 хворих на МШ, лікування яких проведено в науково-дослідному відділенні пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку (завідувач – д-р мед. наук, професор Коровін С.І.).

I–II стадію МШ верифіковано у 61 хворого (в тому числі IA стадію в 16 випадках); III стадію – у 57 хворих (у 17 пацієнтів в регіонарних ЛВ виявлені мікрометастази пухлини); IV стадію – у 40 хворих.

Критерії включення в дослідження: надання пацієнтом письмової інформованої згоди на участь у дослідженні; гістологічне підтвердження діагнозу; стать хворих – чоловіки та жінки; вік хворих від 18 до 75 років; локалізація первинної пухлини на шкірі кінцівок або тулуба.

Критерії виключення із дослідження: серйозна супутня патологія; наявність іншого онкологічного захворювання в анамнезі; для хворих жіночої статі – вагітність або лактація.

До початку лікування хворим виконували стандартне обстеження, яке при ПЛМ включало рентгенографію органів грудної порожнини, ультразвукове обстеження органів черевної порожнини та регіонарних ЛВ; при метастазах у регіонарних ЛВ та/або ураженні внутрішніх органів – комп'ютерну томографію головного мозку, органів грудної та черевної порожнин і таза. Пацієнтам з клінічними ознаками ПЛМ без клінічних ознак ураження регіонарного лімфатичного колектора виконували біопсію «сторожових» ЛВ.

З метою визначення особливостей зрушень в імунній системі та клініко-лабораторних критеріїв діагностики її дисфункції при МШ усім пацієнтам до лікування проводили імунологічне обстеження. Після гістологічної верифікації діагнозу хворих було розподілено на 3 групи залежно від стадії (I–II, III та IV) захворювання, які включали відповідно 61, 57 та 40 осіб. Хворих на ПЛМ та з мікрометастазами МШ в регіонарних ЛВ (IIIA–IIIB стадія), також було розподілено на групи за наявністю поверхневого вираження первинної пухлини.

В дослідження щодо впливу ІФН-терапії на імунну систему хворих на МШ в динаміці комбінованого лікування було включено 40 пацієнтів з IB–IIС стадією захворювання та 40 пацієнтів з IIIB–IIС стадією.

Хворим на ПЛМ контрольної групи (n = 20) після хірургічного лікування проводили курс ІФН- α 2b (підшкірно по 3 млн міжнародних одиниць (МО) тричі на тиждень упродовж 12 міс.), хворим основної групи (n = 20) ад'ювантне лікування розпочинали з курсу ІФН- γ (підшкірно по 500 тис. МО через день, 5 ін'єкцій) з подальшим застосуванням ІФН- α 2b за схемою, аналогічною в контрольній групі.

За період спостереження зразки крові хворих на ПЛМ для імунологічного дослідження отримували 5 разів: 1 – до оперативного втручання; 2 – через 8–10 днів після оперативного втручання; 3 – після курсу ІФН- γ (основна група) або після 5 ін'єкцій ІФН- α 2b (контрольна група); 4 – через 3 міс. від початку терапії ІФН- α 2b; 5 – після закінчення лікування.

Хворим на ММРЛВ контрольної групи (n = 20) після хірургічного лікування проводили послідовно індукційний (підшкірно по 9 млн МО щоденно упродовж 23 днів) та підтримуючий (підшкірно по 3 млн МО тричі на тиждень упродовж 12 міс.) курси ІФН- α 2b. У хворих основної групи (n = 20) індукційний курс ІФН-терапії застосовували в неoad'ювантному режимі.

За період спостереження зразки крові хворих на ММРЛВ для імунологічного дослідження отримували 5 разів: 1 – до початку лікування; 2 – через 8–10 днів після хірургічного лікування (контрольна група) або після індукційного курсу ІФН- α 2b в неoad'ювантному режимі (основна група); 3 – після індукційного курсу ІФН- α 2b в ад'ювантному режимі (контрольна група) або через 8–10 днів після хірургічного лікування (основна група); 4 – через 3 міс. від початку підтримуючого курсу ІФН- α 2b; 5 – після закінчення лікування.

Обстежено групу практично здорових людей (ПЗЛ, n = 60) порівняну з досліджуваними групами хворих за статтю та віком.

У дослідження локальної імунної відповіді та її зв'язку з ефективністю ІФН-терапії при МШ включені хворі з ІВ–ІІС стадією захворювання (n = 20).

Імунологічне дослідження периферичної крові включало вивчення імунофенотипічних характеристик циркулюючих лімфоцитів та їх функціональної активності (цитотоксичність, мітоген- та анти-CD3-індукована проліферативна відповідь, рівень апоптозу, здатність продукувати фактор, що гальмує міграцію лейкоцитів). Імуногістохімічне дослідження первинної пухлини проводили з використанням моноклональних антитіл до CD3, CD8, CD4, CD20, CD56, CD45RA, CD45RO та хромогену, який має колір, відмінний від коричневого. Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом. Морфологічні та імуногістохімічні дослідження пухлини проведено у науково-дослідному відділенні патологічної анатомії та імуногістохімії Національного інституту раку.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програм Excel (MS Office 2003, XP), STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США), EZR v. 1.36 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Японія, 2017). Для порівняльного аналізу розподілу досліджуваних характеристик застосовували t-критерій Стюдента, критерії Манна-Уїтні (для незалежних сукупностей) та Уїлкоксона (для спряжених сукупностей). Вибір параметричних чи непараметричних критеріїв аналізу базувався на визначенні характеру розподілу даних за критерієм Шапіро-Уїлка. Оцінку значимості розбіжностей між показниками частоти метастазування пухлини здійснювали за побудовою таблиць спряженості із застосуванням критерію Хі-квадрат з поправкою Yates. Для визначення сили та спрямованості кореляційного зв'язку між показниками застосовано коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r). Для встановлення критичного значення показників використовували метод побудови та аналізу кривих операційних характеристик (ROC-кривих) тесту; критичний поріг тесту обирали методом максимізації Youden індексу. Розбіжності оцінювали як значимі при $p < 0,05$. Результати дослідження представлені у вигляді медіани, 10-го та 90-го перцентилів; на рисунках (блокові діаграми) – у вигляді медіани, інтерперцентильної широти (з 10-го до 90-го) та розмаху розподілу (від мінімального та максимального значень).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідженням особливостей зрушень в імунній системі хворих на МШ встановлено клініко-лабораторні критерії її дисфункції на різних стадіях захворювання (рис. 1, 2, 3). Визначено, що такими критеріями при ПЛМ є:

- зниження в периферичній крові хворих загальної кількості В-лімфоцитів (CD19⁺) ($0,10 (0,05; 0,19) \times 10^9/\text{л}$ проти $0,13 (0,08; 0,20) \times 10^9/\text{л}$ у ПЗЛ);
- збереження співвідношення основних популяцій ЛПК (Т-лімфоцитів (CD3⁺), Т-хелперів (CD4⁺), ЦТЛ (CD8⁺), В-лімфоцитів) за винятком збільшення відсотка природних кілерних клітин (ПКК, CD16⁺);

- зростання відносної кількості циркулюючих Трег ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low-neg}$ 3,2 (2,1; 4,8) % проти 2,8 (1,9; 3,7) % у ПЗЛ, $p < 0,05$);
- виражений активаційний фенотип ЛПК, що характеризується високою експресією HLA-DR- та CD25-антигенів;
- посилення анти-CD3-індукованої та зниження індукованої низькими дозами (10 мкг/мл) фітогемаглютиніну (ФГА) проліферативної відповіді ЛПК;
- зниження мітоген-індукованого апоптозу, незалежно від використовуваної дози ФГА.

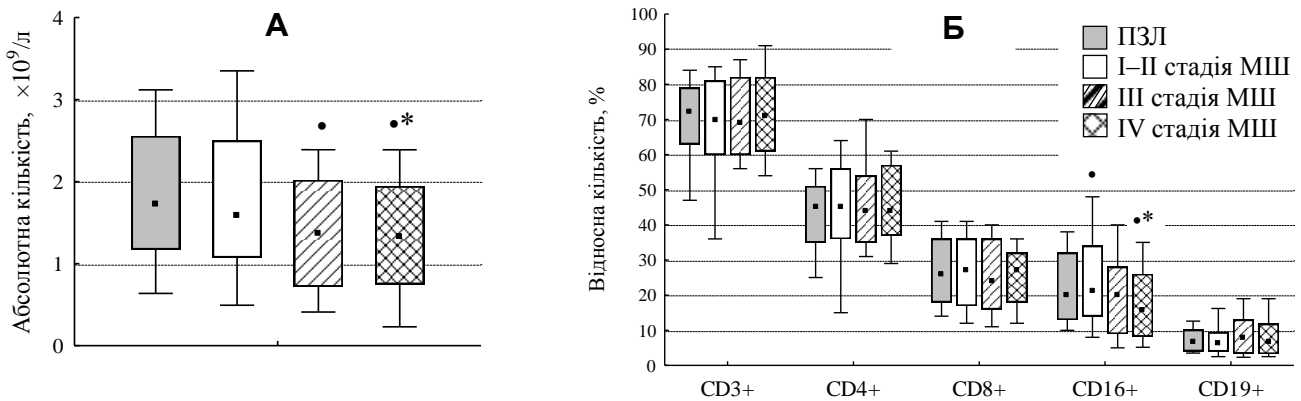


Рис. 1. Вміст лімфоцитів у периферичній крові (А) та їх популяційний склад (Б) у хворих на МШ

Примітки:

1. • – розбіжність при порівнянні з показником у ПЗЛ статистично значима ($p < 0,05$);
2. * – розбіжність при порівнянні з показником у хворих з I-II стадією МШ статистично значима ($p < 0,05$).

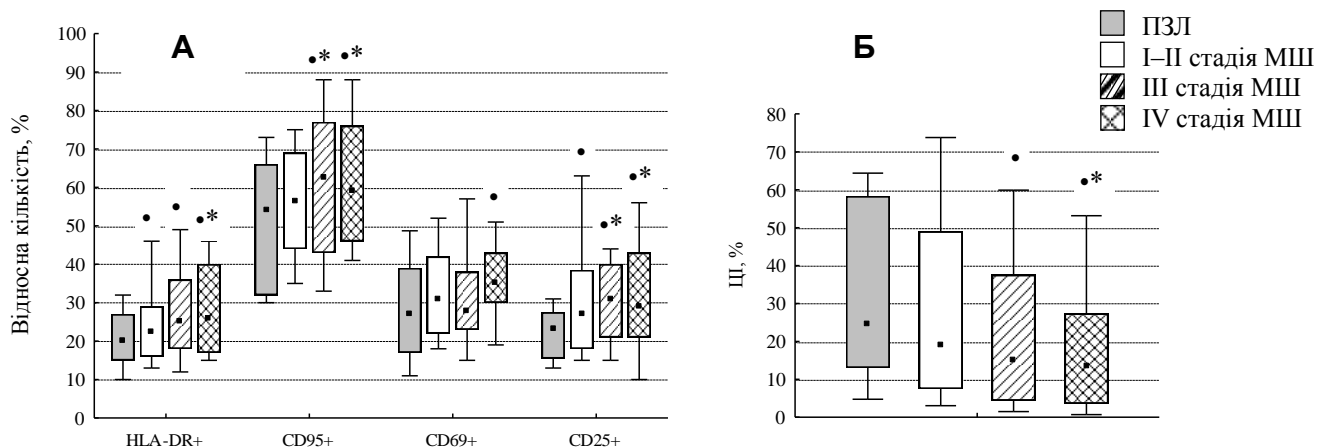


Рис. 2. Рівень активованих ЛПК (А) та цитотоксичність ЛПК (Б) у хворих на МШ

Примітки:

1. • – розбіжність при порівнянні з показником у ПЗЛ статистично значима ($p < 0,05$);
2. * – розбіжність при порівнянні з показником у хворих з I-II стадією МШ статистично значима ($p < 0,05$);
3. ЦІ – цитотоксичний індекс.

Для ММРЛВ характерними є:

- лімфоцитопенія за рахунок усіх основних популяцій ЛПК;
- співвідношення основних популяцій ЛПК в межах нормальних значень;
- відсоток Трег, що є вищим за такий у ПЗЛ та у хворих на ПЛМ (відповідно 4,2 (2,1; 6,3) % проти 2,8 (1,9; 3,7) та 3,2 (2,1; 4,8) %, $p < 0,05$);
- високий рівень експресії HLA-DR-, CD25- та CD95-антигенів на ЛПК;
- нормальний рівень анти-CD3-індукованої проліферативної активності ЛПК та пригнічена проліферативна відповідь на низькі дози ФГА;
- підвищення рівня спонтанного та анти-CD3-індукованого апоптозу ЛПК;
- пригнічення цитотоксичної активності ЛПК.

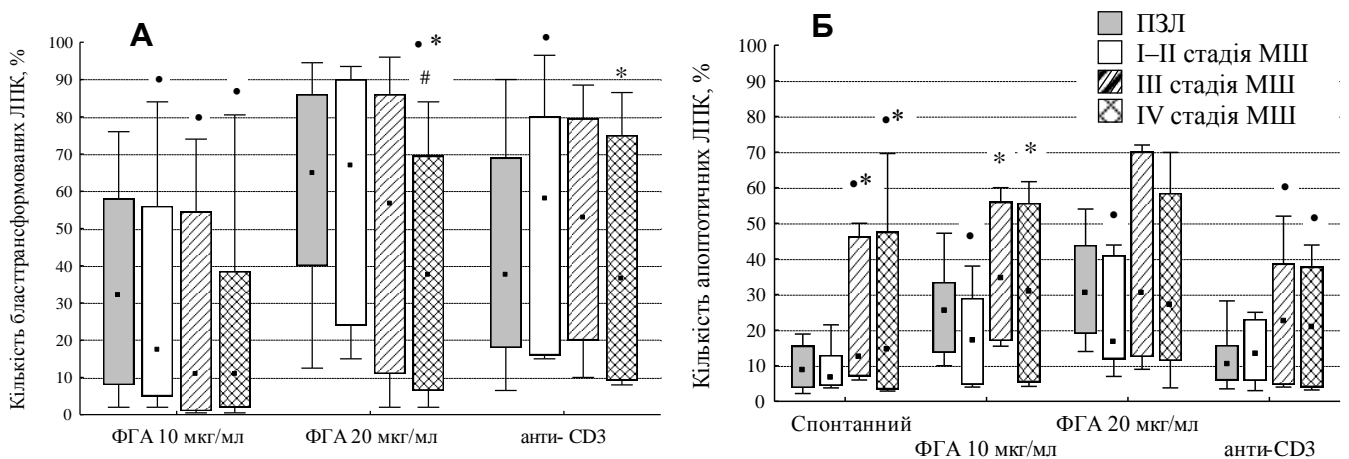


Рис. 3. Проліферативна активність (А) та апоптоз (Б) ЛПК у хворих на МШ

Примітки:

1. • – розбіжність при порівнянні з показником у ПЗЛ статистично значима ($p < 0,05$);
2. * – розбіжність при порівнянні з показником у хворих з I–II стадією МШ статистично значима ($p < 0,05$);
3. # – розбіжність при порівнянні з показником у хворих з III стадією МШ статистично значима ($p < 0,05$).

Для хворих з генералізованою МШ притаманні:

- загальний вміст ЛПК нижчий за рівень показника як у ПЗЛ, так і у хворих на ПЛМ (відповідно $1,32 (0,75; 1,94) \times 10^9/\text{л}$ проти $1,77 (1,17; 2,54)$ та $1,59 (1,07; 2,50) \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$);
- зрушення в популяційному складі ЛПК, що обумовлені значним зниженням вмісту в периферичній крові ПСК;
- високий відсоток Трег (3,9 (2,8; 5,3) %), що відповідає такому при ММРЛВ;
- виражений активаційний фенотип ЛПК, що характеризується високою експресією HLA-DR-, CD25-, CD95- та CD69-антигенів;
- анти-CD3-індукована проліферація ЛПК на рівні ПЗЛ та низькі показники проліферації у відповідь як на низьку, так і високу дози ФГА;
- рівень апоптозу ЛПК, що відповідає такому при ММРЛВ;
- пригнічення цитотоксичної активності ЛПК (Ці складає 13,6 (3,6; 27,4) % проти 25,7 (13,3; 58,3) та 19,1 (7,5; 49,9) % відповідно у ПЗЛ та у хворих на ПЛМ, $p < 0,05$).

Дослідження імунологічного профілю хворих на МШ залежно від наявності виразкування первинної пухлини та статусу «сторожових» ЛВ показало, що при ПЛМ за відсутності виразкування ($n = 36$) співвідношення основних популяцій ЛПК відповідає такому у ПЗЛ (рис. 4), водночас, реєструється високий відсоток активованих клітин, що експресують CD25-антиген, та Трег (3,4 (2,3; 4,9) % проти 2,8 (1,9; 3,7) % у ПЗЛ, $p < 0,05$). Натомість, у хворих з виразкуванням пухлини ($n = 25$) спостерігається збільшення в циркуляції абсолютної кількості ПКК ($0,42 (0,35; 0,64) \times 10^9/\text{л}$ проти $0,34 (0,24; 0,55) \times 10^9/\text{л}$ і $0,28 (0,21; 0,45) \times 10^9/\text{л}$ відповідно у ПЗЛ і у хворих на ПЛМ без виразкування, $p < 0,05$), і зміни в популяційному складі ЛПК, які характеризуються збільшенням відсотка ПКК та зменшенням відсотка Т-лімфоцитів. За наявності виразкування МШ у хворих на ПЛМ відмічається також високий рівень експресії CD95-антигену на ЛПК.

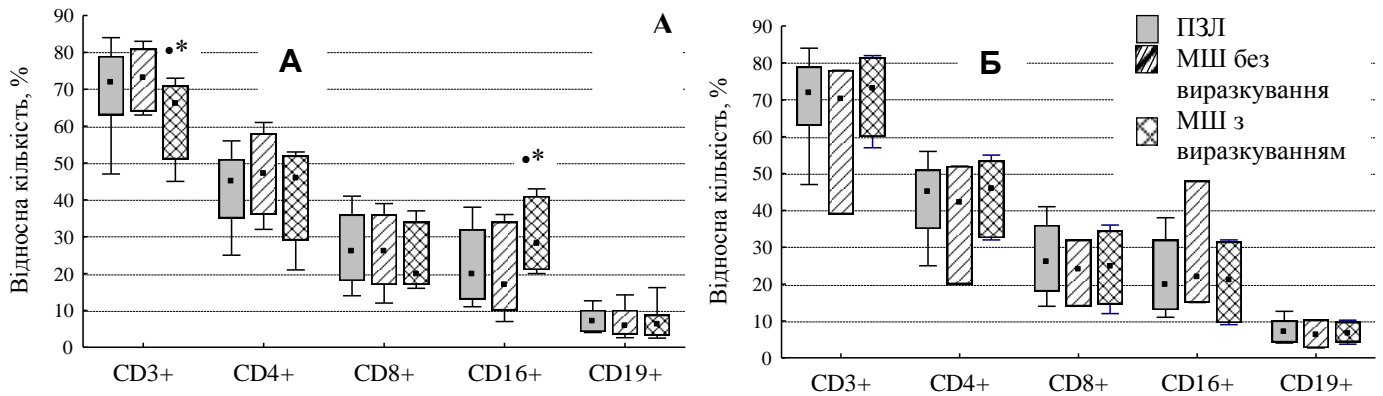


Рис. 4. Популяційний склад ЛПК у хворих на ПЛМ (А) та з мікрометастазами МШ в регіонарних ЛВ (Б) залежно від наявності виразкування первинної пухлини

Примітки:

1. • – розбіжність при порівнянні з показником у ПЗЛ статистично значима ($p < 0,05$);
2. * – розбіжність при порівнянні з показником у хворих з I–II стадією МШ без виразкування статистично значима ($p < 0,05$).

Встановлено, що при ПЛМ у разі відсутності виразкування формується тенденція до зниження кількості В2-клітин ($CD19^+CD5^+$), а за його наявності – В1-клітин ($CD19^+CD5^-$), що призводить до статистично значимої розбіжності між показниками співвідношення цих лімфоцитів в досліджуваних групах (В1-клітини/В2-клітини складає відповідно $0,69 (0,45; 1,36)$ та $0,54 (0,30; 0,92)$ умовних одиниць (ум. од.), $p < 0,05$). У хворих з виразкуванням МШ реєструється підвищення проліферації Т-лімфоцитів у відповідь на анти-CD3 моноклональні антитіла (рис. 5) при незміненому рівні анти-CD3-індукованого апоптозу і, навпаки, незмінена проліферативна відповідь клітин на ФГА при низькому ФГА-індукованому апоптозі.

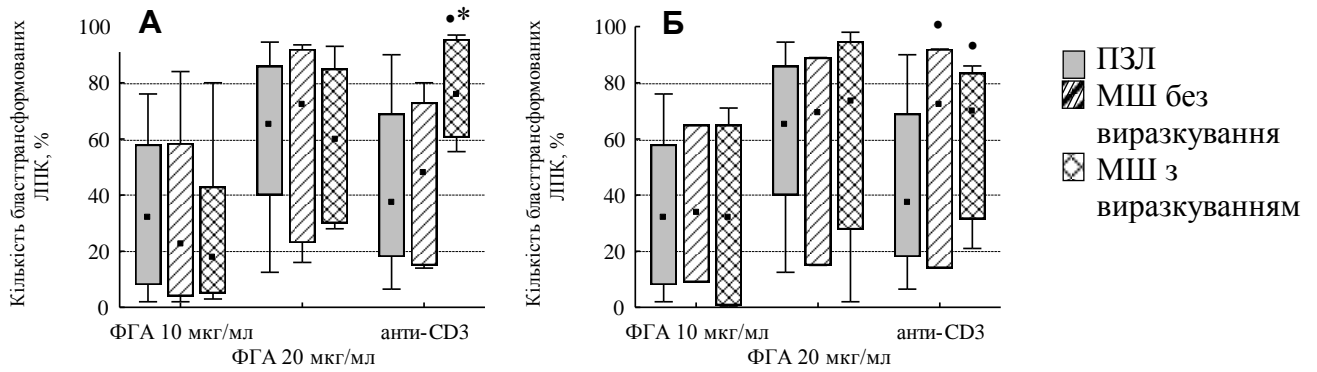


Рис. 5. Проліферативна активність ЛПК хворих на ПЛМ (А) та з мікрометастазами МШ в регіонарних ЛВ (Б) залежно від наявності виразкування первинної пухлини

Примітки:

1. • – розбіжність при порівнянні з показником у ПЗЛ статистично значима ($p < 0,05$);
2. * – розбіжність при порівнянні з показником у хворих з I–II стадією МШ без виразкування первинної пухлини статистично значима ($p < 0,05$).

Розповсюдження МШ в лімфоїдну тканину нівелює зазначені відмінності в популяційному складі ЛПК, за винятком високого відсотка $CD95^+$ -лімфоцитів, між хворими без та з виразкуванням пухлини. З формуванням у «сторожових» ЛВ мікрометастазів у хворих на МШ (IIA–IIIB стадія) знижується цитотоксична активність ЛПК, рівень якої у пацієнтів з виразкуванням ($n = 10$) є суттєво нижчим, ніж у ПЗЛ (Ці складає відповідно 13,5 (4,4; 33,2) проти 25,7 (13,3; 58,3) %, $p < 0,05$). Проліферація Т-лімфоцитів у відповідь на ФГА в обох групах хворих з регіонарними мікрометастазами, як і у хворих з інтактними «сторожовими» ЛВ, відповідає нормальним значенням. Незалежно від наявності виразкування анти-CD3-індукована проліферація ЛПК при IIA–IIIB стадії МШ є підвищеною.

Дослідження впливу різних схем ІФН-терапії на імунну систему хворих на ПЛМ в динаміці комбінованого лікування показало, що за умов проведення монотерапії ІФН- $\alpha 2b$ відбувається суттєве зниження абсолютної кількості циркулюючих ЦТЛ ($0,28 (0,07; 0,49) \times 10^9/\text{л}$ через 12 міс. курсу ІФН проти нормального та початкового рівнів, які відповідно складають $0,45 (0,24; 0,75) \times 10^9/\text{л}$ та $0,48 (0,24; 0,87) \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$), проте при послідовному застосуванні ІФН- γ та ІФН- $\alpha 2b$ кількість цих клітин-ефекторів зберігається ($0,46 (0,16; 0,57) \times 10^9/\text{л}$).

У хворих, які отримують лише ІФН- $\alpha 2b$, в популяційному складі ЛПК суттєво зменшується та залишається на такому рівні до кінця лікування відсоток ЦТЛ (25,0 (17,0; 34,0) та 21,0 (15,0; 28,0) % через 3 та 12 міс. ІФН-терапії проти 31,5 (18,0; 39,0) та 30,0 (19,0; 40,0) % до лікування та у ПЗЛ, $p < 0,05$). На 3-му міс. застосування ІФН- $\alpha 2b$ у таких хворих значно збільшується відносна кількість В1-клітин (4,8 (0,8; 7,2) % проти 2,4 (1,4; 4,3) % до хірургічного лікування, 1,9 (0,9; 4,2) % перед ІФН-терапією та 2,8 (1,7; 4,2) % у ПЗЛ, $p < 0,05$), разом з тим, цей ефект є короткочасним і до завершення імунотерапії зникає.

На тлі проведення сполученої ІФН-терапії суттєвих змін у популяційному складі Т- та В-лімфоцитів периферичної крові у хворих на ПЛМ не відбувається.

Застосування обох схем ІФН-терапії у хворих на ПЛМ супроводжується збільшенням відсотка Трег серед ЛПК (на 3-му міс. курсу ІФН в контрольній та основній групах показник відповідно складає 4,2 (2,1; 5,4) та 4,3 (2,5; 8,3) %), При цьому у разі отримання хворими ІФН-γ через 3 міс. імунотерапії зростає і загальний вміст цих клітин у крові ($0,06 (0,03; 0,19) \times 10^9/\text{л}$ проти $0,04 (0,02; 0,07) \times 10^9/\text{л}$ до лікування, $p < 0,05$), високий рівень якого зберігається до кінця періоду спостереження ($0,08 (0,06; 0,13) \times 10^9/\text{л}$ проти початкових значень та рівня показника $0,05 (0,03; 0,09) \times 10^9/\text{л}$ у ПЗЛ, $p < 0,05$).

Характер експресії активаційних антигенів на ЛПК у хворих на ПЛМ відрізняється залежно від застосованої схеми ІФН-терапії. При використанні лише ІФН-α2b упродовж перших 3 міс. терапії відбувається підвищення відсотка CD95⁺- та HLA-DR⁺-лімфоцитів, а після закінчення лікування його рівень повертається до початкового. Сполучене застосування ІФН-γ та ІФН-α2b призводить до збільшення відсотка HLA-DR⁺-лімфоцитів до кінця курсу імунотерапії та не впливає на вміст CD95⁺-клітин.

Введення в схему ІФН-терапії курсу ІФН-γ позначається на здатності ЛПК продукувати фактор, що гальмує міграцію лейкоцитів (індекс міграції після курсу ІФН-γ – 62,0 (42,0; 76,0) % проти 76,0 (50,0; 91,0) % у ПЗЛ, $p < 0,05$), проте цей ефект, а саме посилення зазначеної функції, є короточасним. Застосування ІФН-γ та ІФН-α2b, на відміну від монотерапії ІФН-α2b, сприяє відновленню мітоген-індукованої проліферації ЛПК in vitro (табл. 1). В обох групах хворих інтенсивність спонтанного апоптозу ЛПК під час лікування реєструється на рівні початкових значень.

Таблиця 1

Вплив ІФН-терапії на проліферативну активність ЛПК у хворих на ПЛМ в динаміці комбінованого лікування

Група хворих	ФГА, мкг/мл	Кількість бласттрансформованих ЛПК (%) на етапах обстеження				
		1	2	3	4	5
Контрольна	10	13,5 (2,0; 35,0) •	13,0 (1,0; 49,0) •	7,5 (1,0; 46,0) •	6,0 (1,0; 23,0) •	9,0 (5,0; 25,5) •
	20	65,0 (20,0; 86,0)	64,5 (23,5; 94,5)	59,8 (6,0; 78,5)	58,5 (18,0; 83,0)	60,3 (7,5; 88,0)
Основна	10	14,0 (7,0; 48,5) •	18,0 (3,5; 59,5)	14,5 (1,0; 30,5) •	30,0 (5,0; 67,0) ^к	38,5 (5,0; 64,5) ^к
	20	45,5 (24,0; 84,0)	72,8 (8,0; 89,0)	54,5 (45,0; 86,0)	77,0 (46,0; 95,0) ¹	78,5 (64,0; 90,5)
ПЗЛ	10	32,0 (8,0; 56,0)				
	20	64,0 (36,0; 86,5)				

Примітки:

- ¹ – розбіжність при порівнянні з показником у хворих відповідної групи на 1-му етапі обстеження статистично значима ($p < 0,05$);
- – розбіжність при порівнянні з показником у ПЗЛ статистично значима ($p < 0,05$);
- ^к – розбіжність при порівнянні з показником у хворих контрольної групи на відповідному етапі обстеження статистично значима ($p < 0,05$).

Дослідження впливу різних схем ІФН-терапії на імунну систему хворих на ММРЛВ в динаміці комбінованого лікування показало, що послідовне застосування індукційного і підтримуючого курсів ІФН- $\alpha 2b$ в ад'ювантному режимі (контрольна група), на відміну від схеми імунотерапії з індукційним курсом ІФН- $\alpha 2b$ в неoad'ювантному режимі, сприяє підвищенню вмісту ЦТЛ до нормальних значень. У хворих основної групи після закінчення лікування кількість циркулюючих ЦТЛ зберігається на початковому рівні (відповідно $0,23 (0,04; 0,52) \times 10^9/\text{л}$ та $0,27 (0,15; 0,53) \times 10^9/\text{л}$, $p > 0,05$) і є суттєво нижчою за показник у ПЗЛ. У хворих контрольної групи на тлі комбінованого лікування популяційний склад ЛПК визначається в межах нормальних значень, в той час як у хворих основної групи реєструється зменшення відносної кількості ЦТЛ і ПКК та збільшення відсотка В-лімфоцитів (переважно за рахунок В1-клітин).

Проведення індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ в ад'ювантному режимі сприяє, з одного боку, збереженню в межах нормальних значень частки клітин-ефекторів (ЦТЛ та ПКК) серед ЛПК, з іншого, зниженню до рівня ПЗЛ відносної кількості Трег ($3,7 (1,9; 7,9)$ і $2,8 (0,5; 3,7)$ % до і через 3 міс. ІФН-терапії проти $2,8 (1,9; 3,7)$ % у ПЗЛ, відповідно $p < 0,05$ і $p > 0,05$). Після закінчення підтримуючого курсу ІФН- $\alpha 2b$ у таких хворих рівень Трег повертається до початкових значень. Відсоток Трег у хворих основної групи залишається на однаково високому рівні на всіх етапах обстеження, водночас, відносна кількість $CD4^+25^+$ -лімфоцитів після завершення лікування суттєво підвищується ($28,0 (23,0; 36,0)$ % проти $22,0 (17,0; 24,0)$ та $14,5 (11,0; 18,0)$ % до неoad'ювантної ІФН-терапії та у ПЗЛ, $p < 0,05$).

Проведення хірургічного лікування та індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ (в ад'ювантному чи неoad'ювантному режимі) у хворих на ММРЛВ супроводжується пригніченням проліферативної відповіді ЛПК на мітоген *in vitro*, подальше застосування підтримуючого курсу ІФН- $\alpha 2b$ призводить до відновлення проліферативної активності ЛПК. Інтенсивність спонтанного апоптозу ЛПК через 3 міс. підтримуючого курсу ІФН- $\alpha 2b$, незалежно від застосованої схеми ІФН-терапії, нормалізується, але після завершення лікування повертається до початкових значень, що є вищими за такі у ПЗЛ.

Згідно з результатами спостереження, кількість випадків прогресування захворювання на тлі ад'ювантної ІФН-терапії у хворих на ПЛМ в контрольній групі склала 10 % (95 % довірчий інтервал (ДІ) 0,8–27,8 %), в основній – 15 % (95 % ДІ 2,7–34,9 %); у хворих на ММРЛВ розвиток рецидиву відмічено у 50 % пацієнтів при обох застосованих схемах ІФН-терапії.

Для визначення найбільш інформативних імунологічних показників при прогнозуванні ефективності ІФН-терапії був проведений аналіз змін імунологічних показників периферичної крові (упродовж 3 міс. застосування ад'ювантної ІФН-терапії) у хворих на ПЛМ і на ММРЛВ та особливостей популяційного складу лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, у хворих на ПЛМ з урахуванням регіонарних та/або віддалених метастазів, що виникли на тлі лікування. Групи хворих зі сприятливим та несприятливим перебігом захворювання

серед хворих на ПЛМ включали відповідно 5 і 35 осіб, серед хворих на ММРЛВ – по 20 пацієнтів у кожній.

При дослідженні зв'язку між імунологічними показниками периферичної крові (абсолютний та відносний вміст Т-лімфоцитів, ЦТЛ, Т-хелперів, В-лімфоцитів, у тому числі В1- і В2-клітин, ПКК, Трег; кількість $HLA-DR^{+}$ -, $CD95^{+}$ -, $CD25^{+}$ -, $CD4^{+}CD25^{+}$ -, $CD69^{+}$ -лімфоцитів; цитотоксичність, проліферативна активність, апоптоз та здатність ЛПК продукувати фактор, що пригнічує міграцію лейкоцитів) з перебігом захворювання було встановлено, що між абсолютною кількістю циркулюючих $CD25^{+}$ -лімфоцитів та прогресуванням захворювання у хворих на ПЛМ існує зворотна кореляційна залежність ($r = -0,325$, $p < 0,05$), а для індексу міграції (збільшення якого вказує на зниження здатності ЛПК продукувати фактор, що пригнічує міграцію лейкоцитів) – пряма кореляційна залежність ($r = 0,451$, $p < 0,05$).

Для встановлення критичного значення показників використовували метод побудови та аналізу ROC-кривих тесту (рис. 6).

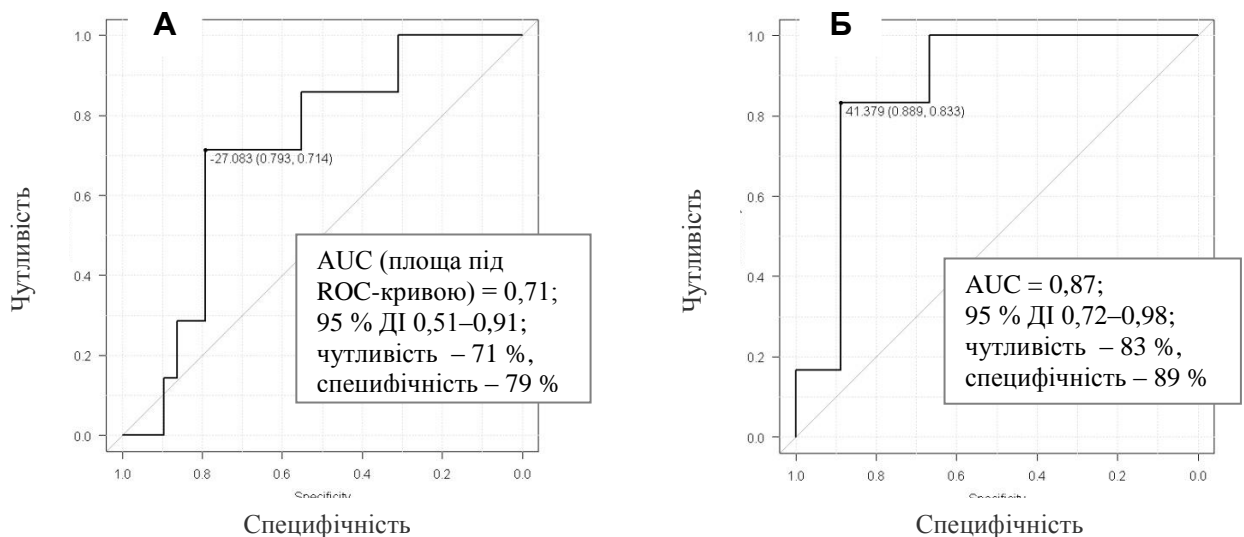


Рис. 6. ROC-криві прогнозування перебігу захворювання на тлі ІФН-терапії за зміною вмісту $CD25^{+}$ -лімфоцитів (А) та індексу міграції (Б) у хворих на ПЛМ

Визначено, що зменшення в периферичній крові у хворих на ПЛМ через 3 міс. ад'ювантної ІФН-терапії абсолютної кількості $CD25^{+}$ -лімфоцитів на 27 % та зростання рівня індексу міграції на 41 % від початкових значень прогнозує прогресування захворювання.

У хворих на ПЛМ сприятливий перебіг захворювання на тлі ІФН-терапії асоціюється зі збільшенням інфільтрації паренхіми первинної пухлини ЦТЛ ($CD8^{+}$) вище 0,67 ум. од. (AUC = 0,81; 95 % ДІ 0,59–0,92; чутливість тесту – 80 %, специфічність – 72 %) та/або її стромі Т-клітинами імунологічної пам'яті ($CD45RO^{+}$) вище 2,00 ум. од. (AUC = 0,81; 95 % ДІ 0,59–0,92; чутливість тесту – 80 %, специфічність – 72 %).

У хворих на ММРЛВ виявлено кореляційний зворотний зв'язок між зміною в периферичній крові відсотка ПКК, Трег, кількості $CD4^+CD25^+$ -лімфоцитів та прогресуванням захворювання (відповідно $r = -0,550$, $p < 0,05$; $r = -0,557$, $p < 0,05$; $r = -0,567$, $p < 0,05$). Також несприятливий перебіг захворювання у таких хворих асоціюється зі збільшенням відсотка циркулюючих Т-лімфоцитів та зростанням проліферативної відповіді ЛПК (відповідно $r = 0,504$, $p < 0,05$; $r = 0,730$, $p < 0,05$).

Встановлено наступні порогові рівні зміни показників, що прогнозують прогресування захворювання у хворих на ММРЛВ (рис. 7): зменшення відсотка ПКК на 21 %, Трег на 29 %, абсолютної кількості $CD4^+CD25^+$ -лімфоцитів на 25 % та збільшення відсотка Т-лімфоцитів на 17 %, кількості бласттрансформованих ЛПК (у відповідь на ФГА в дозі 10 мкг/мл) на 130 % через 3 міс. ІФН-терапії порівняно з рівнем відповідного показника до початку ад'ювантного лікування.

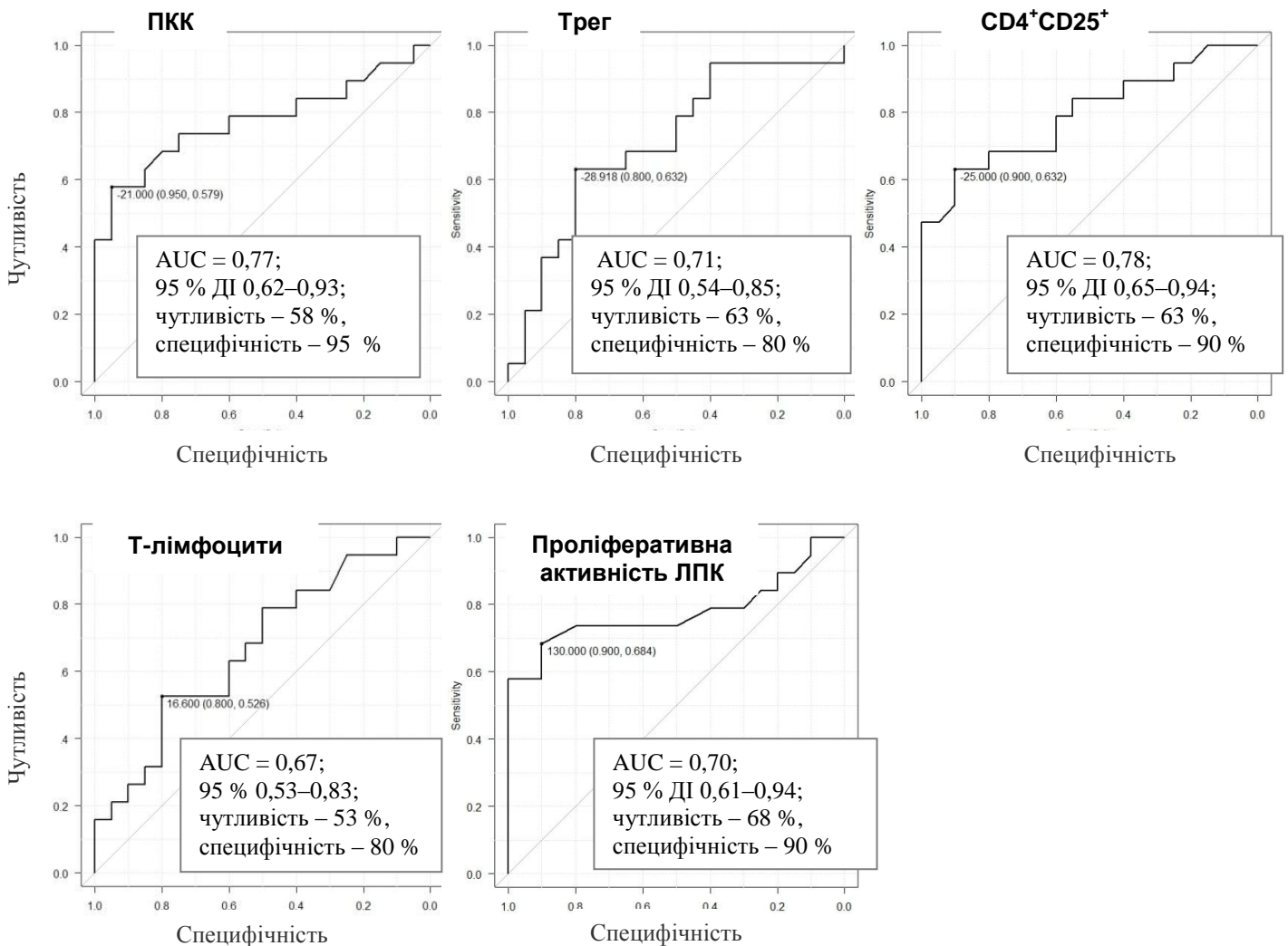


Рис. 7. ROC-криві прогнозування перебігу захворювання на тлі ІФН-терапії за зміною імунологічних показників периферичної крові у хворих на ММРЛВ

ВИСНОВКИ

В дисертації на основі теоретичного обґрунтування та клініко-імунологічних досліджень науково вирішена актуальна задача, що полягає у прогнозуванні ефективності комбінованого лікування хворих на МШ на основі визначення особливостей змін в їх імунній системі під впливом ІФН-терапії.

1. Клініко-лабораторними критеріями дисфункції імунної системи при ПЛМ шкіри є низький вміст циркулюючих В-клітин, високий відсоток Трег та HLA-DR⁺-, CD25⁺-лімфоцитів, посилення анти-CD3-індукованої та зниження індукованої низькими дозами ФГА проліферативної відповіді ЛПК і апоптозу; при ММРЛВ – лімфоцитопенія, висока частка Трег та HLA-DR⁺-, CD25⁺-, CD95⁺-лімфоцитів, зростання спонтанного та анти-CD3-індукованого апоптозу, рівень анти-CD3-індукованої проліферації ЛПК в межах нормальних значень, пригнічення цитотоксичної активності ЛПК; при генералізованій МШ (включно з наведеними для ММРЛВ) – низький відсоток ПКК, висока частка CD69-лімфоцитів та пригнічення проліферації ЛПК у відповідь на ФГА, незалежно від застосованої дози мітогену.

2. У хворих з клінічними ознаками ПЛМ без та з поверхневим виразкуванням первинної пухлини за відсутності ураження «сторожових» ЛВ спостерігаються суттєві відмінності в імунограмах (за вмістом ПКК, відсотком CD95⁺-, CD25⁺-лімфоцитів та Трег, співвідношенням В1-клітин/В2-клітин, анти-CD3-індукованою проліферативною відповіддю Т-лімфоцитів), що нівелюються (за винятком відсотка CD95⁺-лімфоцитів) у разі виникнення мікрометастазів в регіонарних ЛВ.

3. У хворих на ПЛМ перевагою застосування сполученої терапії ІФН-γ та ІФН-α2b порівняно з курсом ІФН-α2b є запобігання зменшенню абсолютної кількості циркулюючих ЦТЛ, збереження на сталому рівні вмісту В1-клітин, відновлення мітоген-індукованої проліферації ЛПК *in vitro* та посилення здатності ЛПК продукувати фактор, що пригнічує міграцію лейкоцитів. Жодна з досліджуваних схем ІФН-терапії не зменшує вміст циркулюючих Трег, а у разі отримання хворими ІФН-γ – цей показник суттєво зростає.

4. У хворих на ММРЛВ послідовне застосування індукційного та підтримуючого курсів ІФН-α2b в ад'ювантному режимі має переваги перед індукційним курсом ІФН-α2b в неoad'ювантному режимі, про що свідчать збереження в межах нормальних значень вмісту ЦТЛ, ПКК та зниження відсотка Трег.

5. Встановлено, що сприятливий перебіг захворювання на тлі ІФН-терапії спостерігається у хворих на ПЛМ з рівнем інфільтрації паренхіми первинної пухлини ЦТЛ вище 0,67 ум. од. та/або строми Т-клітинами імунологічної пам'яті 2,00 ум. од.

6. У хворих на ПЛМ критеріями прогнозу несприятливого перебігу захворювання на тлі ІФН-терапії є: зниження в перші 3 міс. ад'ювантної ІФН-терапії абсолютної кількості CD25⁺-лімфоцитів периферичної крові на 27 % і зростання індексу міграції лейкоцитів на 41 %. У хворих на ММРЛВ такими критеріями є: підвищення в перші 3 міс. ад'ювантної ІФН-терапії відносної кількості Т-клітин на 17 %, зниження частки ПКК на 21 %, Трег (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low-neg}) на 29 % та абсолютної кількості CD25⁺-Т-хелперів на 25 % і посилення мітоген-індукованої проліферації ЛПК (за кількістю бласттрансформованих клітин у відповідь на ФГА в дозі 10 мкг/мл) на 130 %.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Застосування розробленої методики оцінки щільності інфільтрації пухлини CD8⁺- та CD45RO⁺-лімфоцитами дозволяє визначити хворих на ПЛМ, які отримають найбільшу користь від ад'ювантної ІФН-терапії.

2. Визначені імунологічні критерії (за показниками периферичної крові) несприятливого перебігу МШ на тлі ІФН-терапії можуть бути використані для обґрунтування більш ретельного спостереження за пацієнтами з метою раннього виявлення прогресування захворювання.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив різних схем інтерферонотерапії на функціональну активність лімфоцитів у хворих на меланому шкіри / Ф. В. Фільчаков, К. С. Шуміліна, Г. Д. Льон, С. М. Кукушкіна, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна // Імунологія та алергологія: наука та практика. – 2011. – № 2. – С. 120–125. *(Особистий внесок дисертанта: обробка та узагальнення результатів власних досліджень, написання та оформлення статті.)*

2. Особливості імунного статусу у хворих на меланому шкіри на різних стадіях пухлинного процесу / Ф. В. Фільчаков, С. М. Кукушкіна, К. С. Шуміліна, Г. Д. Льон, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна // Клин. онкологія. – 2011. – № 2 (2). – С. 36–40. *(Особистий внесок дисертанта: добір та аналіз наукової літератури, проведення імунологічних досліджень у хворих на МШ, обробка отриманих даних, написання та оформлення статті.)*

3. Особливості імунореактивності організму хворих на меланому шкіри з метастазами в регіонарні лімфовузли в умовах дії різних схем інтерферонотерапії / Ф. В. Фільчаков, К. С. Шуміліна, С. М. Кукушкіна, Г. Д. Льон, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна // Клин. онкологія. – 2011. – № 4 (4). – С. 102–106. *(Особистий внесок дисертанта: проведення імунологічних досліджень у хворих на МШ, обробка отриманих даних, участь у підготовці статті до друку.)*

4. Клинико-лабораторные критерии диагностики иммунной дисфункции у больных меланомой кожи / Ф. В. Фильчаков, С. Н. Кукушкина, Е. С. Шумилина, А. Д. Лён, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина, Ю. М. Ильченко // Онкология. – 2012. – Т. 14, № 2 (52). – С. 139–144. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз джерел літератури, обробка та узагальнення результатів імунологічних досліджень, написання та оформлення статті.)*

5. Комбинированная интерферонотерапия при первично-локализованной меланоме кожи / М. Н. Кукушкина, С. И. Коровин, С. Н. Кукушкина, Ф. В. Фильчаков, Е. С. Шумилина, А. Ю. Паливец, А. Д. Лён // Клин. онкология. – 2012. – № 7 (3). – С. 14–18. *(Особистий внесок дисертанта: проведення імунологічних досліджень у хворих на МШ, обробка отриманих даних, участь у підготовці статті до друку.)*

6. Імунологічні критерії прогнозу ефективності ад'ювантної інтерферонотерапії хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри / Ф. В. Фільчаков, К. С. Шуміліна, С. М. Кукушкіна, Г. Д. Льон, Л. Г. Югрінова, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна // Клин. онкология. – 2012. – № 8 (4). – С. 120–125. *(Особистий внесок дисертанта: проведення імунологічних досліджень у хворих на МШ, обробка отриманих даних, написання та оформлення статті.)*

7. Клініко-лабораторні критерії прогнозу прогресування захворювання в процесі інтерферонотерапії у хворих на меланому шкіри з метастазами в регіонарні лімфатичні вузли / Ф. В. Фільчаков, Г. Д. Льон, С. М. Кукушкіна, К. С. Шуміліна, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна, Т. С. Вітрук // Клин. онкология. – 2013. – № 1 (9). – С. 20–23. *(Особистий внесок дисертанта: проведення імунологічних досліджень у хворих на МШ, обробка та узагальнення отриманих даних, написання статті.)*

8. Неoadьювантная интерферонотерапия в лечении больных с регионарными лимфогенными метастазами меланомы кожи / С. И. Коровин, Ф. В. Фильчаков, М. Н. Кукушкина, А. Ю. Паливец, В. В. Остафийчук, Е. С. Шумилина, С. Н. Кукушкина // Клин. онкология. – 2013. – № 3 (11). – С. 44–47. *(Особистий внесок дисертанта: проведення лабораторних досліджень у хворих на МШ, обробка та узагальнення отриманих даних, написання статті.)*

9. Иммунологический профиль больных меланомой кожи в зависимости от наличия изъязвления первичной опухоли и статуса «сторожевых» лимфатических узлов / Ф. В. Фильчаков, С. Н. Кукушкина, Е. С. Шумилина, А. Д. Лён, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 3. – С. 61–67. *(Особистий внесок дисертанта: добір та аналіз наукової літератури, проведення та оцінка результатів імунологічних досліджень у хворих на МШ, написання та оформлення статті.)*

10. Локальный иммунный ответ у больных меланомой кожи: связь с эффективностью интерферонотерапии / Ф. В. Фильчаков, А. Н. Грабовой, А. Д. Лён, С. Н. Кукушкина, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина, В. Н. Весельская, Л. Н. Таран // Клин. онкология. – 2014. – № 4 (16). – С. 12–16. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз джерел літератури, обробка отриманих даних, участь у підготовці статті до друку.)*

11. Иммунологические параметры в оценке эффективности интерферонотерапии больных меланомой кожи / Ф. В. Фильчаков, С. Н. Кукушкина, А. Д. Лён, Е. С. Шумилина, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина // Евразийский онкол. журн. – 2015. – № 1 (04). – С. 73–83. *(Особистий внесок дисертанта: добір та аналіз наукової літератури, проведення та оцінка результатів імунологічних досліджень у хворих на МШ, участь у підготовці статті до друку.)*

12. Імунореактивність у хворих на меланому шкіри: зв'язок з морфологічними ознаками виразкування первинної пухлини та віддаленими результатами комбінованого лікування / С. М. Кукушкіна, Ф. В. Фільчаков, С. І. Коровін, О. М. Грабовий, М. М. Кукушкіна, В. М. Весельська // Клин. онкологія. – 2017. – № 1 (25). – С. 73–78. *(Особистий внесок дисертанта: добір та аналіз наукової літератури, обробка та узагальнення результатів власних досліджень, написання та оформлення статті.)*

13. Ад'ювантна інтерферонотерапія хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри : метод. рекомендації / С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна, Ф. В. Фільчаков, К. С. Шуміліна, С. М. Кукушкіна, Г. Д. Лён. – Київ, 2013. – 16 с.

14. The effect of interferon-gamma on parameters of immune system in malignant melanoma patients / F. V. Filchakov, K. S. Shumilina, S. M. Kukushkina, G. D. Lon, S. I. Korovin, M. M. Kukushkina, T. S. Vitruk // Tumor and host: novel aspects of old problem : international conf., 21–24 September, 2010, Kyiv, Ukraine. – Exp. oncology. – 2010. – Vol. 32 (suppl.). – P. 87–88.

15. Дисфункція імунної системи у хворих на меланому шкіри / Ф. В. Фільчаков, С. М. Кукушкіна, К. С. Шуміліна, Г. Д. Лён, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна, Н. М. Покрасьон // XII з'їзд онкологів України, 20–22 вересня 2011 р., Судак, АР Крим : матеріали. – Клин. онкологія. – 2011. – Спец. вып. II. – С. 125.

16. Изменение показателей иммунной системы у больных меланомой кожи под влиянием интерферонотерапии / Ф. В. Фильчаков, Е. С. Шумилина, С. Н. Кукушкина, А. Д. Лён, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина // XIII Українська науково-практична конференція з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації : тези доп., 26–27 квітня 2012 р., Київ. – Імунологія та алергологія: наука та практика. – 2012. – Додаток № 1. – С. 123.

17. Влияние различных схем интерферонотерапии на иммунореактивность больных меланомой кожи с метастазами в регионарные лимфатические узлы / Е. С. Шумилина, Ф. В. Фильчаков, С. Н. Кукушкина, А. Д. Лён, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина // VII съезд онкологов и радиологов стран СНГ, 5–7 сентября 2012 г., Астана : материалы съезда. – Астана, 2012. – С. 260.

18. Кукушкина С. Н. Противоопухолевые клетки-эффекторы в крови больных меланомой кожи / С. Н. Кукушкина // Современные методы диагностики и лечения больных злокачественными новообразованиями : конф. молодых ученых, 10–11 мая 2012 г., Киев. – Клин. онкология. – 2012. – № 6 (2). – С. 148–149.

19. Combined γ - and $\alpha 2b$ -interferonotherapy vs $\alpha 2b$ -interferonotherapy in patients with stage IB-IIIC of skin melanoma / S. Korovin, M. Kukushkina, A. Palivets, F. Filchakov, S. Kukushkina, G. Lon // Interdisciplinary Global Conference on Developing

New Treatments for Melanoma, 21–22 June, 2012, Munich, Germany : abstr. – Munich, 2012. – P. 5.

20. Alfa2b-interferonotherapy is currently the standard of care for patients with high risk for relapse. Alfa2b-IFN has shown disease-free survival benefits but no significant improvement in overall survival / M. Kukushkina, S. Korovin, F. Filchakov, S. Kukushkina, K. Shumilina, A. Palivets, G. Lon // 6th World Meeting of Interdisciplinary Melanoma Skin Cancer Centres & 8th EADO Congress, 14–17 November, 2012, Barcelona, Spain : abstr. – Barcelona, 2012. – P. 32.

21. Иммунологические изменения у больных меланомой кожи с изъязвлением первичной опухоли / С. Н. Кукушкина, Ф. В. Фильчаков, Е. С. Шумилина, А. Д. Лён, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи : материалы междунар. конф., 27–29 июня 2013 г., Санкт-Петербург. – Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 2. – С. 83.

22. Иммунологический мониторинг больных меланомой кожи в динамике интерферонотерапии / С. Н. Кукушкина, Ф. В. Фильчаков, Е. С. Шумилина, А. Д. Лён, С. И. Коровин, М. Н. Кукушкина // Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України : III Міжнар. мед. конгрес, 14–16 жовтня 2014 р., Київ : матеріали конгресу. – Київ, 2014. – С. 42.

23. Локальна протипухлинна імунна відповідь у хворих на меланому шкіри: зв'язок з ефективністю інтерферонотерапії / С. М. Кукушкіна, Ф. В. Фільчаков, О. М. Грабовий, Г. Д. Льон, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна, В. М. Весельська, Л. М. Таран // Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України: IV Міжнар. мед. конгрес, 15–17 квітня 2015 р., Київ : матеріали конгресу. – Київ, 2015. – С. 28.

24. Лімфоцитарна інфільтрація меланоми шкіри та ефективність інтерферонотерапії / Ф. В. Фільчаков, О. М. Грабовий, Г. Д. Льон, С. М. Кукушкіна, С. І. Коровін, М. М. Кукушкіна, В. М. Весельська, Л. М. Таран // Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах : тези наук.-практ. конф., 22–23 жовтня 2015 р., Київ. – Онкологія. – 2015. – Т. 17, № 3 (65). – С. 219–220.

25. Kukushkina M. Features of immunoreactivity in skin melanoma patients / M. Kukushkina, S. Kukushkina // The European Cancer Congress 2015, 25 September, 2015, Vienna, Austria : materials of congress. – Режим доступу : <http://www.poster-submission.com/ECC2015/visitors/carousel>.

26. Пат. на корисну модель 70190, Україна, МПК G 01 N 33/00. Спосіб оцінки біологічної відповіді організму онкологічних хворих на імунотерапію / Фільчаков Ф. В., Льон Г. Д., Шуміліна К. С., Кукушкіна С. М., Коровін С. І., Кукушкіна М. М. ; заявник та патентовласник Національний інститут раку. – № u2011 15286 ; заявл. 23.12.11 ; опубл. 25.05.12. – Бюл. 10.

27. Пат. на корисну модель 79751, Україна, МПК G 01 N 33/00. Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри / Кукушкіна С. М., Фільчаков Ф. В., Шуміліна К. С., Льон Г. Д., Коровін С. І., Кукушкіна М. М. ; заявник та патентовласник Національний інститут раку. – № u2012 13699 ; заявл. 30.11.12 ; опубл. 25.04.13. – Бюл. 8.

28. Пат. на корисну модель 85577, Україна, МПК G 01 N 33/53. Спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри / Кукушкіна С. М., Фільчаков Ф. В., Шуміліна К. С., Льон Г. Д., Коровін С. І., Кукушкіна М. М. ; заявник та патентовласник Національний інститут раку. – № u2013 06460 ; заявл. 24.05.13 ; опубл. 25.11.13. – Бюл. 22.

29. Пат. на корисну № 112532, Україна, МПК G 01 N 33/53. Спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на меланому шкіри / Фільчаков Ф. В., Кукушкіна С. М., Коровін С. І., Кукушкіна М. М. ; заявник та патентовласник Національний інститут раку. – № u2016 05200 ; заявл. 13.05.16 ; опубл. 26.12.16. – Бюл. 24.

АНОТАЦІЯ

Кукушкіна С.М. Імунологічні критерії прогнозу ефективності інтерферонотерапії у хворих на меланому шкіри. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія. – Національний інститут раку, Київ, 2018.

Дисертація присвячена питанням прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на МШ на основі визначення особливостей змін в їх імунній системі під впливом ІФН-терапії.

Розроблено клініко-лабораторні критерії дисфункції імунної системи у хворих на МШ залежно від стадії захворювання. Отримано нові наукові дані щодо особливостей стану імунної системи у хворих на МШ з урахуванням наявності виразкування первинної пухлини та статусу «сторожових» ЛВ. Вивчено вплив різних схем ІФН-терапії (ІФН- $\alpha 2b$ проти ІФН- γ + ІФН- $\alpha 2b$; ад'ювантний проти неoad'ювантного режиму) на імунну систему хворих на ПЛМ та ММРЛВ в динаміці комбінованого лікування. Визначені популяції лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, та імунологічні показники периферичної крові, за допомогою яких можна прогнозувати ефективність ІФН-терапії у хворих на ПЛМ та ММРЛВ.

Ключові слова: меланома шкіри, виразкування первинної пухлини, ад'ювантна і неoad'ювантна інтерферонотерапія, інтерферон- $\alpha 2b$, інтерферон- γ , імунна відповідь, фактори прогнозу.

ABSTRACT

Kukushkina S.M. Immunological criteria for predicting the efficacy of interferon therapy in melanoma patients. – Manuscript.

Thesis for the Candidate of Medical Sciences degree, specialty 14.01.07 – Oncology. – National Cancer Institute, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the problems of predicting the efficacy of combined treatment of skin melanoma patients by identifying the peculiarities of changes in their immune system under the influence of interferon therapy.

Clinical laboratory criteria of immune system dysfunction in skin melanoma patients depending on the disease stage have been determined. New scientific data

on the immune system features in skin melanoma patients taking into account the presence of primary tumor ulceration and sentinel lymph node status have been obtained. The impact of various interferon therapy schemes (interferon- α 2b versus interferon- γ + interferon- α 2b; adjuvant versus neoadjuvant regimen) on the immune system of primary localized melanoma and regional metastatic melanoma patients in the dynamics of combined treatment has been studied. The tumor infiltrating lymphocyte subsets and peripheral blood immunological parameters have been established, which can help to predict the efficacy of interferon therapy in primary localized melanoma and regional metastatic melanoma patients.

Key words: skin melanoma, primary tumor ulceration, adjuvant and neoadjuvant interferon therapy, interferon- α 2b, interferon- γ , immune response, prognostic factors.

АННОТАЦИЯ

Кукушкина С.М. Иммунологические критерии прогноза эффективности интерферонотерапии у больных меланомой кожи. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Национальный институт рака, Киев, 2018.

Диссертация посвящена вопросам прогнозирования эффективности комбинированного лечения больных меланомой кожи на основе определения особенностей изменений в их иммунной системе под влиянием интерферонотерапии.

Разработаны клинико-лабораторные критерии дисфункции иммунной системы у больных меланомой кожи в зависимости от стадии заболевания. Получены новые научные данные об особенностях состояния иммунной системы у больных с клиническими признаками первично-локализованной меланомы кожи с учетом наличия изъязвления первичной опухоли и статуса «сторожевых» лимфатических узлов. Установлено, что наиболее существенные различия иммунологических показателей периферической крови (содержание естественных киллерных клеток, процент CD95⁺-, CD25⁺-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток, соотношение В1-лимфоцитов/В2-лимфоцитов, уровень анти-CD3-индуцированного ответа Т-лимфоцитов) у пациентов без и с изъязвлением меланомы кожи наблюдаются при отсутствии микрометастазов в «сторожевых» лимфатических узлах.

Изучено влияние различных схем интерферонотерапии на иммунную систему больных первично-локализованной меланомой кожи и больных меланомой кожи с метастазами в регионарных лимфатических узлах в динамике комбинированного лечения. Установлено, что число случаев развития метастазов на фоне проводимого лечения у больных как первично-локализованной меланомой, так и меланомой с метастазами в регионарных лимфатических узлах не зависит от применяемой схемы интерферонотерапии. Преимуществом применения сочетанной терапии интерфероном- γ (500 тыс. международных единиц через день, 5 инъекций) и интерфероном- α 2b (3 млн международных единиц 3 раза в неделю в течение 12 мес.) у больных первично-локализованной меланомой кожи перед курсом интерферона- α 2b (как указано выше) являются предотвращение снижения

количества циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов, сохранение на постоянном уровне содержания В1-лимфоцитов, восстановление митоген-индуцированной пролиферации Т-клеток *in vitro* и усиление их способности продуцировать фактор, угнетающий миграцию лейкоцитов.

У больных меланомой кожи с метастазами в регионарных лимфатических узлах последовательное применение индукционного и поддерживающего курсов интерферона- $\alpha 2b$ (соответственно 9 млн международных единиц ежедневно в течение 23 дней и 3 млн международных единиц 3 раза в неделю в течение 12 мес.) в адьювантном режиме, в отличие от схемы иммунотерапии с индукционным курсом интерферона- $\alpha 2b$ в неoadьювантном режиме, способствует сохранению в пределах нормальных значений содержания цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллерных клеток и снижению процента регуляторных Т-клеток.

Определены популяции лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в сочетании с иммунологическими показателями периферической крови, с помощью которых можно прогнозировать эффективность интерферонотерапии у больных первично-локализованной меланомой кожи и меланомой кожи с метастазами в регионарных лимфатических узлах. Установлено, что благоприятное течение заболевания на фоне интерферонотерапии у больных первично-локализованной меланомы кожи ассоциируется с высокой инфильтрацией паренхимы первичной опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами ($CD8^+$) и/или ее стромы Т-клетками иммунологической памяти ($CD45RO^+$).

У больных первично-локализованной меланомы кожи критериями прогноза неблагоприятного течения заболевания на фоне ИФН-терапии являются снижение в первые 3 мес. адьювантной интерферонотерапии абсолютного количества $CD25^+$ -лимфоцитов в периферической крови и уменьшение способности циркулирующих Т-клеток продуцировать фактор, угнетающий миграцию лейкоцитов. У больных меланомой кожи с метастазами в регионарных лимфатических узлах такими критериями являются повышение в периферической крови в первые 3 мес. адьювантной интерферонотерапии относительного количества Т-клеток, снижение доли естественных киллерных клеток, регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low-neg}$) и $CD25^+$ -Т-хелперов и усиление *in vitro* митоген-индуцированной пролиферации лимфоцитов в ответ на митоген.

Ключевые слова: меланома кожи, изъязвление первичной опухоли, адьювантная и неoadьювантная интерферонотерапия, интерферон- $\alpha 2b$, интерферон- γ , иммунный ответ, факторы прогноза.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДІ	– довірчий інтервал
ІФН	– інтерферон (тип: α , γ)
ІФН-терапія	– інтерферонотерапія
ЛВ	– лімфатичні вузли
ЛПК	– лімфоцити периферичної крові
МШ	– меланома шкіри
ММРЛВ	– меланома шкіри з метастазами в регіонарних лімфатичних вузлах
МО	– міжнародна одиниця
ПЗЛ	– практично здорові люди
ПЛМ	– первинно-локалізована меланома шкіри
ПКК	– природні кілерні клітини
Трег	– регуляторні Т-клітини
ум. од.	– умовні одиниці
ФГА	– фітогемаглютинін
ЦІ	– цитотоксичний індекс
ЦТЛ	– цитотоксичні Т-лімфоцити
AUC	– площа під ROC-кривою (area under ROC curve)

ДЛЯ НОТАТОК