

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНОГО И ПУЛИРОВАННОГО АНТИГЕНОВ В КОМБИНИРОВАННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ГЛИБЛАСТОМОЙ

DOI: 10.17691/stm2020.12.2.04

УДК 57:616.89–006.6:615.37

Поступила 5.02.2019 г.



С.В. Мишинов, к.м.н., старший научный сотрудник¹;

А.Я. Будник, врач-ординатор¹;

В.В. Ступак, д.м.н., профессор, начальник научно-исследовательского отделения нейрохирургии¹;

О.Ю. Леплина, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии²;

Т.В. Тыринова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии²;

А.А. Останин, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии²;

Е.Р. Черных, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии²

¹Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава РФ, ул. Фрунзе, 17, Новосибирск, 630091;

²Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, ул. Ядринцевская, 14, Новосибирск, 630099

Стандарт лечения глиобластом, включающий тотальную хирургическую резекцию, химио- и лучевую терапию, несмотря на значительный прогресс, позволяет добиваться значимого увеличения продолжительности жизни лишь у немногих пациентов. Этот факт обуславливает необходимость поиска новых лечебных воздействий, одним из которых является иммунотерапия.

Цель исследования — оценить эффективность комбинированного использования аутологичного и пулированного антигенов в комплексном лечении больных глиобластомой.

Материалы и методы. Все пациенты (n=58, из них 30 мужчин и 28 женщин в возрасте 18–70 лет) были рандомизированы на три группы, в двух из которых в дополнение к запланированному по стандарту комплексному лечению применялась иммунотерапия, основанная на активации специфического противоопухолевого иммунного ответа с помощью дендритных клеток, активированных аутологичными (первый протокол) или пулированными (второй протокол) опухолевыми антигенами. Пациенты 3-й (контрольной) группы получали стандартное комплексное лечение, заключающееся в максимально допустимой резекции опухоли с последующими курсами лучевой и химиотерапии.

Результаты. Переносимость обоих протоколов иммунотерапии была хорошей: не отмечено анафилактических реакций и досрочно выбывших из исследования пациентов. При окончательном анализе полученных данных не выявлено статистически значимой разницы между медианами выживаемости пациентов каждой из трех групп. Однако при анализе индекса качества жизни у пациентов 2-й группы отмечена тенденция к улучшению показателя Карновского.

Заключение. Исследование показало, что представленные протоколы иммунотерапии обладают потенциалом к улучшению качества жизни пациентов и являются безопасными для клинического применения. Однако данные выводы следует считать промежуточными до получения результатов мультицентровых рандомизированных клинических исследований с большим количеством пациентов.

Ключевые слова: глиобластома; иммунотерапия; дендритные клетки; продолжительность жизни при глиобластоме; аутологичные антигены; пулированные антигены.

Для контактов: Мишинов Сергей Валерьевич, e-mail: smishinov@yandex.ru

Как цитировать: Mishinov S.V., Budnik A.Ya., Stupak V.V., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Autologous and pooled tumor lysates in combined immunotherapy of patients with glioblastoma. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(2): 34–42, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.2.04>

English

Autologous and Pooled Tumor Lysates in Combined Immunotherapy of Patients with Glioblastoma

S.V. Mishinov, PhD, Senior Researcher¹;

A.Ya. Budnik, Resident¹;

V.V. Stupak, MD, DSc, Professor, Head of Neurosurgery Research Department¹;

O.Yu. Leplina, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy²;

T.V. Tyrinova, PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy²;

A.A. Ostanin, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy²;

E.R. Chernykh, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy²

¹Novosibirsk Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsvivan of the Ministry of Health of the Russian Federation, 17 Frunze St., Novosibirsk, 630091, Russia;

²Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, 14 Yadrintsevskaya St., Novosibirsk, 630099, Russia

Although major progress has been made in the standard treatment for glioblastomas, encompassing the maximal surgical resection, chemotherapy and radiation therapy, it is possible to increase survival rates significantly only in a few patients. Therefore, it is necessary to explore new therapeutic modalities, one of which is immunotherapy.

The aim of the study was to evaluate the efficacy of the combined use of autologous and pooled tumor lysates in comprehensive treatment of patients with glioblastoma.

Materials and Methods. All patients (n=58, including 30 males and 28 females aged 18–70 years) were randomized into three groups, two of which received immunotherapy based on injection of autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor lysates (first protocol) or pooled lysates (second protocol) from more than one tumor, in addition to the planned standard treatment. The patients of group 3 (control) received the standard comprehensive treatment encompassing the maximum safe tumor resection followed by radiation therapy and chemotherapy.

Results. The tolerability of both applied immunotherapy protocols was good: there were no anaphylactic reactions observed or patients who prematurely discontinued participation in the study. The final analysis of the data revealed no significant differences in median survival values of patients in each of the three groups. However, when analyzing the Karnofsky Performance Status in patients of group 2, it was found that it tended to improve.

Conclusion. The study shows that the proposed immunotherapy protocols are safe for clinical use and have the potential to improve the patient's life quality. However, these findings should be considered intermediate until the findings of multicenter randomized clinical trials with a larger number of patients are obtained.

Key words: glioblastoma; immunotherapy; dendritic cells; overall survival of glioblastoma patients; autologous tumor lysate; pooled tumor lysate.

Введение

Глиобластома как первичное злокачественное новообразование головного мозга наиболее часто встречается во взрослой популяции [1–4], однако может быть обнаружена у пациента любого возраста [4]. Эта опухоль составляет приблизительно 15% всех первичных опухолей головного мозга и около 45–50% всех первичных злокачественных новообразований головного мозга [4]. В странах Европы, Северной Америки и Австралии встречаемость глиобластомы составляет от 3 до 10 случаев на 100 000 населения в год [1, 5]. Точных показателей заболе-

ваемости глиобластомой в России в литературе мы не обнаружили. Вероятно, это связано с отсутствием единого реестра таких опухолей [6]. Глиобластома является смертельным заболеванием, большинство пациентов погибают в течение 15 мес после установления диагноза [7]. Преимущественно поражаются люди старшей возрастной группы, пик заболеваемости приходится на пациентов 55–85 лет [4].

За последние десятилетия в лечении глиобластомы достигнуты определенные успехи, однако даже сочетание максимальной хирургической резекции, радио- и химиотерапии темозоломидом, что в настоящее время является стандартом лечения, позволило

добиться лишь пятипроцентной средней пятилетней выживаемости, в том числе вследствие высокой степени устойчивости глиобластомы к данным терапевтическим воздействиям [8, 9].

Рецидивы возникают у подавляющего большинства пациентов. Резистентность к терапии обусловлена различными факторами [4, 9]:

1) наличие частично сохраненного гематоэнцефалического барьера в опухолевой ткани препятствует проникновению в нее противоопухолевых препаратов;

2) инвазивные свойства клеток глиобластомы позволяют им распространяться на большие расстояния в пределах ЦНС и оставаться огороженными intactным гематоэнцефалическим барьером;

3) гетерогенность клеток опухоли и их геномная нестабильность приводят к возникновению клональных популяций резистентных клеток, что, в свою очередь, обуславливает необходимость мониторинга этих процессов;

4) наличие популяции опухоль-иницирующих или стволоподобных клеток может служить резервуаром резистентности;

5) опухолевая прогрессия может индуцировать вторичные онкогенные изменения.

Известна также способность клеток глиобластомы избегать иммунного ответа организма хозяина посредством экспрессии различных иммуносупрессивных факторов и инициации апоптоза эффекторных Т-лимфоцитов [10]. К таким факторам относят индолламин 2,3-диоксигеназу (IDO), трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β), а также трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3). В частности, IDO катализирует превращение триптофана в кинуренин, который в свою очередь запускает апоптоз эффекторных Т-клеток и иммуносупрессию, опосредованную регуляторными Т-клетками (Treg). Клетки глиом продуцируют также хемокин CCL2, который служит аттрактантом регуляторных Т-клеток [11]. Клетки Treg являются субпопуляцией CD4⁺ Т-лимфоцитов, которые экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3, CD25-рецептор (CD25⁺), высокоаффинный к IL-2, и цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA4). Эффекты CTLA-4 наблюдаются преимущественно в наивных и покоящихся Т-лимфоцитах и опосредуют супрессию Т-киллеров, дополняя ингибиторную активность Treg — клеток, ответственных за поддержание иммунологической толерантности в течение жизни [10–14]. Клетки Treg накапливаются в глиомах и перифокальной зоне в течение всей опухолевой прогрессии, при этом интенсивность инфильтрации коррелирует со степенью злокачественности опухолей [15, 16]. Установлено, что клетки Treg экспрессируют на своей поверхности B7-H1 (синоним — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели PD-L1). Этот трансмембранный белок является негативной ко-стимуляторной молекулой и действует в качестве ингибитора пролиферации и индуктора гибели антиген-специфических на CD8⁺ Т-клеток. Клетки Treg играют

важную роль в подавлении глиомами иммунного ответа, что подтверждено рядом исследований [17–19].

Опухолевые клетки были обнаружены в крови некоторых пациентов с глиобластомой [20], однако известной чертой этой опухоли является чрезвычайная редкость метастазирования за пределы ЦНС. Этот факт, а также то, что в трансплантированных реципиентах органов от доноров с глиобластомой на фоне проведения иммуносупрессивной терапии также развивалась эта опухоль [21], позволяет полагать, что в норме иммунная система подавляет метастатический потенциал циркулирующих в крови глиобластомных клеток.

Низкая подверженность данного новообразования стандартным терапевтическим и хирургическим воздействиям при высокой летальности все интенсивнее стимулирует научный поиск альтернативных методов лечения. В последнее десятилетие разрабатываются несколько потенциально перспективных методик, в частности таргетная и иммунотерапия [7].

К методам иммунотерапии, используемым в лечении опухолей, относят применение опухолеспецифических Т-клеточных вакцин, инъекций сенсibilизированных дендритных клеток, пептидных вакцин, а также иммуновиротерапию [22–24]. Существует относительно небольшое количество завершенных клинических испытаний, посвященных применению иммунотерапии в лечении пациентов с глиобластомой. Тем не менее данные по этой проблеме постепенно накапливаются. Так, в небольшом когортном исследовании С.Е. Fadul и соавт. [25] еще в 2011 г. показали наличие иммунного ответа и увеличение выживаемости у пациентов, которым вводились аутологичные сенсibilизированные дендритные клетки. Существуют и более современные работы, результаты которых указывают на перспективность иммунотерапевтических методов в лечении таких пациентов [26, 27].

Цель исследования — оценить эффективность комбинированного использования аутологичного и пулированного антигенов в комплексном лечении больных глиобластомой.

Решались следующие задачи:

сравнительная оценка переносимости и безопасности проводимой комбинированной иммунотерапии (КИТ) по двум различным протоколам в комплексном лечении больных с гистологически верифицированной супратенториальной глиобластомой;

сравнение кривых выживаемости больных в группах с и без применения КИТ, а также в группах с иммунотерапией, в которых использовали первый или второй протоколы КИТ.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 58 пациентов нейрохирургического отделения Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, из них 30 мужчин и 28 женщин. Критерии включения: возраст от 18 до 70 лет, морфо-

логически верифицированный диагноз глиобластомы (Grade IV), максимальный допустимый объем резекции опухоли, индекс качества жизни (ИКЖ) при начале КИТ не менее 60 баллов по шкале Карновского, отсутствие иных онкологических заболеваний, отсутствие иммунодефицитных состояний, отсутствие тяжелой и/или декомпенсированной сопутствующей патологии. Критерии исключения вне зависимости от этапа проведения КИТ: возникновение анафилактической реакции, отказ больного от терапии.

На каждого больного заводилась индивидуальная электронная регистрационная карта, терапия начиналась после подписания информированного согласия на участие в пилотном исследовании.

Проведенная работа соответствует этическим стандартам Хельсинкской декларации (2013) и «Правилам надлежащей клинической практики, утвержденным Приказом Минздрава РФ от 1.04.2016 г. №200н. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Этическим комитетом Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии.

Оценку переносимости КИТ выполняли с использованием разработанной шкалы в течение всего периода проведения лечения один раз в неделю во время визита к специалисту. По сумме всех визитов выставляли балл, характеризующий наличие нежелательных явлений. Четыре балла соответствовали хорошей переносимости терапии, за наличие каждого признака, указанного в табл. 1, от исходных четырех отнимали один балл. Анафилактические реакции (анафилактический шок, отек Квинке) в критерии оценки не включались, поскольку они автоматически являлись признаками непереносимости лечения и неудовлетворительной оценки по предложенной шкале. В случае их развития терапия прекращалась, больные исключались из исследования. Оценка в три балла соответствовала удовлетворительной, два балла и менее — неудовлетворительной переносимости КИТ.

Безопасность определяли путем проведения лабораторных исследований: общих анализов крови и мочи, биохимического анализа крови.

В исследовании анализировались два различных протокола КИТ [28]: первый был основан на использовании собственного (аутологичного) опухолевого антигена, второй — на применении пулированного (аллогенного) антигена глиобластомы человека.

Первый протокол базировался на активации специфического противоопухолевого иммунного ответа. Иммунотерапия с использованием дендритно-клеточных вакцин соответствовала разработанному патенту [29].

Дендритные клетки больных получали *ex vivo* из моноцитарных предшественни-

ков. Для этого из 250–300 мл периферической крови, забираемой накануне оперативного вмешательства, выделяли фракцию мононуклеарных клеток в градиенте плотности фиколл-верографина. Эту фракцию обогащали по содержанию моноцитов путем двухчасового прилипания к пластику в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS; «БиолоТ», С.-Петербург). После этого прилипшие клетки инкубировали в течение 3 сут в полной культуральной среде в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF; 40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и интерферона-альфа (IFN- α ; 1000 Ед./мл, Роферон-А; Roche, Швейцария) при 37°C и 5% CO₂. Дозревание дендритных клеток (ДК) индуцировали добавлением азоксимера бромида (Полиоксидоний; «Петровакс Фарм», Россия) в дозе 2 нг/мл на 24 ч с последующей обработкой в течение 1 ч лизатом аутологических опухолевых клеток в дозе 5 мг/мл по белку.

Для получения лизата фрагменты опухоли пациентов, удаленной во время нейрохирургического вмешательства, подвергали 5-кратной процедуре замораживания/размораживания, а затем после центрифугирования полученной суспензии отбирали надосадочную жидкость и определяли в ней концентрацию высвободившихся опухолевых антигенов (мг/мл по белку). Опухолевые лизаты пациентов (как источник полного набора опухолевых антигенов) хранили при –20°C.

Полученные таким образом антиген-нагруженные ДК консервировали в криорастворе, содержащем 10% диметилсульфоксид — ДМСО (Sigma-Aldrich, США) и 90% раствор альбумина человека («Микроген», Россия), и хранили при –80°C до момента проведения процедур вакцинации. Вакцинация ДК в виде 4–6 подкожных инъекций со средней дозой 5·10⁶ кл. с кратностью 1 раз в 2 нед была запланирована к применению совместно с химиотерапией после проведения стандартной лучевой терапии, однако не исключалась и в случаях, когда пациенты не получали полного стандартного объема лечения, поскольку для них уже были заготовлены вакцины на этапе госпитализации и хирургического лечения. В качестве адьюванта

Т а б л и ц а 1
Совокупная оценка переносимости комбинированной иммунотерапии

Оценка	Признаки непереносимости
–1 балл	Гипертермия выше 38°C более 1 сут с начала проведения комбинированной иммунотерапии
–1 балл	Локальные и системные кожные реакции (сыпь, гиперемия) и/или наличие локального и системного зуда
–1 балл	Появление «новых» жалоб (тошнота, слабость, головокружение, головные боли) на фоне проведения комбинированной иммунотерапии

использовали рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин; «Биотех», С.-Петербург), который вводили подкожно в дозе 250 000 ЕД рядом с местом введения вакцины.

Второй протокол был также направлен на активацию специфического противоопухолевого иммунного ответа, но отличался тем, что забор 250–300 мл периферической крови для генерации ДК по протоколу планировали не накануне оперативного вмешательства, а на этапе, предшествующем химиотерапии. В случае, если больной по каким-либо причинам не получал полного объема полагающегося стандартного комплексного лечения, он не исключался из группы и ему также вводилась вакцина, поскольку, согласно дизайну, неполный объем комплексного лечения не являлся критерием исключения из исследования.

Второй протокол отличался еще одним значимым фактором: дозревание ДК осуществляли с помощью нагрузки лизатом (5 мг/мл по белку) пулированных опухолевых антигенов, полученных от различных пациентов во время ранее проведенных нейрохирургических вмешательств. Лизат получали по описанной выше методике в первом протоколе. После одночасовой нагрузки опухолевыми антигенами в трехсуточные культуры незрелых ДК добавляли азоксимер бромида (2 нг/мл) на 24 ч. Криоконсервацию и хранение полученных таким образом ДК осуществляли стандартно.

Иммунотерапия модифицированного протокола включала два курса вакцинаций. Первый курс состоял из 4–6 подкожных инъекций ДК в межлопаточную область (средняя доза — $5 \cdot 10^6$ кл.), нагруженных пулированными опухолевыми антигенами с двухнедельным интервалом (общей продолжительностью 3 мес). Второй курс проводили после завершения первого, он состоял из 4–6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц и общей продолжительностью 6 мес. В качестве адъюванта использовали рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин). Вакцинации выполняли подкожно в межлопаточную область в 4 точки, IL-2 вводили аналогичным образом в 4 точки рядом с местом введения вакцины.

Все больные были разделены на три группы: 1-я (n=18) и 2-я (n=9) группы получали КИТ по первому и второму протоколу соответственно. Лечение проводили в дополнение к запланированным стандартным

лучевой и химиотерапии. В 3-й группе (n=31) больным выполняли хирургическое лечение и была запланирована стандартная комплексная терапия без КИТ.

Все пациенты были оперированы с начала 2014 г. на базе нейрохирургического отделения №1 Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна с применением идентичных оперативных методик. Выполнялась максимальная допустимая резекция опухолевой ткани в условиях оптического увеличения микроскопом OPMI Vario 33 (Carl Zeiss, Германия) с применением интраоперационной навигации и нейрофизиологического мониторинга (по показаниям). Во всех случаях проводили забор операционного материала для выполнения гистологического исследования. Если пациент был рекрутирован в 1-ю группу, выполняли также забор опухолевого материала объемом не менее 2 см³ для использования в качестве аутологичного антигена в генерации ДК в рамках первого протокола КИТ. Забранный материал помещали в герметичный контейнер с физиологическим раствором и незамедлительно транспортировали в иммунологическую лабораторию. После оперативного вмешательства в первые 48 ч всем пациентам выполняли контрольное МРТ-исследование для объективной оценки степени резекции опухоли.

Введение ДК-вакцин, согласно разработанному дизайну, было запланировано ко времени после завершения прохождения больными курса лучевой терапии, что обуславливалось возможным наличием иммуносупрессии, а также приемом синтетических глюкокортикоидов. Однако в тех случаях, когда больные не получали полного объема стандартного комплексного лечения, они не исключались из исследования. Им применяли КИТ в зависимости от того, в какой протокол исходно были рекрутированы эти пациенты.

Синтетические глюкокортикоиды (дексаметазон) на этапе хирургического лечения назначали только симптоматически, по показаниям, доза препарата варьировала от 4 до 24 мг/сут. Таким образом, во всех трех группах был ряд больных, которые не получали указанного препарата. На этапе проведения лучевой терапии всем пациентам был назначен дексаметазон в таблетированной форме в средней дозе 4 мг/сут.

Статистическая обработка данных.

Рандомизация больных проходила на завершающем этапе формирования дизайна исследования методом выпадения случайных чисел в программном обеспечении Random Number Generator 1.4. Состав групп исследования приведен в табл. 2. Результаты анализировали с применением программного обеспечения Statistica 10.0 (Statsoft Inc., США).

С учетом малой популяционной выборки исследования дискретные переменные анализировали при помощи непараметрического рангового метода

Т а б л и ц а 2

Характеристика групп больных

Показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа (без комбинированной иммунотерапии)
Общее количество больных:	18	9	31
мужчины	10	2	18
женщины	8	7	13
Средний возраст, лет	53,3	52	56,2
Индекс качества жизни при начале комбинированной иммунотерапии, баллы (Me [25; 75])	60 [50; 70]	70 [70; 80]	60 [40; 80]

Уилкоксона–Манна–Уитни. Выживаемость пациентов оценивали при помощи построения кривых по методу Каплана–Майера. Частотные переменные анализировали с применением метода χ^2 . Уровень альфа для выработки решения о принятии либо отклонении нулевой гипотезы был принят равным 0,05.

Значения возраста представлены в виде среднего значения, значения ИКЖ — в виде медианы (Me), а также первого и третьего квартилей [Q1; Q3].

Результаты

При анализе кривых общей выживаемости получены статистически значимые различия в показателях медиан между 1-й и 3-й ($p < 0,05$), а также 2-й и 3-й ($p < 0,05$) группами (рис. 1). Между 1-й и 2-й группами статистически значимых различий не отмечено ($p > 0,05$). Вместе с тем установлено, что среди больных 3-й группы (без иммунотерапии) 55% пациентов не получили полного объема стандартного комплексного лечения (лучевой и/или химиотерапии), одновременно в 1-й и 2-й группах преобладали больные с рецидивом заболевания: 72 и 67% соответственно. С учетом данного факта опираться на кривые общей выживаемости для формирования выводов не совсем корректно, поскольку статистически значимое различие в медианах выживаемости могло быть обусловлено указанными факторами. В связи с этим кривые выживаемости были оценены только у той части больных, которые получили комплексное лечение (лучевую и химиотерапию) в полном объеме. Сформированные по новому принципу группы ($n_1=12, n_2=7, n_3=10$) не отличались по полу, возра-

сту и ИКЖ. Также эти группы не отличались по средним значениям курсовых доз глюкокортикоидов, получаемых как на этапе хирургического лечения, так и на этапе лучевой терапии.

В группах с иммунотерапией по-прежнему преобладали больные с рецидивом заболевания: 10 из 12 — в группе 1 и 5 из 7 — в группе 2, в то время как в группе 3 больных с рецидивом было всего 2 из 10. Данные показатели статистически значимо отличали

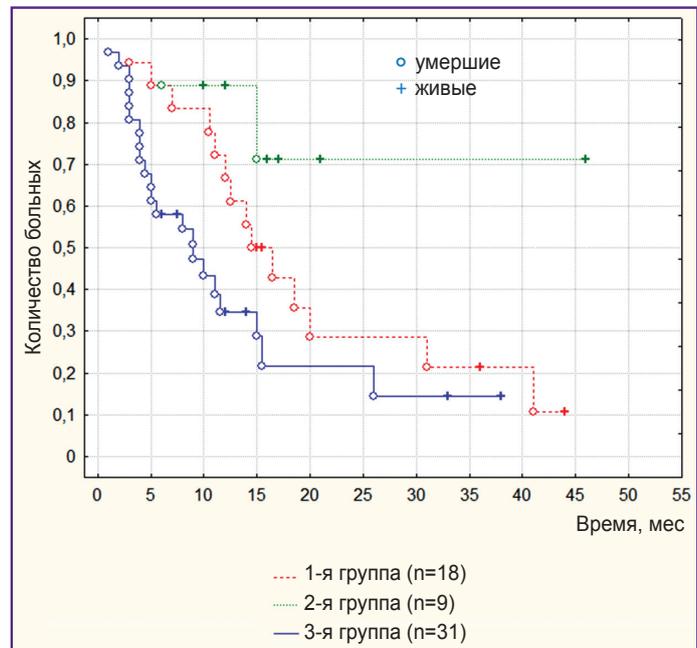


Рис. 1. Кривые общей выживаемости в первоначально отобранных группах больных

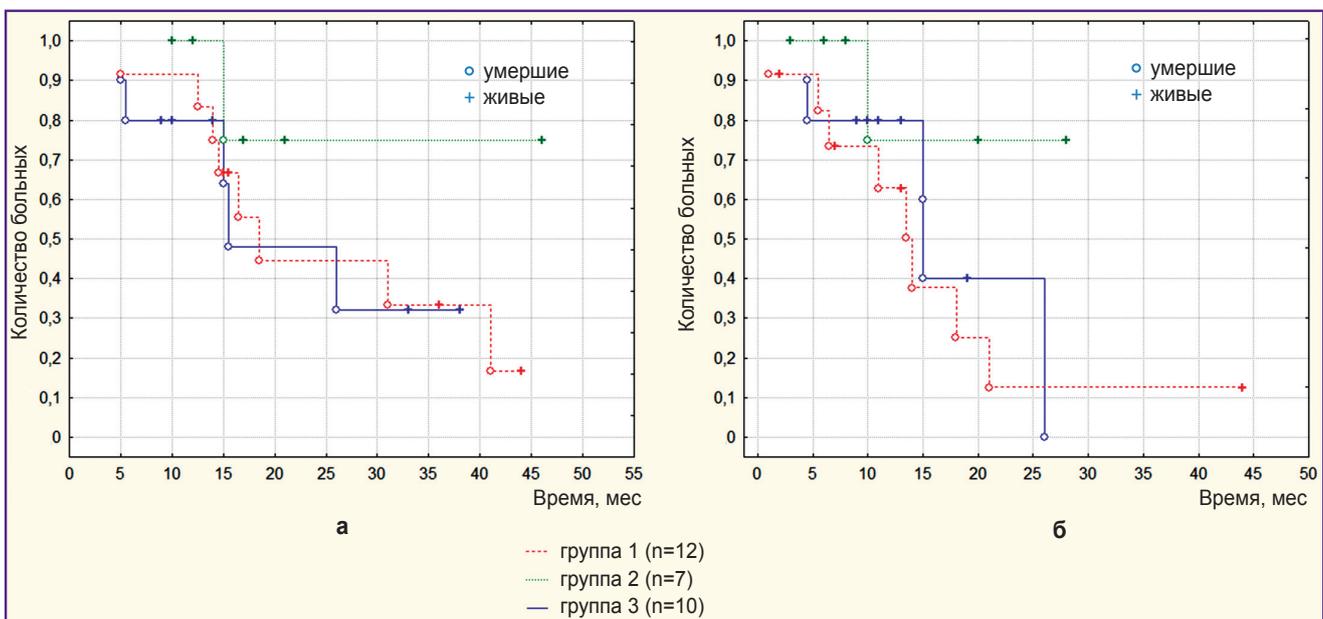


Рис. 2. Выживаемость во вновь сформированных группах больных, получивших стандартное комплексное лечение: а — кривые общей выживаемости; б — кривые выживаемости с момента последней выполненной операции

Таблица 3

Показатели медиан выживаемости во вновь сформированных группах больных, получивших стандартное комплексное лечение

Группы	Медиана общей выживаемости, мес	Медиана выживаемости с момента последней выполненной операции, мес
Группа 1 с аутологичным антигеном (n=12)	16	12
Группа 2 с пулированным антигеном (n=7)	15	10
Группа 3 без иммунотерапии (n=10)	14,5	12

группы 1 и 3 друг от друга ($p < 0,05$), для групп 2 и 3 различия были статистически не значимы ($p > 0,05$). Сравнительный анализ не продемонстрировал статистически значимых различий между группами ни в медианах общей выживаемости, ни в медианах выживаемости с момента последней выполненной операции (рис. 2). В нашей серии это свидетельствовало о том, что наличие рецидива не являлось фактором, влияющим на продолжительность жизни. Значения медиан выживаемости в группах приведены в табл. 3.

При анализе ИКЖ пациентов было отмечено, что больные из группы 1 в отдаленном периоде (более 6 мес после первого хирургического лечения) демонстрировали статистически не значимую склонность к улучшению показателя на 10 баллов: $Me_{ИКЖ}$ в начале КИТ соответствовала 60 [50; 70] баллам (см. табл. 2), на момент скрининга у живых больных — 70 [60; 80] баллам. У больных в группе 2 отмечено аналогичное изменение, которое также не являлось статистически значимым. В группе 3 ИКЖ в отдаленном периоде среди выживших пациентов не изменился.

В ходе исследования установлено, что переносимость лечения по обоим протоколам КИТ была хорошей, медиана соответствовала 4 баллам. Досрочно выбывших пациентов и анафилактических реакций не отмечено.

Обсуждение

В представленной работе в первую очередь обращает на себя внимание разнородность больных в сформированных группах. Рандомизация проходила еще до начала хирургического лечения, поэтому исследователи не имели представления, в каком объеме тот или иной больной получит полагающееся стандартное лечение. В целом большая часть пациентов — 27,6% (16 из 58) — не получали ни лучевую, ни химиотерапию (т.е. проведено только хирургическое лечение). Этим, возможно, был обусловлен более низкий ИКЖ: больные, не получившие комплексного лечения, до операции имели $Me_{ИКЖ}=60$ [50; 70] баллов, после операции — 50 [40; 60] баллов, в то время как у остальных больных до и после операции $Me_{ИКЖ}=70$ [60; 80] баллов.

Как показало исследование, ИКЖ не является принципиальным фактором для отказа в проведении хи-

миотерапии пациенту, поскольку лечение больные, как правило, получают на дому таблетированными препаратами. В случае удовлетворительного соматического статуса следует назначать химиотерапию вне зависимости от неврологического дефицита, которым зачастую и обусловлен низкий ИКЖ. Непринятие этого факта может стать значимым недостатком системы оказания

помощи онкологическим больным, а также служить существенным негативным фактором при оценке эффективности предлагаемых новых адъювантных методов. В нашем случае из-за разнородности оказания стандартного комплексного лечения группа сравнения была сокращена в три раза, что еще раз подчеркивает сложность проведения клинических исследований у больных глиобластомой.

Проанализировав результаты лечения по разработанным протоколам [28], мы пришли к заключению, что первый протокол иммунотерапии, несмотря на хорошую переносимость, имел ряд недостатков:

- сложность прогнозирования полноты последующего комплексного (лучевой и химиотерапии) лечения пациентов — больной включается в протокол до проведения оперативного вмешательства, вакцина изготавливается в период нахождения больного в хирургическом стационаре, а затем замораживается до тех пор, пока он не получит полагающуюся лучевую терапию; в случае, если после операции произойдет снижение ИКЖ, больному в лучевой терапии, как правило, отказывают, при этом вакцина на него уже изготовлена;

- разнородность получаемого во время операции антигенного (опухолевого) материала;

- наличие сопутствующих процедур, потенциально влияющих на течение заболевания в целом — гемоэкспузия для выделения иммунных клеток, прием глюкокортикоидов.

Необходимо отметить, что в первом протоколе гемоэкспузия для генерации дендритных клеток проводилась в предоперационном периоде, когда большая доля пациентов получала глюкокортикоиды. Использование аутологичного антигена диктовало условия создания вакцины в период, соответствующий нахождению больного в нейрохирургическом стационаре. Технически первый протокол сложнее в исполнении: оперативные вмешательства привязаны к циклам генерации иммунокомпетентных клеток и проводятся в строго определенный день недели, интраоперационный забор опухолевого антигенного материала исключает больных, прооперированных на других клинических базах, а также пациентов с рецидивом, которым хирургическое лечение не проводится в силу противопоказаний или незначительного объема опухолевого узла. Второй протокол в этом отношении

более гибкий и не привязан к оперативному вмешательству и забору аутологичного антигена.

Таким образом, оценка результатов лечения больных глиобластомой, проведенного по предлагаемым протоколам, свидетельствует, что показатели их выживаемости статистически значимо не различались, переносимость иммунотерапии была хорошей в обоих случаях, однако совокупность отмеченных факторов позволяет заключить, что второй протокол, основанный на использовании пулированного антигена, имеет ряд преимуществ в практическом применении и может быть рекомендован для мультицентровых клинических исследований. С целью снижения гетерогенности групп больных при планировании исследований по эффективности новых терапевтических методик стоит очень внимательно подходить к критериям включения/исключения. Уместно не включать в группы больных, не получающих полного стандартного комплексного лечения.

Заключение

Протоколы комбинированной иммунотерапии, основанные на применении дендритно-клеточных вакцин, потенциально могут улучшать индекс качества жизни пациентов в отдаленном периоде и являются безопасным адъювантным методом в комплексном лечении больных супратенториальными глиомами. Протокол комбинированной иммунотерапии с применением пулированного антигена обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием аутологичного антигена и может быть рекомендован для клинических исследований по оценке эффективности.

Финансирование исследования. Настоящее исследование было профинансировано в рамках НИР, номер государственной регистрации 01201350063 (МЗ РФ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. *Glioblastoma*. De Vleeschouwer S. (editor). Brisbane (AU): Codon Publications; 2017, <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.fr>.
2. Batash R., Asna N., Schaffer P., Francis N., Schaffer M. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. *Curr Med Chem* 2017; 24(27): 3002–3009, <https://doi.org/10.2174/0929867324666170516123206>.
3. Wirsching H.G., Galanis E., Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* 2016; 134: 381–397, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2>.
4. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 803–820, <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
5. Hanif F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi S.M., Simjee S.U. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiol-

ogy and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(1): 3–9.

6. Дяченко А.А., Субботина А.В., Измайлов Т.Р., Кrasilnikov А.В., Вальков М.Ю. Эпидемиология первичных опухолей головного мозга (обзор литературы). *Вестник РНЦПП МЗ РФ* 2013; 13: 1–37.

Dyachenko A.A., Subbotina A.V., Izmailov T.R., Krasilnikov A.V., Valkov M.Y. Epidemiology of primary brain tumors: (overview). *Vestnik RNTsRR MZ RF* 2013; 13: 1–37.

7. Touat M., Idbaih A., Sanson A., Ligon K.L. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol* 2017; 28(7): 1457–1472, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx106>.

8. Delgado-López P.D., Corrales-García E.M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol* 2016; 18(11): 1062–1071, <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x>.

9. Harder B.G., Blomquist M.R., Wang J., Kim A.J., Woodworth G.F., Winkles J.A., Loftus J.C., Tran N.L. Developments in blood-brain barrier penetrance and drug repurposing for improved treatment of glioblastoma. *Front Oncol* 2018; 8: 462, <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00462>.

10. Huang B., Zhang H., Gu L., Ye B., Jian Z., Sary C., Xiong X. Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. *J Immunol Res* 2017; 3597613: 1–11, <https://doi.org/10.1155/2017/3597613>.

11. Vakilian A., Khorramdelazad H., Heidari P., Rezaei Z.S., Hassanshahi G. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastomamultiforme. *Neurochem Int* 2017; 103: 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.013>.

12. Tanaka A., Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* 2017; 27(1): 109–118, <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>.

13. Arenas-Ramirez N., Zou C., Popp S., Zingg D., Brannetti B., Wirth E., Calzascia T., Kovarik J., Sommer L., Zenke G., Woytschak J., Regnier C.H., Katopodis A., Boyman O. Improved cancer immunotherapy by a CD25-mimobody conferring selectivity to human interleukin-2. *Sci Transl Med* 2016; 8(367): 367ra166, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag3187>.

14. Walker L.S.K. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* 2013; 45: 49–57, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.006>.

15. Chang A.L., Miska J., Wainwright D.A., Dey M., Rivetta C.V., Yu D., Kanojia D., Pituch K.C., Qiao J., Pytel P., Han Y., Wu M., Zhang L., Horbinski C.M., Ahmed A.U., Lesniak M.S. CCL2 produced by the glioma microenvironment is essential for the recruitment of regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2016; 76(19): 5671–5682, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-0144>.

16. Ooi Y.C., Tran P., Ung N., Thill K., Trang A., Fong B.M., Nagasawa D.T., Lim M., Yang I. The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clin Neurol Neurosurg* 2014; 119: 125–132, <http://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.12.004>.

17. Prins R.M., Soto H., Konkankit V., Odesa S.K., Eskin A., Yong W.H., Nelson S.F., Liao L.M. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(6): 1603–1615, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-2563>.

18. Dutoit V., Migliorini D., Walker P.R., Dietrich P.Y. Immunotherapy of brain tumors. *Prog Tumor Res* 2015; 42: 11–21, <https://doi.org/10.1159/000436986>.

19. Vandenberg L., Van Gool S.W. Treg infiltration in glioma: a hurdle for anti-glioma immunotherapy. *Immunotherapy* 2012; 4(7): 675–678, <https://doi.org/10.2217/imt.12.64>.
20. Sullivan J.P., Nahed B.V., Madden M.W., Oliveira S.M., Springer S., Bhore D., Chi A.S., Wakimoto H., Rothenberg S.M., Sequist L.V., Kapur R., Shah K., Iafrate A.J., Curry W.T., Loeffler J.S., Batchelor T.T., Louis D.N., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov* 2014; 4(11): 1299–1309, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0471>.
21. Jimsheleishvili S., Alshareef A.T., Papadimitriou K., Bregy A., Shah A.H., Graham R.M., Ferraro N., Komotar R.J. Extracranial glioblastoma in transplant recipients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140(5): 801–807, <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1625-3>.
22. Tivnan A., Heilinger T., Lavelle E.C., Prehn J.H.M. Advances in immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol* 2017; 131(1): 1–9, <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2299-2>.
23. Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Tikhonova M.A., Shevela E.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Mishinov S.V., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Shilov A.G., Alyamkina E.A., Rubtsova N.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN α -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients. *Cell Immunol* 2013; 284(1–2): 146–153, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.07.013>.
24. Пендюрин И.В., Ступак В.В., Мишинов С.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Комбинированная иммунотерапия и иммунологические предикторы выживания в лечении больных со злокачественными глиомами. В кн.: *Сибирский международный нейрохирургический форум. Сборник научных материалов*. Новосибирск; 2012; с. 210.
- Pendyurin I.V., Stupak V.V., Mishinov S.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Kombinirovannaya immunoterapiya i immunologicheskie prediktory vyzhivaniya v lechenii bol'nykh so zlokachestvennymi gliomami. V kn.: *Sibirskiy mezhdunarodnyy neyrokhirurgicheskiy forum. Sbornik nauchnykh materialov* [Combined immunotherapy and immunological predictors of survival in the treatment of patients with malignant gliomas. In: Siberian International Neurosurgical Forum. Collection of scientific materials]. Novosibirsk; 2012; p. 210.
25. Fadul C.E., Fisher J.L., Hampton T.H., Lallana E.C., Li Z., Gui J., Szczepiorkowski Z.M., Tosteson T.D., Rhodes C.H., Wishart H.A., Lewis L.D., Ernstoff M.S. Immune response in patients with newly diagnosed glioblastomamultiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. *J Immunother* 2011; 34(4): 382–389, <https://doi.org/10.1097/cji.0b013e318215e300>.
26. Lim M., Xia Y., Bettgowda C., Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(7): 422, <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>.
27. Wilcox J.A., Ramakrishna R., Magge R. Immunotherapy in glioblastoma. *World Neurosurg* 2018; 116: 518–528, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.020>.
28. Мишинов С.В., Ступак В.В., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р. Протоколы иммунотерапии в адъювантном лечении супратенториальных глиом высокой степени злокачественности. *Современные проблемы науки и образования* 2018; 6: 50.
- Mishinov S.V., Stupak V.V., Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Immunotherapeutic protocols in adjuvant treatment of supratentorial high grade gliomas (literature review and results of own research). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2018; 6: 50.
29. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Останин А.А., Никонов С.Д., Ступак В.В., Козлов Ю.П. *Способ иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга*. Патент РФ 2262941.2005.
- Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Ostanin A.A., Nikonov S.D., Stupak V.V., Kozlov Yu.P. *Method for immunotherapy of cerebral malignant tumors*. Patent RU 2262941.2005.