Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie

Antoni Szczepanik

BADANIA NAD ZASTOSOWANIEM CZYNNIKA MARTWICY NOWOTWORÓW (TNF ALFA) W IMMUNOTERAPII NOWOTWORÓW PRZEWODU POKARMOWEGO

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Marek Zembala

Praca wykonana
w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii
Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: Prof. dr hab. med. Marek Zembala
oraz I Katedrze Chirurgii Ogólnej i Klinice Chirurgii
Gastroenterologicznej Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: Prof. dr hab. med. Tadeusz Popiela

Kraków 1995

Bibl. Medyczna CM UJ
1816095235
F 1396

Pragnę najserdeczniej podziękować:

Panu Profesorowi dr hab. Markowi Zembali za bezprzykładną pomoc i olbrzymi wkład wniesiony w przygotowanie tej pracy,

Panu Profesorowi dr hab. Tadeuszowi Popieli za stworzenie znakomitych możliwości prowadzenia badań klinicznych i szczerą zachętę do kontynuowania pracy w chwilach niepowodzeń,

Pani Docent dr hab. Danucie Karcz za olbrzymi wkład wniesiony w część pracy dotyczącą endoskopii przewodu pokarmowego,

Pani Doktor Danucie Stankiewicz za wprowadzenie mnie w tematykę eksperymentalnych modeli zwierzęcych,

Panu Doktorowi hab. Antoniemu Czuprynie za pomoc w zbieraniu materiału klinicznego,

mojej Żonie Monice za cierpliwość i wsparcie w całym okresie przygotowywania tej pracy.

Praca ta nie powstałaby w niniejszej formie, gdyby nie życzliwość moich koleżanek i kolegów: dr Bożeny Mytar, mgr Marii Wołoszyn, dr Macieja Siedlara.

Spis treści

1. WSTĘP 9

1.1. *Wprowadzenie* 9
1.2. *Historia odkrycia czynnika martwicy nowotworów - TNFα* 10
1.3. *Budowa TNF i jego oddziaływanie z receptorami komórkowymi* 11
1.4. *Powstawanie TNF w organiźmie* 13
1.5. *Zjawisko cytotoksyczności TNF w stosunku do komórek nowotworowych* 13
1.6. *Mechanizm cytotoksyczności TNF* 14
1.7. *Efekty działania TNF w organiźmie* 15
1.8. *Badania nad przeciwnowotworowym działaniem TNF* 18
1.8.1. *Modele doświadczalne* 18
1.8.2. *Próby kliniczne zastosowania TNF w chorobach nowotworowych* 19
1.8.2.1 *Badania kliniczne I fazy*
1.8.2.2 *Badania kliniczne II fazy*
1.8.2.3 *Próby zastosowania TNF łącznie z innymi cytokinami w leczeniu nowotworów*
1.9. *Podsumowanie* 22
1.10. *Cel pracy* 24

2. MATERIAŁ I METODY 25

Część doświadczalna 25
2.1 *Badania nad wrażliwością uzyskanych linii komórek nowotworowych i linii komórkowych mysich nowotworów doświadczalnych na cytotoksyczne działanie rTNF in vitro.* 25
2.1.1 *Linie komórek mysich nowotworów doświadczalnych* 25
2.1.2 *Sposób uzyskania linii komórek raka żołądka i raka trzustki.* 26
2.1.2.1 *Materiał*
2.1.2.2 *Uzyskiwanie komórek nowotworowych*
2.1.2.3 *Hodowla komórek nowotworowych*
2.1.3 *Ocena wrażliwości komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie rTNF* 26
2.2 *Badania nad wrażliwością linii komórek nowotworów na skojarzone działanie rTNF i niektórych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych in vitro* 27
2.2.1 *Komórki nowotworowe* 27
2.2.2 *Chemioterapeutyki przeciwnowotworowe* 27
2.3 *rTNF w terapii paliatywnej i adiuwancyjnej przeszczepialnych nowotworów u myszy* 27
2.3.1 *Zwierzęta* 27

2.3.2 *Nowotwory doświadczalne* 28
2.3.3 *Schemat terapii* 28
2.3.4 *Modele terapii* 28
2.3.5 *Kryteria oceny* 30
2.3.6 *Ocena statystyczna wyników.* 31
2.4 *Badania nad wrażliwością przeszczepialnych ludzkich nowotworów przewodu pokarmowego (CaV1, CaV3, HPC) na rTNF u myszy SCID.* 31
2.4.1 *Zwierzęta* 31
2.4.2 *Podawanie rTNF* 31
Część kliniczna 31
2.5 *Badania kliniczne* 31
2.5.1 *Warunki włączenia chorych do badań* 32
2.5.2 *Postępowanie z chorymi po podaniu rTNF* 32
2.5.3 *Badania kliniczne fazy I nad doguzowym (miejscowym), przedoperacyjnym, podawaniem czynnika martwicy nowotworów (TNF) u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy.* 32
2.5.3.1 *Charakterystyka chorych*
2.5.3.2 *Doguzowe podawanie rTNF*
2.5.3.3 *Dalsze postępowanie z chorymi*
2.5.4 *Badania kliniczne fazy I i II nad dootrzewnowym podawaniem rTNF u chorych z rozsiewem procesu nowotworowego do otrzewnej.* 33
2.5.4.1 *Charakterystyka chorych*
2.5.4.2 *Sposób przygotowania chorych*
2.5.4.3 *Dootrzewnowe podawanie rTNF*
2.5.4.4 *Sposób postępowania z chorymi*
2.5.4.5 *Kryteria oceny*
2.5.4.6 *Ocena czasu przeżycia*

3. WYNIKI 35

Część doświadczalna 35
3.1 *Ocena wrażliwości komórek nowotworowych na działanie rTNF w warunkach in vitro* 35
3.2 *Ocena wrażliwości ludzkich komórek nowotworowych na skojarzone działanie rTNF i cytostatyków w warunkach in vitro* 36
3.3 *Wpływ miejscowego (doguzowego) podawania preparatu rTNF na wzrost przeszczepionego czerniaka B16 u myszy C57Bl — model terapii paliatywnej (grupa A)* 38
3.4 *Wpływ dootrzewnowego podawania rTNF u myszy C57Bl na występowanie wznowy miejscowej, przerzutów odległych oraz na czas przeżycia, po zabiegu usunięcia czerniaka B16. — model terapii adiuwancyjnej (grupa B)* 39

3.4.1 *Wznowa miejscowa* 39
3.4.2 *Przerzuty odległe* 40
3.4.3 *Czas przeżycia* 40
3.5 *Wpływ dootrzewnowego podawania rTNF u myszy Balb/c na występowanie wznowy miejscowej, przerzutów odległych i czas przeżycia, po zabiegu usunięcia raka jelita grubego C26 — model terapii adiuwancyjnej (grupa B)* 40
3.5.1 *Wznowa miejscowa* 40
3.5.2 *Przerzuty odległe* 42
3.5.3 *Czas przeżycia* 42
3.6 *Wpływ dootrzewnowego podawania rTNF na czas przeżycia myszy z wznową miejscową czerniaka B16 i raka jelita grubego C26 — model terapii paliatywnej wznowy miejscowej (grupa C)* 42
3.7 *Wpływ doguzowego podawania rTNF na wzrost przeszczepialnych nowotworów ludzkich u myszy SCID oraz na czas przeżycia zwierzat.* 45

Część kliniczna 46
3.8 *Ocena bezpieczeństwa doguzowego podawania rTNF u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy* 46
3.8.1 *Objawy ogólne* 46
3.8.2 *Zaburzenia funkcji wątroby* 47
3.8.3 *Funkcja nerek* 47
3.8.4 *Morfologia krwi obwodowej* 47
3.8.5 *Zmiany miejsowe* 47
3.9 *Ocena wpływu podawania rTNF na czas przeżycia u 13 chorych z miejscowo zaawansowanym, resekcyjnym rakiem żołądka.* 47
3.10 *Ocena bezpieczeństwa dootrzewnowego stosowania rTNF oraz efektu terapeutycznego w rozsiewie procesu nowotworowego do otrzewnej.* 49
3.10.1 *Temperatura* 49
3.10.2 *Objawy miejscowe* 49
3.10.3 *Układ krążenia* 49
3.10.4 *Czynność wątroby* 50
3.10.5 *Czynność nerek* 50
3.10.6 *Czas przeżycia* 50
3.10.7 *Paliatywny efekt terapeutyczny* 50

4. DYSKUSJA 51
5. WNIOSKI 58
6. STRESZCZENIE 60
7. PIŚMIENNICTWO 63

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Wzrastająca w ciągu ostatnich 20 lat liczba zachorowań na nowotwory przewodu pokarmowego (głównie na raki jelita grubego, żołądka i trzustki) spowodowała poszukiwanie nowych, doskonalszych metod wykrywania i leczenia tych chorób. Postępy w technikach chirurgicznych, wprowadzenie poszerzonych zabiegów resekcyjnych, uzupełnienie leczenia chirurgicznego o chemio- i chemioimmunoterapię, immunoterapię i radioterapię pozwoliło w pewnym stopniu poprawić wyniki leczenia tych nowotworów. Jednak wzrost globalnego wskaźnika przeżyć pięcioletnich jest w dalszym ciągu niezadowalający. W chwili obecnej przeżycia pięcioletnie np. dla raka żołądka wynoszą 10-12.3%, a dla raka jelita grubego około 45-50%. Natomiast w przypadkach raka trzustki wyleczalność sięga zaledwie kilku procent. Dlatego konieczne jest poszukiwanie dalszych, bardziej efektywnych metod leczenia tych nowotworów (66, 73, 91, 117). W chwili obecnej nie ma przekonujących danych o efektywności chemioterapii, tak paliatywnej, jak i wspomagającej. Stąd próby zastosowania immunoterapii, zwykle w formie łączonej z chemioterapią (immunochemioterapia).

Immunoterapia jest stosowana w leczeniu nowotworów głównie jako terapia wspomagająca. W ogólnym ujęciu polega ona na stymulacji układu odpornościowego pacjenta do niszczenia komórek nowotworowych. Stosowano w tym celu komórki bakteryjne lub ich produkty: BCG (Bacillus Calmette-Guerin), MER (methanol extraction residue), CWS (cell wall skeleton), OK432 (wyciąg ze szczepów Strepetococcus pyogenes) które działają jako modulatory odpowiedzi immunologicznej (BRM — biological response modyfiers). Obecnie używa się ich w połączeniu z chemioterapią jedno- lub wielolekową (5-FU+BCG, FAM+BCG, FAM+OK432) (100, 109, 117,118,119). Postępy w badaniach nad mechanizmami molekularnymi procesów immunologicznych doprowadziły do zidentyfikowania tzw. cytokin (substancji białkowych regulujących wzrost, różnicowanie i aktywność komórek). Są to substancje służące do przesyłania sygnałów między komór-

kami, wytwarzane przez komórki układu immunologicznego. Niektóre cytokiny poza wieloma aktywnościami, posiadają zdolność do niszczenia komórek nowotworowych. Do cytokin o działaniu przeciwnowotworowym należą : TNFα (czynnik martwicy nowotworów), interleukiny 1 i 6, interferony α i γ. Cytokiny te są uwalniane in vivo pod wpływem niektórych BRM (49, 69, 121). TNFα jest produktem aktywowanych makrofagów (m.in. pod wpływem BCG) i jest odpowiedzialny za ich działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych (13, 55, 181).

1.2. Historia odkrycia czynnika martwicy nowotworów — TNFα

Czynnik martwicy nowotworów (TNF alfa) stanowi od ponad 15 lat przedmiot zainteresowania wielu dziedzin badawczych. Początkowo poznano jedynie jego aktywność przeciwnowotworową. Okazało się jednak, że jest to czynnik o działaniu plejotropowym to znaczy wpływający na funkcję wielu narządów i komórek. Potwierdzono jego istotną rolę w procesach patologicznych m.in. we wstrząsie septycznym, chorobach o podłożu autoimmunizacyjnym, oraz w odrzucaniu przeszczepu (59, 65, 77, 83, 126, 127, 162, 163, 166).

Do osiągnięcia obecnego stanu wiedzy prowadziła długa droga, którą zapoczątkował jeszcze w ubiegłym stuleciu William B. Coley. Ten amerykański chirurg pracujący na przełomie XIX i XX wieku w Nowym Jorku, opisał spontaniczną remisję guza nowotworowego po przebyciu przez chorego ciężkiego zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi. Coley wykorzystał te obserwacje do wprowadzenia metody leczenia nowotworów polegającej na podawaniu chorym bakterii Gram-ujemnych w celu wywoływania zakażeń. Z dzisiejszej perspektywy można przyjąć, że była to pierwsza metoda zastosowania modulatorów odpowiedzi immunologicznej w praktyce klinicznej, chociaż niedoskonała i niebezpieczna dla życia chorego. Podobne próby były później prowadzone w latach 40-tych przez Kahlera i Sheara, ale już przy użyciu atenuowanych szczepów bakteryjnych lub fragmentów ścian komórek bakteryjnych. Te pierwsze próby kliniczne były odtworzeniem zjawiska poinfekcyjnej remisji guzów nowotworowych znanego z obserwacji klinicznych.

W roku 1975 Elizabeth Carswell z zespołem stwierdziła, że w surowicy myszy, którym podano endotoksynę pojawia się czynnik o działaniu przeciwnowotworowym (24). Surowica zawierająca taki czynnik podana zwierzętom z przeszczepionym guzem nowotworowym wywoływała martwicę krwotoczną guza. Okazało się, że czynnik o działaniu przeciwnowotworowym jest polipeptydem złożonym ze 157 aminokwasów i nazwano go czynnikiem martwicy nowotworów (Tumor Necrosis Factor). Kontynuowane od tej pory wielokierunkowe badania doprowadziły do określenia szeregu

nowych właściwości TNF, wykazania jego roli w patogenezie procesów chorobowych do i wstępnej oceny przydatności tej cytokiny w leczeniu nowotworów.

1.3. Budowa TNF i jego oddziaływanie z receptorami komórkowymi

W komórce człowieka gen dla TNF znajduje się na chromosomie 6. TNF, jak wiele innych polipeptydów, jest syntetyzowany w komórce pod postacią propolipeptydu złożonego z 233 aminokwasów. Początkowa sekwencja 76 aminokwasów odłącza się od właściwego łańcucha cytokiny i nie jest wydzielana z komórki (116). Powstały polipeptyd złożony ze 157 aminokwasów (Ryc. 1), o masie 17.356 kD, jest wydzielany poprzez błonę komórkową. Sekwencja aminokwasów ludzkiego TNF jest w około 70% zgodna z sekwencją TNF innych ssaków (myszy, szczura, królika, świnki morskiej).

Ryc. 1.
Struktura pierwszorzędowa czynnika martwicy nowotworów — TNFα

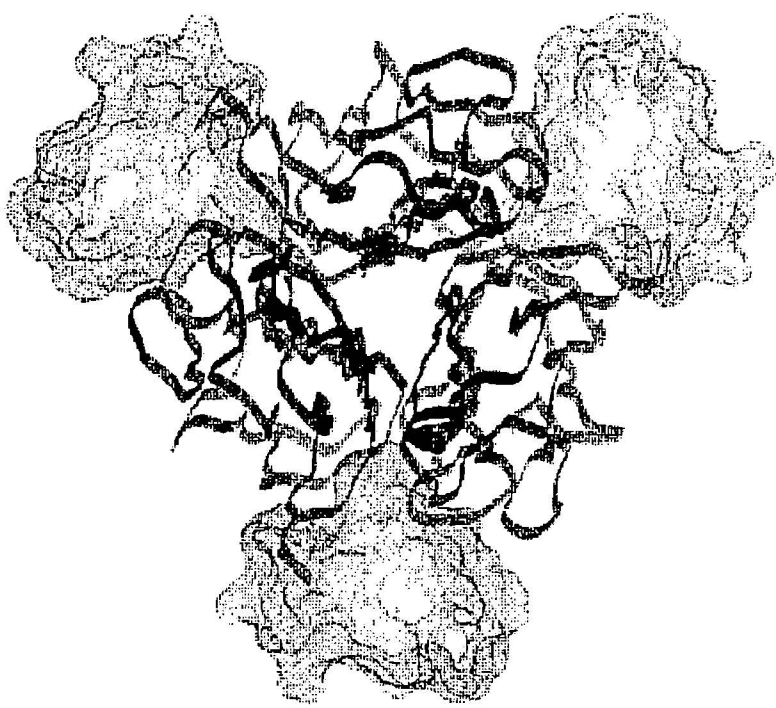
ValArgSerSerArgThrProAsp	LysProValAlaHisValAlaAsnPro
GlnAla GluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsn	ArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnCly
ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValVal	ProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyrSer
GlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysPro	SerThlHisValLeuLeuThrHisThrIle
SerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLys	ValAsnLeuLeuSerAlaIleLysSerPro
CysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGlu	AlaLysProTrpTyrGluProIleTyrLeu
GlyGlyValPheGlnLeuGluLysClyAsp	ArgLeuSerAlaGluIleAsnArgProAsp
TyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnVal	TyrPheGlyIleAlaLeu

Pojedyncza cząsteczka TNF ma w wymiarze podłużnym około 60 A, a jej wymiar poprzeczny wynosi około 30 A. W roztworze TNF oligomeryzuje do postaci trimerycznej o wysokiej stabilności termodynamicznej (29). Trimery mogą z kolei tworzyć kryształy trójkątne lub czworokątne o wymiarze odpowiednio 2.9 i 2.6 Å (2, 116). Krystaliczne struktury TNF mają jednak mniejszą stabilność od postaci trimerycznej. TNF w postaci trimerów oddziałuje na komórki poprzez receptory. Badania prowadzone przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko

poszczególnym fragmentom TNF miały na celu umiejscowienie domeny odpowiedzialnej za łączenie z receptorem. Wykazano, że zablokowanie przeciwciałem dla fragmentów zawierających aminokwasy w pozycjach 1-31 i 1-15 osłabia wiązanie się TNF z receptorem. Jednak zamiana poszczególnych aminokwasów w tych pozycjach nie powoduje istotnych zaburzeń w wiązaniu z receptorem (53, 148). Wynika stąd, że pierwsze aminokwasy w polipeptydzie TNF nie biorą bezpośredniego udziału w wiązaniu z receptorem, a przeciwciała przeciwko tym fragmentom polipeptydu osłabiają wiązanie receptora poprzez efekt steryczny. Muteiny są polipeptydami, w których zmieniono budowę aminokwasową w stosunku do naturalnego polipetydu.

Muteiny TNF posłużyły do określenia roli poszczególnych części tej cytokiny. Wykazano, że te polipeptydy, w których aminokwasy znajdujące się na powierzchni trimeru zamieniono na inne, traciły powinowactwo do receptora. Aminokwasy: Glu42, Leu75, Thr79, Ser133 wydają się tworzyć domenę receptorową (29, 31, 86). Mechamizm wiązania receptorów przez trimer TNF (Ryc. 2) można opisać jako jednoczesne wiązanie trzech receptorów, z których każdy wiąże się z dwoma monomerami.

Ryc. 2. *Mechanizm wiązania receptorów przez trimer TNF*



Związanie cytokiny z receptorem jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym, dla cytotoksycznego zniszczenia komórki. Wykazano bowiem, że muteina Asn43Tyr wiąże się z receptorem, ale nie posiada aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek L929 wrażliwych na naturalny TNF (53).

Na komórkach występują dwa typy receptorów dla TNF. Pierwszy o masie 55 kD (TNF-R typu I) i drugi o masie 75 kD (TNF-R typu II). Obydwa rodzaje receptorów współistnieją na powierzchni komórek. Proporcja ilościowa obydwu receptorów jest różna dla różnych tkanek, jednak dla tej samej tkanki z reguły zbliżona. Jak wykazały szczegółowe badania, prawdopodobnie ważniejszą rolę w mechanizmach cytotoksyczności odgrywa receptor 55 kD, natomiast receptor 75 kD moduluje cytotoksyczność (1, 8, 57, 78, 99, 139, 145, 150). Jak się wydaje, dalsze badania przy wykorzystaniu izolowanych receptorów pozwolą na pogłębienie wiedzy o mechanizmach zapoczątkowujących cytotoksyczne zniszczenie komórek docelowych przez TNF.

1.4. Powstawanie TNF w organizmie

Głównym źródłem TNF w organizmach ssaków są makrofagi posiadające zdolność do uwalniania tej cytokiny pod wpływem szeregu substancji stymulujących. Najwcześniej poznanymi stymulatorami wydzielania TNF były lipopolisacharydy (LPS) błon komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Lipopolisacharydy łączą się swym fragmentem hydrofobowym z receptorem CD14 na powierzchni makrofaga. Wywołuje to aktywację procesu syntezy i uwalniania TNF i innych cytokin (IL-6 i IL-8) przez komórkę. Taki sam efekt wywołuje część hydrofobowa LPS nazywana lipidem A (168). Wykazano, że szereg innych stymulatorów może aktywować makrofagi do uwalniania TNF. Dotyczy to głównie drobnoustrojów takich jak grzyby (Candida albicans, Aspergilus flavus), wirusów, riketsji, zarodźców malarii (5, 14, 16, 27, 65, 127). W warunkach *in vitro* stwierdza się też uwalnianie TNF przez makrofagi pod wpływem kontaktu z komórkami nowotworowymi (7, 138, 184). Synteza TNF podlega regulacji na poziomie molekularnym i jest również zależna od czynników genetycznych i hormonalnych (23, 55, 88).

Dalsze badania wykazały, że TNF jest produkowany również przez szereg innych komórek T i B, granulocyty obojętnochłonne i zasadochłonne, astrocyty i komórki tuczne.

Prawdopodobnie czynnikami stymulującymi są w tych wypadkach inne cytokiny, jak IL-2 (40, 51, 101, 104), niektóre przeciwciała (81), interakcje międzykomórkowe (111, 171). Jednak obserwuje się również uwalnianie TNF z tych komórek pod wpływem zakażeń wirusowych, grzybicznych, bakteryjnych (51, 127).

1.5. Zjawisko cytotoksyczności TNF w stosunku do komórek *nowotworowych*

Zjawisko cytotoksyczności TNF w stosunku do komórek niektórych nowotworów w warunkach *in vitro*, stało się nie tylko przyczynkiem do dalszych badań

nad przeciwnowotworowym działaniem tej cytokiny, ale również miernikiem aktywności biologicznej preparatów otrzymywanych drogą rekombinacji genetycznej. TNF w warunkach *in vitro* może działać cytotoksycznie lub cytostatycznie w stosunku do komórek nowotworowych, ale nie wykazuje takiego działania w stosunku do innych komórek. Co więcej, TNF może stymulować wzrost komórek nienowotworowych, np. diploidalnych fibroblastów (33, 67, 135, 156, 175). Nie ma jednak dostatecznych dowodów na to, że wszystkie te zjawiska zachodzą w warunkach *in vivo.*

Dodając TNF do hodowli wrażliwych komórek nowotworowych uzyskuje się zahamowanie ich proliferacji, podczas gdy hodowla samych komórek nowotworowych osiąga nasycenie gęstości (gęstość graniczną). Efekt hamujący TNF jest odwracalny — komórki L929 hodowane w obecności TNF wykazują zahamowanie wzrostu, lecz jeśli po 1-2 dobach TNF zostanie usunięty z hodowli, komórki powracają do normalnego tempa podziałów (68). Przedłużona obecność TNF w środowisku hodowanych komórek powoduje, że hodowla osiąga gęstość graniczną, ale większość komórek jest martwa. Komórki hodowane w obecności TNF i aktynomycyny D lub cykloheksimidu ulegają zniszczeniu już po kilku godzinach i w obecności niższych stężeń TNF (68, 151). To zjawisko "uwrażliwiania" wykorzystano do testów biologicznych *in vitro.*

1.6. Mechanizm cytotoksyczności TNF

Mechanizm niszczenia komórki nowotworowej przez TNF nie został do tej pory w pełni wyjaśniony. Początkowo TNF oddziałuje na receptory komórkowe. Dowodzą tego zarówno badania nad modyfikacją trzeciorzędowej struktury TNF (129), jak i fakt, że komórki nowotworowe posiadające minimalną ilość receptorów dla TNF są na jego działanie niewrażliwe (6). Jednak już oddziaływanie TNF z około 10% receptorów może prowadzić do niszczenia komórki nowotworowej (60). Na powierzchni większości komórek ludzkich znajduje się od kilkuset do kilku tysięcy receptorów i bardzo rzadko ilość ta jest większa (31, 179). Nie stwierdzono natomiast receptorów dla TNF na powierzchni erytrocytów i części limfocytów (99, 145). Po połączeniu TNF z receptorem zachodzi w komórce szereg zjawisk, jednakże mechanizm cytolizy pozostaje niejasny. Zwraca się uwagę na rolę fosfolipazy A2 jako jednego z ważnych czynników. Komórki wrażliwe na działanie TNF wykazują aktywację tego enzymu. Co więcej, inhibitory fosfolipazy chronią komórkę przed zniszczeniem (102, 152). Natomiast w komórkach niewrażliwych na cytotoksyczne działanie cytokiny nie dochodzi do aktywacji fosfolipazy A2.

Innym mechanizmem zniszczenia komórki nowotworowej jest indukcja przez TNF wolnych rodników tlenowych (169, 177, 186). Przemawia za tym również fakt oporności na działanie TNF komórek posiadających wysoki poziom glutationu (93, 187). Upraszczając można powiedzieć, że wrażliwość komórki nowotworowej

na działanie TNF jest odwrotnie proporcjonalna do ilości posiadanych przez nią zmiataczy wolnych rodników tlenowych i aktywności dysmutazy nadtlenkowej. Pośrednio zaobserwowano również działanie TNF poprzez proteazy. Obecność TNF w środowisku powoduje wytwarzanie w cytoplazmie komórki inaktywatorów proteinaz np. PAI-2 (75), a komórki poddane działaniu inhibitorów proteinaz przed ekspozycją na TNF są bardziej oporne na cytolizę (130, 155). Nie udało się jednak do chwili obecnej zidentyfikować proteinaz odpowiedzialnych za cytotoksyczność TNF. Pomimo wielu badań nie udało się ustalić jednoznacznie mechanizmu cytotoksyczności TNF. Wydaje się, że szereg wymienionych wyżej mechanizmów prowadzi do destrukcji komórki, jednak proces nie zachodzi w sposób identyczny we wszystkich wrażliwych komórkach nowotworowych i może różnić się w subpopulacjach komórek jednego typu nowotworu (39, 74, 134).

1.7. Efekty działania TNF w organizmie

Poza działaniem przeciwnowotworowym TNF wywołuje szereg reakcji i zmian w organizmie i jest ważnym mediatorem wielu procesów patologicznych. Bierze udział w patogenezie wstrząsu septycznego, ARDS, uczestniczy również w patomechanizmach przewlekłych chorób zapalnych, AIDS, chorób pasożytniczych i chorób alergicznych (108).

TNFα nie tylko działa bezpośrednio na komórki biorące udział w procesach zapalnych, ale powoduje również uwalnianie wielu innych substancji (Tab. 1). Podawanie systemowe TNF zwierzętom może powodować martwicę krwotoczną w obrębie przewodu pokarmowego, nacieki leukocytarne płuc, ostrą martwicę cewek nerkowych, spadek ciśnienia krwi, kwasicę metaboliczną i wzrost poziomu metabolizmu tkankowego (Tab. 2) (71, 126). Podanie przeciwciał przeciwko TNF zabezpiecza przed wystąpieniem większości tych zmian i w znaczący sposób poprawia przeżycie zwierząt (162, 176). Podobne zmiany morfologiczne i metaboliczne obserwuje się w przebiegu wstrząsu septycznego u ludzi. Przewlekłe uwalnianie w organizmie niewielkich ilości TNF prawdopodobnie powoduje rozłożone w czasie i postępujące wyniszczenie. Udowodniono to w badaniach nad zwierzętami, którym regularnie podawano małe dawki TNF, lub przeszczepiano komórki posiadające zdolność do stałej jego produkcji (12, 15, 107). U tych zwierząt występowały efekty metaboliczne takie, jakie obserwuje się w kacheksji u ludzi. Dalsze badania sprecyzowały rolę TNFα w patogenezie kacheksji (Tab. 3) i mechanizmy jego działania. Pod wpływem tej cytokiny dochodzi do zablokowania ośrodka głodu w centralnym systemie nerwowym, co powoduje zmniejszenie ilości przyjmowanego pożywienia. Również zostaje zaburzona motoryka przewodu pokarmowego i wchłanianie jelitowe. Zaburzenia funkcji wątroby takie jak wzmożona lipogeneza, zwiększenie produkcji białek ostrej fazy, i wzmożenie ogólnego metabolizmu białek dodatkowo utrudniają trawienie i przyswojenie przyjętego pokarmu.

Tab. 1. *Niektóre czynniki uwalniane pod wpływem TNF*

Grupa czynników	
Hormony	Insulina Glukagon Adrenalina Noradrenalina ACTH Kortyzol
Cytokiny i czynniki wzrostu	Interleukina 1, Interleukina 6, Interleukina 8 GMCSF Monocytarny czynnik chemotaktyczny neutrofilów Płytkowy czynnik wzrostowy Nerwowy czynnik wzrostowy
Inne	Białka ostrej fazy

Tab. 2 . *Niektóre efekty wywołane przez TNF we wstrząsie septycznym*

Układ	Efekty
sercowo-naczyniowy	spadek ciśnienia krwi uszkodzenie mięśnia sercowego wzrost przepuszczalności naczyń obwodowych spadek oporu obwodowego
oddechowy	ARDS wzrost przepuszczalności kapilar płucnych wzrost ilości leukocytów w tkance płucnej
wydalniczy	ostra martwica brodawek nerkowych wielomocz z następowym małomoczem
pokarmowy	upośledzone wchłanianie upośledzenie motoryki martwica krwotoczna śluzówek
centralny nerwowy	gorączka ból głowy jadłowstręt
mięśniowo-szkieletowy	bóle mięśniowe spadek spoczynkowego potencjału błonowego komórek
hemostatyczny i białokrwinkowy	wzmożenie mechanizmów wykrzepiania neutropenia

Poza tymi zmianami pojawiają się zaburzenia metaboliczne, jak hipertrójglicerydemia (10), wzmożenie lipolizy ogólnoustrojowej, oporność na insulinę, katabolizm białek i glikogenu zawartego w mięśniach szkieletowych (10, 133). Wszystkie te zmiany prowadzą do ujemnego bilansu energetycznego, azotowego i białkowego.

Tab. 3. *TNF w patomechanizmach wyniszczenia*

Miejsce działania	Efekty
Układ krążenia	wzmożenie przepuszczalności naczyń odwodnienie
Układ pokarmowy	zmniejszenie wchłaniania powiększenie wątroby wzrost lipogenezy w wątrobie zaburzenia produkcji białek w wątrobie
Centralny system nerwowy	jadłowstręt
Procesy metaboliczne	wzrost lipolizy w całym organizmie zahamowanie lipazy lipoproteinowej hypertrójglicerydemia oporność na insulinę wzrost ogólnego metabolizmu białek wzrost katabolizmu białek i glikogenu mięśniowego zwiększenie ilości wolnych aminokwasów ujemny bilans białkowy i azotowy

Należy jednak zauważyć, że u człowieka brak jednoznacznych dowodów na rolę TNF w kacheksji. Szczególnie u chorych z zaawansowanym procesem nowotworowym nie udało się stwierdzić podwyższonych poziomów TNF. Nie jest zatem jasne, czy TNF jest odpowiedzialny za kacheksję w chorobach nowotworowych u ludzi (87, 107, 153, 183).

TNF bierze również udział w wywoływaniu zmian narządowych w przewlekłych chorobach zapalnych. W reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) najistotniejszym zjawiskiem patologicznym jest destrukcja maziówki stawowej. Jak się wydaje, istotną rolę w tym procesie, obok innych cytokin jak IL-1, IL-6, odgrywa TNF. Powoduje on aktywację limfocytów T i wzmożenie procesu zapalnego w obrębie stawu, co z kolei prowadzi do dalszego uwalniania TNF i innych cytokin (autowzmocnienie). TNF stymuluje fibroblasty i chondrocyty do uwalniania szeregu enzymów litycznych (kolagenazy), które niszczą powierzchnie stawowe (13, 49, 59), a aktywując osteoklasty prowadzi do destrukcji kości, co obserwowane jest w

procesie RZS. TNF posiada zdolność do aktywacji i proliferacji fibroblastów, co sugeruje, że jest on również mediatorem procesów włóknienia. Niektóre badania dowodzą (34), że TNF odpowiedzialny jest za patologiczne włóknienie tkanki płucnej. Niemniej rola tej cytokiny w całości procesów włóknienia nie jest do końca jasna.

1.8. Badania nad przeciwnowotworowym działaniem TNF

1.8.1. Modele doświadczalne

Do badań nad działaniem przeciwnowotworowym TNF najczęściej używanymi guzami przeszczepialnymi były: mięsak meth A, mięsak SA1, włókniakomięsak MCA, czerniak B16, rak jelita grubego C26. Odrębną grupę stanowiły nowotwory ludzkie przeszczepiane myszom nude (nu/nu) lub SCID. Zawiesinę komórek nowotworowych wszczepiano zwierzętom podskórnie, rzadziej dootrzewnowo. Jako model przerzutowania komórki nowotworowe podawano dożylnie (79, 124). Działanie przeciwnowotworowe TNF stwierdzono zarówno po podaniu systemowym, jak i doguzowym. Efekt przeciwnowotworowy wyrażał się zahamowaniem lub opóźnieniem wzrostu guza, a w niektórych przypadkach wywołaniem martwicy krwotocznej guza. Czynnikami, od których zależy efekt TNF są: droga podania, wielkość dawki, sposób rozłożenia dawki w czasie, typ nowotworu i jego wrażliwość na TNF. Stwierdzono, że większy efekt uzyskuje się po doguzowym niż po systemowym podaniu TNF (30, 52, 160). Objawy uboczne ograniczają wielkość pojedynczej dawki, a efekt jednorazowej dużej dawki cytokiny jest słabszy od działania tej samej ilości TNF podanej w kilku dawkach podzielonych (8, 160). W przeprowadzonych badaniach obserwowano różne efekty podobnych dawek TNF w przypadku różnych guzów nowotworowych. Przykładem przeszczepialnego nowotworu, gdzie TNF wywołuje typową martwicę krwotoczną jest mięsak methA (4, 115). W niektórych innych przypadkach podanie TNF wywoływało jedynie opóźnienie wzrostu guzów. Efekt przeciwnowotworowy TNF in vivo nie jest w prosty sposób skorelowany z wrażliwością nowotworu na TNF in vitro. Przykładem tego zjawiska może być przeszczepialny czerniak B16 u myszy (21). Komórki tego nowotworu są oporne na cytotoksyczne działanie TNF in vitro, natomiast u zwierząt podawanie TNF powoduje remisję guza. Immunogennność guza ma istotny wpływ na jego odpowiedź na TNF. Jak wykazano, nowotwory o mniejszej immunogenności są mniej wrażliwe na działanie TNF. Nawet podtypy tego samego nowotworu różniące się od siebie immunogennością (włókniakomięsak MCA-102, włókniakomięsak MCA-106) wykazują różną wrażliwość na TNF (4). Ludzkie nowotwory przeszczepiane myszom nude odpowiadają słabiej niż nowotwory eksperymentalne przeszczepiane myszom szczepów wsobnych. Można to tłumaczyć większą opornością nowotworów ludzkich na działanie TNF lub ich mniejszą immunogennością.

Innym elementem choroby nowotworowej poddanym analizie w badaniach na modelach zwierzęcych były przerzuty. Model przerzutów odległych polegał na podawaniu komórek nowotworowych do krążenia wrotnego (przerzuty do wątroby) lub do żył obwodowych (przerzuty do płuc). W części przypadków TNF powodował zmniejszenie liczby przerzutów. Było to zależne przede wszystkim od momentu podania cytokiny. Jak wykazano, w przypadku włókniakomięsaka mysiego efekt przeciwnowotworowy występował, gdy TNF podano w ciągu 3 dni od wszczepienia komórek nowotworowych (161). Późniejsze podawanie TNF nie miało wpływu na przerzuty. Podobne obserwacje dotyczyły również nowotworów doświadczalnych czerniaka złośliwego (143) i raka oskrzela (159). W raku jelita grubego C26 nie obserwowano zahamowania wzrostu przerzutów. Inne badania wykazały, że równoczesne podanie komórek nowotworowych z TNF może prowadzić do zwiększenia liczby przerzutów (47). Inkubacja in vitro komórek czerniaka w obecności TNF powoduje nasilenie tworzenia przerzutów po dożylnym podaniu tych komórek (79). Najprawdopodobniej zjawiska promowania przerzutów mają związek z indukcją kolagenaz, aktywacją plazminogenu i stymulacją angiogenezy przez TNF (45, 58, 124).

Badania nad stosowaniem TNF łącznie z innymi cytokinami, a głównie interferonem gamma i interleukiną 2 wykazały w przypadkach wielu nowotworów doświadczalnych synergistyczne działanie kombinacji cytokin (35, 92). Badania przy użyciu modeli doświadczalnych choroby nowotworowej, pozwoliły na określenie podstawowych kierunków badań klinicznych. Jednakże nie można w całości przenieść wniosków wypływających z eksperymentu zwierzęcego do prowadzonych badań u ludzi. Wiąże się to z odrębnościami fizjologii organizmów, a także różnicami pomiędzy nowotworami doświadczalnymi a nowotworami człowieka jak również typem odpowiedzi organizmu na wzrost guza.

1.8.2. Próby kliniczne zastosowania TNF w chorobach nowotworowych

Techniki biologii molekularnej umożliwiły uzyskanie TNF na drodze rekombinacji. Pozwoliło to na otrzymanie preparatu o wysokim stopniu czystości i aktywności biologicznej w ilościach pozwalających na podjęcie prób klinicznych (2, 42). W badaniach I i II fazy klinicznej rozpoczętych w roku 1987 analizowano różne drogi podawania TNF, dawkowanie, objawy toksyczne, farmakokinetykę, oraz efekt terapeutyczny w schorzeniach nowotworowych.

1.8.2.1. Badania kliniczne I fazy

Omawiane doniesienia dotyczące badań klinicznych I fazy objęły chorych, z zaawansowanym procesem nowotworowym zarówno miejscowo, jak i z obecnością odległych przerzutów. W trakcie badań chorzy otrzymywali leczenie objawowe. Dożylne podawanie TNF polegało na ciągłym wlewie trwającym co najmniej 24 godziny, wlewie kroplowym trwającym 1 do 3 godziny lub powolnych iniekcjach dożylnych trwających od kilku do kilkunastu minut. Wykazano, że przy

wlewie 24-godzinnym w dawce 80 μg/m^2 pow. ciała /dobę (co praktycznie jest dawką dość dobrze tolerowaną) poziom TNF w surowicy był nieoznaczalny przy pomocy testów o czułości 0.2 μg/ml. Okres półtrwania TNF w surowicy wynosi 26.3 minuty (128).

Dawki TNF we wlewie ciągłym wynosiły od 10 do 270 μg/m^2 pow. ciała/ dobę (110, 116, 146, 147). Dla tego sposobu podawania maksymalna tolerowana dawka (MTD) wahała się w granicach 160-200 μg/m^2 pow. ciała/dobę , ale przy odpowiednim sposobie rozłożenia dawek w czasie, lub stosowaniu dawek rosnących, MTD wzrastała do około 250 μg/m^2 pow. ciała/dobę.

U chorych otrzymujących TNF we wstrzyknięciu dożylnym stosowano 40-2000 μg/dawkę co w przybliżeniu odpowiada zakresowi 23-1175 μg/m^2 pow. ciała. MTD osiągnięto przy dawce 450-900 μg/m^2 pow. ciała (43, 157). Objawami limitującymi wielkość podawanej dawki były zaburzenia neurologiczne (drgawki, utrata świadomości). Objawy te ustępowały jednakże w krótkim czasie po przerwaniu podawania TNF i nie pozostawiły trwałych objawów ubytkowych (136). Najczęstszymi objawami ubocznymi obserwowanymi u chorych były: gorączka i dreszcze, oraz uczucie zmęczenia występujące u 60-100% chorych. Objawy te dawały się opanować poprzez stosowanie niesterydowych leków przeciwzapalnych. Obserwowano również zależne od dawki podanego TNF spadki ciśnienia tętniczego krwi, które nie wymagały jednakże intensywnego leczenia. Sporadycznie występowały objawy takie, jak: przejściowe podniesienie poziomu aminotransferaz w surowicy, krótkotrwała małopłytkowość, ból w miejscu guza pierwotnego oraz duszność (17, 26, 95, 113, 136, 137, 167, 170).

Modyfikacją systemowego zastosowania TNF jest jego podawanie do naczyń trzewnych. TNF podawano do tętnicy wątrobowej u 12 chorych z nowotworami przewodu pokarmowego, u których stwierdzono przerzuty do wątroby (90, 188). Zastosowano wlew ciągły TNF w dawce 12-100 μg/m^2 pow. ciała/dobę. U wszystkich chorych występowała gorączka z dreszczami i przejściowe podniesienie poziomu enzymów wątrobowych w surowicy. U dwóch chorych zanotowano wzrost poziomu bilirubiny w surowicy do 3 mg%, a także zależny od dawki spadek liczby płytek krwi. Wszystkie te objawy ustępowały po zaprzestaniu podawania preparatu. Przy podawaniu domięśniowym w ilości 5-200 μg/m^2 pow. ciała, nie osiągnięto MTD. U wszystkich chorych bezpośrednio po podaniu występowała gorączka z dreszczami. W miejscu podania obserwowano odczyn zapalny, ustępujący po 12-24 godz. Objawy uboczne nie wymagały stosowania jakiegokolwiek leczenia, ze względu na ich niewielkie nasilenie (180).

Miejscowe podawanie TNF do guza nowotworowego w badaniach I fazy klinicznej stosowano najcześciej w przypadku nowotworów o dużym stopniu zaawansowania zmiany pierwotnej. MTD wynosiła około 100 μg/m^2 pow. ciała, a głównymi efektami ubocznymi były gorączka i dreszcze, które ustępowały po podaniu środków przeciwgorączkowych. Sporadycznie obserwowano spadki ciśnienia (62, 64, 157).

U chorych z nowotworami przewodu pokarmowego i jajnika, z rozsiewem nowotworowym do otrzewnej, TNF podawano dootrzewnowo (32, 50, 122). Stosowano wlewy TNF w dawkach 10-50 $\mu g/m^2$ pow. ciała w roztworze 0.9% NaCl, przez specjalnie zakładany cewnik dootrzewnowy. Zaobserwowano znacznie wydłużony okres półtrwania TNF w jamie otrzewnej. TNF wykrywano nawet po 24 godz. od momentu podania. Natomiast poziom TNF w surowicy był niemierzalny. U większości chorych po podaniu preparatu występowały bóle brzucha, których nasilenie było zależne od dawki. Może mieć to związek z wystąpieniem odczynu zapalnego w jamie otrzewnej. U 20% chorych po 1-3 miesiącach wystąpiła niedrożność przewodu pokarmowego, co pociągnęło za sobą konieczność wykonania laparotomii. Śródoperacyjnie we wszystkich przypadkach stwierdzano niedrożność zrostową (50). Jednakże nie da się jednoznacznie odpowiedzieć, czy był to wynik działania samego preparatu czy też obecności cewnika dootrzewnowego.

Badania kliniczne I fazy wykazały, że TNF podawany systemowo wykazuje stosunkowo dużą toksyczność. Objawy uboczne ograniczają jego zastosowanie w praktyce klinicznej.

1.8.2.2. Badania kliniczne II fazy

Badania kliniczne II fazy objęły chorych z różnymi typami nowotworów o znacznym stopniu zaawansowania. TNF podawano dożylnie, dootrzewnowo i doguzowo.

W raku jelita grubego, trzustki i żołądka TNF podawano dożylnie w dawkach od 100-650 $\mu g/m^2$ stosując najczęściej dawki wzrastające i różne schematy podawania. Stosowanie dawek wzrastających pozwoliło na uzyskanie lepszej tolerancji preparatu. Nie zanotowano całkowitej remisji choroby (CR). Remisję częściwą (PR) lub zatrzymanie postępu choroby (SD) obserwowano u 2-20% chorych (22, 26, 137, 157, 158). W przypadkach tych samych nowotworów, u chorych z obecnością wodobrzusza pochodzenia nowotworowego TNF podawano dootrzewnowo w dawkach 40-400 $\mu g/m^2$ pow. ciała na dobę. Okres półtrwania TNF w jamie otrzewnej wynosił 8-10 godz. U ponad 50% chorych stwierdzono całkowity zanik wodobrzusza, u dalszych 14% zmniejsznie objętości wodobrzusza o połowę (122).

W raku jajnika z rozsiewem do otrzewnej stosowano ten sam sposób podawania TNF jak w przypadku nowotworów przewodu pokarmowego (122). U wszystkich pacjentek obserwowano całkowity zanik wodobrzusza.

Natomiast doguzowe wstrzyknięcie TNF (25 μg TNF/m^2) w przypadkach mięsaka Kaposiego spowodowało remisję guza u 92% chorych (62).

Zachęcający efekt leczenia zaobserwowano w przypadkach czerniaka złośliwego zlokalizowanego na kończynach. Poddając kończynę izolowanej perfuzji TNF w dawce 4 mg przez 90 min, przy wyłączonym krążeniu, i melphalan, uzyskano 70% przeżyć 12-miesięcznych, przy braku objawów choroby (46, 76).

1.8.2.3. Próby zastosowania TNF łącznie z innymi cytokinami w leczeniu nowotworów

Badania doświadczalne wykazały synergistyczne działanie przeciwnowotworowe TNF, IL-1 i IL-2 i IFN α i γ, co doprowadziło do prób zastosowania ich łącznie w leczeniu choroby nowotworowej (35, 103, 105). W badaniach I fazy klinicznej chorzy otrzymywali TNF i IL-2 dożylnie (85, 144, 180). U wszystkich chorych występowała gorączka, w niektórych przypadkach łącząca się ze skurczami tonicznymi mięśni szkieletowych, których nie obserwowano przy podawaniu samego TNF. U około połowy chorych obserwowano sinicę i skokowe zmiany ciśnienia krwi. MTD w tej grupie wynosiła 80-120 μg TNF/m^2 i 2x10^6j. IL-2/m^2.

Podjęto również próby leczenia poszczególnych typów nowotworów za pomocą TNF z innymi cytokinami. W raku nerki TNF podawano domięśniowo w dawce 50 μg/m^2, a IFNγ podskórnie w dawce 1000 μg/m^2 (98). Częściową remisję uzyskano u 23% chorych. W pozostałych przypadkach nie notowano istotnego wpływu stosowanej terapii na przebieg choroby. W raku oskrzela (z wyłączeniem raka owsianokomórkowego) podawano TNF w dawce 25-50 μg/m^2 domięśniowo, a IL-2 we wlewie ciągłym w dawce rzędu miliona jednostek na dobę (180). U ponad 60% chorych stwierdzono częściową odpowiedź na stosowaną terapię, a u jednego chorego stwierdzono całkowitą remisję choroby. Ponadto u wszystkich chorych stwierdzono znaczący wzrost aktywności komórek LAK (lymphokine activated killer) i NK (natural killer), co sugeruje aktywację wpływ układu immunologicznego przez TNF (9, 19, 20, 25, 82, 92, 114, 182).

1.9. Podsumowanie

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że TNF powoduje u części chorych remisję choroby nowotworowej. Brak jest jednakże obiektywnych i jednoznacznych kryteriów pozwalających na dobór najskuteczniejszego sposobu podawania i precyzyjnych wskazań co do jego zastosowania. Nie ustalono także typów nowotworów, które na to leczenie mogą być podatne.

Objawy uboczne stanowią istotne ograniczenie zastosowania TNF w praktyce klinicznej. Wprawdzie większość z nich udaje się szybko i łatwo opanować, jednak ograniczają one zarówno wielkość dawki, jak i czas stosowania preparatu (44, 54).

Większe nadzieje wiązano z użyciem TNF skojarzonym z innymi cytokinami. Nie dało to jednak istotnej poprawy efektów leczenia, ani nie zmniejszyło objawów ubocznych. Wydaje się, że efekty miejscowego (doguzowego) podawania TNF i innych cytokin są stosunkowo mało poznane. Ten sposób podawania może mieć w przyszłości pewne zastosowanie, pozwala bowiem na osiągnięcie wysokich stężeń preparatu w miejscu zmiany nowotworowej przy relatywnie mniejszych ogólnych objawach ubocznych (63, 64, 157).

Przegląd cytowanego piśmiennictwa pozwala stwierdzić, że z wyjątkiem czerniaka złośliwego nie prowadzono badań na jednym typie nowotworu. Prace obejmujące szerszy materiał chorych, obejmują kilka do kilkunastu typów nowotworów o różnej lokalizacji zmiany pierwotnej. Utrudnia to bliższą analizę zjawisk, zachodzących podczas stosowania tej formy immunoterapii.

Nowotwory o odległych od siebie punktach wyjścia mają z reguły różne typy wzrostu, inny typ ukrwienia anatomicznego, różny kontakt z układem immunologicznym, inne drogi przerzutowania. Grupa nowotworów przewodu pokarmowego jest pod tym względem stosunkowo jednorodna. Stąd badania nad zastosowaniem TNF w terapii raka żołądka, raka trzustki i raka jelita grubego mogą pozwolić na wyciągnięcie bardziej precyzyjnych wniosków. Z drugiej zaś strony omawiane nowotwory należą do najczęściej występujących i późno wykrywanych, co, jak już zaznaczono, stanowi istotny problem medyczny i społeczny.

1.10. Cel pracy

Ogólnym celem pracy jest określenie, czy TNF może być przydatny w immunoterapii nowotworów przewodu pokarmowego.

Cele szczegółowe:

1. Uzyskanie hodowli linii komórek nowotworów przewodu pokarmowego i zbadanie ich wrażliwości na cytotoksyczne działanie TNF *in vitro* i porównanie do wrażliwości linii komórkowych nowotworów doświadczalnych.

2. Określenie aktywności przeciwnowotworowej TNF w maksymalnie zbliżonym do sytuacji klinicznej modelu przeszczepialnych nowotworów doświadczalnych u myszy.

3. Uzyskanie modelu przeszczepialnych nowotworów przewodu pokarmowego człowieka u myszy SCID i sprawdzenie wrażliwości przeszczepionych nowotworów na TNF.

4. Zastosowanie TNF w badaniach klinicznych fazy I i II w zaawansowanych nowotworach przewodu pokarmowego.

2. MATERIAŁ I METODY

Preparat ludzkiego TNF otrzymany drogą rekombinacji (rTNF) uzyskano z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi (Program PONT 73/43/92). rTNF zawieszano w roztworze PBS (chlorek sodu z dodatkiem buforu fosforanowego) z dodatkiem 0.05% albuminy ludzkiej. Preparat był wolny od endotoksyny (Limulus test), jałowy i posiadał aktywność 2-4 x 10^7 j/ml (182). Na przeprowadzenie etapu klinicznego badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej Akademii Medycznej w Krakowie.

Część doświadczalna

2.1. Badania nad wrażliwością uzyskanych linii komórek nowotworowych człowieka i linii komórkowych mysich nowotworów doświadczalnych na cytotoksyczne działanie rTNF in vitro

Do badań użyto świeżo wyizolowanych dwóch linii komórkowych raka żołądka i linii komórkowej raka trzustki, oraz linie komórkowe mysich nowotworów doświadczalnych.

2.1.1. Linie komórek mysich nowotworów doświadczalnych

Linie komórkowe nowotworów: czerniak B16 i rak jelita grubego C26 pochodziły z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

2.1.2. Sposób uzyskania linii komórek raka żołądka i raka trzustki

2.1.2.1. Materiał

Komórki nowotworowe uzyskano od chorych z potwierdzonym histopatologicznie rakiem żołądka lub rakiem trzustki, leczonych w I Klinice Chirurgii CMUJ, z towarzyszącym rozsiewem procesu nowotworowego do otrzewnej (carcinosis peritonei). W trakcie leczenia odbarczającego poprzez nakłucie powłok w lewym podbrzuszu, uzyskiwano płyn z jamy otrzewnej zawierający komórki nowotworowe. Pobierano od 500-1000 ml płynu do sterylnego naczynia szklanego, po czym, obróbkę laboratoryjną płynu rozpoczynano w ciągu 1-3 godzin.

2.1.2.2. Uzyskiwanie komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe uzyskiwano poprzez wykorzystanie ich właściwości sedymentacyjnych w nieciągłym gradiencie stężeń (Ficol Hypaque, Pharmacia, Uppsala). Płyn z jamy otrzewnej wirowano przy przyspieszeniu 400 x g przez 5 minut. Uzyskaną frakcję komórkową zawieszano w roztworze PBS, a następnie 20 ml tej zawiesiny (1-5 x 10^6 komórek) nawarstwiano na 10 ml Ficol Hypaque. Następnie probówki wirowano przy przyspieszeniu 400 x g przez 20 minut w temperaturze pokojowej i aspirowano warstwę komórek jednojądrzastych. Po przepłukaniu 50 ml PBS, 10 ml zawiesiny komórkowej (2 x 10^6 komórek/ml) nawarstwiano na nieciągły gradient złożony z 10 ml 100% i 15 ml 75% Ficol Hypaque. Probówki wirowano z prędkością 1700 obrotów na minutę, przez 5 minut, w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu komórki nowotworowe znajdowały się w górnej warstwie frakcji 75%. Poszczególne frakcje komórkowe oceniano poprzez badanie mikroskopowe zawiesiny komórkowej.

2.1.2.3. Hodowla komórek nowotworowych

Zawiesiny komórek nowotworowych, w których ilość innych komórek nie przekraczała 5% umieszczano w podłożu do hodowli RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS), 2mM glutaminy, 100 j/ml penicyliny, 25 μg/ml gentamycyny i 100 μg/ml streptomycyny. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C w 5% atmosferze CO_2. W ten sposób wyizolowano linię komórek raka trzustki, nazywaną dalej HPC (149) i dwie linie komórkowe raka żołądka nazwane CaV1 i CaV3.

2.1.3. Ocena wrażliwości komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie rTNF

Do oceny cytotoksyczności rTNF w stosunku do badanych komórek nowotworowych użyto testu barwienia przyżyciowego — MTT (181).

Komórki badanych nowotworów w ilości 3 x10^4 zawieszone w roztworze RPMI 1640 z dodatkiem 2% płodowej surowicy cielęcej (objętość 100 μl) umieszczano na mikropłytce 96-dołkowej. W celu kontroli aktywności preparatu na

każdej płytce umieszczano również komórki linii L929 o znanej wrażliwości na TNF. Komórki inkubowano w temperaturze 37° przez 24 godziny. Po tym okresie do odpowiednich dołków dodawano rTNF, aby uzyskać stężenia $1x10^1$ - $1x10^5$ j/ml i aktynomycynę D do stężenia 1μg/ml. Po 24 godzinach inkubacji do każdego dołka dodano 20 μl MTT (bromek (3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylotetrazolium), Sigma) na okres 4 godzin. Następnie podłoże usuwano, a barwnik ekstrahowano alkoholem izopropylowym z dodatkiem 0.04N HCl. Tak samo postępowano z każdą z badanych linii komórkowych.

Wynik testu odczytywano w stosunku do krzywej standardowej rTNF za pomocą automatycznego czytnika (Multiscan Plus, Labsystems) przy 570 nm i 630 nm. Za wskaźnik cytotoksyczności przyjęto stosunek gęstości optycznej przy długości fali świetlnej 570 i 630 nm w poszczególnych hodowlach. W badaniu skojarzonego działania rTNF i leków cytostatycznych do podłoża dodawano chemioterapeutyki łącznie z rTNF.

2.2. Badania nad wrażliwością linii komórek nowotworów na skojarzone działanie rTNF i niektórych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych in vitro

2.2.1. Komórki nowotworowe

Do badań użyto nowo wyizolowanych linii komórek nowotworowych HPC, CaV1 i CaV3 , których sposób otrzymania opisano powyżej (por. 2.1.2).

2.2.2. Chemioterapeutyki przeciwnowotworowe

W teście wykorzystano roztwory adriamycyny ADR (Pharmitalia), mitomycyny MMC C (Kyowa) i 5-fluorouracylu 5-FU (Polfa) z uwagi na ich częste wykorzystanie w chemioterapii nowotworów przewodu pokarmowego. Zastosowano zakresy stężeń leków występujące w surowicy chorych przy podawaniu najczęściej stosowanych dawek. Odpowiednio dla adriamycyny 0.17, 1.7 i 17 μg/ml, mitomycyny C 0.1, 1, 10 μg/ml, i 5-fluorouracylu 2.5, 25, i 250 μg/ml.

2.3. rTNF w terapii paliatywnej i adiuwancyjnej przeszczepialnych nowotworów u myszy

2.3.1. Zwierzęta

Badania prowadzono na myszach wsobnych szczepów C57BL i BALB/c pochodzących z hodowli własnej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii CMUJ. Użyto

zwierząt dorosłych, w wieku 3 miesięcy, o średnim ciężarze ciała 20-25g. Zwierzęta utrzymywano w standardowych warunkach w hodowli konwencjonalnej otwartej.

2.3.2. Nowotwory doświadczalne

Użyto ustalonych linii komórkowych czerniaka B16 i raka jelita grubego C26. Czerniak B16 został wykorzystany do badań z uwagi na jego udowodnioną wcześniej przydatność w modelach immunoterapii (21). Nowotwory pasażowano przez rozdrobnienie mechaniczne guzów celem uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek, które zawieszano w roztworze PBS w gęstości 1 x 10^7 ml. Komórki nowotworowe w ilości 2 x 10^6 podawano zwierzętom podskórnie w okolicę międzyłopatkową. Komórki czerniaka B16, podawano myszom szczepu C57Bl, a komórki raka jelita grubego C26 myszom szczepu Balb/c.

2.3.3 Schemat terapii

W okresie 7-10 dni po przeszczepieniu komórek nowotworowych obserwowano wzrost guzów. Do doświadczenia włączono zwierzęta, u których guz osiągnął powierzchnię 50 mm^2 (największy wymiar podłużny x największy wymiar poprzeczny). Sposób podawania preparatu rTNF różnił się w zależności od modelu terapii i grupy (Ryc. 3).

2.3.4. Modele terapii

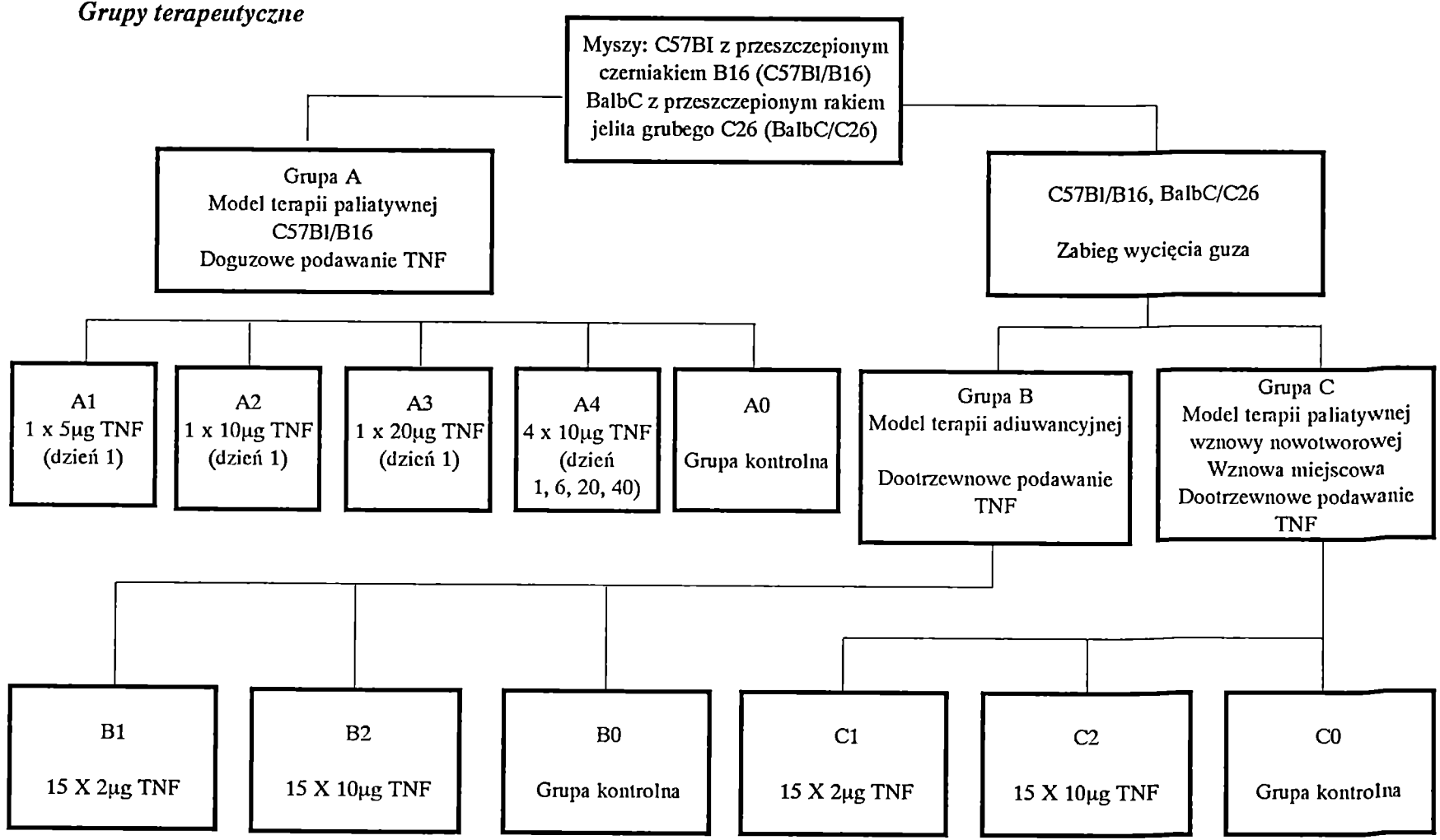
Grupa A, "model terapii paliatywnej" — do tej części eksperymentu użyto myszy szczepu C57Bl z guzem o powierzchni 50 mm^2. W utworzonych losowo grupach doświadczalnych (Ryc. 3, Tab. 4), rTNF podawano w okolicę guza poprzez 2 - 3-krotne nakłucia, w różnych dniach i dawkach (grupy A1 - A4).

Grupa B, "model terapii adiuwancyjnej" — w tym modelu u myszy, (C57Bl i Balb/c) z odpowiedniej wielkości guzem (powierzchnia 50 mm^2) dokonywano operacyjnego usunięcia zmiany nowotworowej, a następnie podawano TNF dootrzewnowo. Przed zabiegiem zwierzęta znieczulano poprzez podanie domięśniowe 1 mg ketaminy i 1.5 mg dehydrobenzperidolu. Następnie, w granicach makroskopowo zdrowych, usuwano guz nowotworowy wraz z przylegającą skórą. Ranę pooperacyjną zszywano na głucho. Po zabiegu operacyjnym myszy przydzielano losowo do różnych grup terapeutycznych (Ryc. 3, Tab. 4). rTNF podawano począwszy od drugiej doby po zabiegu co drugi dzień, aż do pojawienia się wznowy nowotworu. W przypadkach gdy nie obserwowano wznowy, rTNF podawano przez 30 dni. Poszczególnym grupom podawano 2 lub 10 μg rTNF na dawkę. Tak więc sumaryczna dawka wynosiła 30 lub 150 μg rTNF na mysz w zależności od grupy. W grupach kontrolnych podawano sól fizjologiczną.

Postępowanie było identyczne dla obu szczepów myszy.

Ryc. 3

Grupy terapeutyczne



Tab. 4. *Liczebność grup zwierzęcych w poszczególnych modelach terapii*

Grupa (Typ nowotworu)	Liczba zwierząt w podgrupach				
"A" (melanoma B16)	A1 10	A2 10	A3 7	A4 20	A0 16
"B" (melanoma B16)	B1 15	B2 14	BO 9		
"B" (rak jelita grubego C26)	B1 12	B2 16	BO 11		
"C" (melanoma B16)	C1 9	C2 11	CO 10		
"C" (rak jelita grubego C26)	C1 9	C2 9	CO 12		

Grupa C, "model terapii paliatywnej wznowy nowotworowej" — po zabiegu wycięcia guza pierwotnego (analogicznie jak w grupie B) zwierzęta obserwowano celem określenia się wznowy miejscowej. Podawanie rTNF rozpoczynano w chwili pojawienia się wznowy nowotworu. Różne dawki preparatu (Ryc. 3, Tab. 4) podawano co drugi dzień dootrzewnowo, do momentu padnięcia myszy. Jeżeli uzyskiwano wyleczenie, preparat podawano tylko do 30 doby po pojawieniu się wznowy. rTNF podawano dootrzewnowo w objętości 0.5 ml soli fizjologicznej, a w grupach kontrolnych podawano samą sól fizjologiczną.

2.3.5. Kryteria oceny

Efekt terapeutyczny oceniano na podstawie pomiaru wielkości guza oraz oceny czasu przeżycia zwierząt. Zachowanie się guza nowotworowego oceniano mierząc co drugi dzień jego długość i szerokość. Zwierzęta padłe sekcjonowano i badano histopatologicznie narządy wewnętrzne. Zwierzęta, które przeżyły okres obserwacji usypiano i również sekcjonowano. Za wyleczenie uznano przeżycie 180 dni i brak ognisk nowotworu w badaniu sekcyjnym i histopatologicznym narządów wewnętrznych zwierząt, usypianych po okresie obserwacji. Oceniano średni czas przeżycia wszystkich zwierząt w grupie od chwili podania komórek nowotworowych. Powierzchnię guza określano mnożąc jego największy wymiar podłużny i największy wymiar poprzeczny (w mm). Średni wskaźnik powierzchni guza —

średnia arytmetyczna powierzchni guza wyrażonej w mm^2 u 50% zwierząt w grupie, które żyły najdłużej.

2.3.6. Ocena statystyczna wyników

Do oceny statystycznej wyników badań użyto testu nieparametrycznego Kruskal Wallisa. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p \leq 0.05$.

2.4. Badania nad wrażliwością przeszczepialnych ludzkich nowotworów przewodu pokarmowego (CaV1, CaV3, HPC) na rTNF u myszy SCID

Badania przeprowadzono we współpracy z II Uniwersytetem "Tor Vergata" w Rzymie.

2.4.1. Zwierzęta

Do badań użyto myszy SCID (Severe Combined Immunodeficiency) w wieku 6-8 tygodni. Komórki nowotworów CaV1, CaV3 i HPC podawano zwierzętom podskórnie, w okolicę międzyłopatkową w ilości 1×10^3- 1×10^6 komórek. Myszy obserwowano mierząc co 2-gi dzień wymiar poprzeczny i podłużny guza. Zarówno koszt zwierząt, jak i trudności w ich hodowli ograniczyły ilość grup.

2.4.2. Podawanie rTNF

Po uzyskaniu guzów wielkości minimum 5 x 5 mm zwierzętom podawano preparat rTNF w dawce 5 μg w 100 μl soli fizjologicznej, w bezpośrednie sąsiedztwo guza nowotworowego. rTNF podawano co drugi dzień, w pięciu dawkach (dawka sumaryczna 25μg). W grupach kontrolnych zwierzętom podawano jedynie sól fizjologiczną. Poszczególne grupy liczyły po 5 zwierząt i zostały utworzone losowo.

Część kliniczna

2.5. Badania kliniczne

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej Akademii Medycznej w Krakowie.

2.5.1. Warunki włączenia chorych do badań

W chwili włączenia chorych do badań ich stan sprawności mieścił się w I lub II grupie według skali Karnofskiego. Warunkiem zakwalifikowania chorych do badań były parametry morfologii krwi, funkcji wątroby i funkcji nerek mieszczące się w 0 i I stopniu wg skali ECOG WHO, wydolny układ krążenia i brak ostrych chorób zapalnych. Na podanie rTNF uzyskano zgodę chorych.

2.5.2. Postępowanie z chorymi po podaniu rTNF

Wszyscy chorzy byli badani zarówno przedmiotowo, jak i podmiotowo przed i po podaniu rTNF. W okresie 24 godzin, co godzinę, monitorowano również ciśnienie tętnicze krwi, tętno i temperaturę. Przed oraz 24 i 48 godz. po podaniu TNF wykonywano następujące badania: hemoglobina, hematokryt, erytrocyty, leukocytoza, płytki krwi, wskaźnik protrombiny, poziom mocznika, kreatyniny, glukozy, AspAt, AlAt, GGTP, fosfatazy alkalicznej, bilirubiny.

2.5.3. Badania kliniczne fazy I nad doguzowym (miejscowym), przedoperacyjnym, podawaniem czynnika martwicy nowotworów (rTNF) u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy

2.5.3.1. Charakterystyka chorych

Do badań zakwalifikowano 34 chorych, w tym 24 chorych z rakiem żołądka i 10 chorych z rakiem odbytnicy, zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego. Średni wiek chorych wynosił 56.7 lat (35-69). Rozpoznanie zostało ustalone na podstawie badania histopatologicznego materiału pobranego drogą biopsji.

2.5.3.2. Doguzowe podawanie rTNF

rTNF podawano pod kontrolą endoskopową, poprzez wstrzyknięcie preparatu podśluzówkowo w ścianę żołądka lub odbytnicy, w objętości całkowitej około 2 ml w obrzeże nacieku nowotoworowego, w dawkach podzielonych i podanych w 3-5 miejscach. Stężenie dobrano w taki sposób, aby całkowita dawka preparatu wynosiła 50-400 $\mu g/m^2$ pow. ciała. U 3 chorych z rakiem żołądka rTNF podawano dwukrotnie w odstępie 48-72 godzin.

2.5.3.3. Dalsze postępowanie z chorymi

Chorzy byli planowo operowani w 3-5 dobie po podaniu rTNF. W 13 przypadkach raka żołądka i 5 przypadkach raka jelita grubego przeprowadzono zabiegi resekcyjne. U pozostałych chorych ze względu na miejscowe zaawansowanie procesu nowotworowego przeprowadzono zabiegi paliatywne bez usunięcia masy guza.

2.5.4. Badania kliniczne fazy I i II nad dootrzewnowym podawaniem rTNF u chorych z rozsiewem procesu nowotworowego do otrzewnej

2.5.4.1. Charakterystyka chorych

Badania objęły grupę 13 chorych z rozsiewem procesu nowotworowego do otrzewnej z towarzyszącym wodobrzuszem. Średni wiek chorych wynosił 55.6 lat (31-79), a proporcja mężczyzn do kobiet 5/8. U 4 chorych rozpoznanie postawiono podczas laparotomii i byli to chorzy, którzy zgłosili się do leczenia z rozsianym procesem nowotworowym. Natomiast 9 chorych było wcześniej leczonych operacyjnie, a wodobrzusze towarzyszyło nawrotowi choroby nowotworowej po okresie od 6 miesięcy do 4 lat.

Nowotworem pierwotnym był w 8 przypadkach rak żołądka, w 1 przypadku rak jajnika i żołądka (rak Krukenberga), w 3 przypadkach rak trzustki i jeden przypadek raka jelita grubego.

Histologicznie wszystkie nowotwory były gruczolakorakami.

2.5.4.2. Sposób przygotowania chorych

Czterem chorym, u których podczas laparotomii rozpoznano wodobrzusze pochodzenia nowotworowego, zakładano równocześnie do jamy otrzewnej cewnik, jak do dializy otrzewnowej (nr Ch 12). W przypadkach gdzie nie wykonywano laparotomii, identyczny cewnik wprowadzano do jamy brzusznej poprzez nakłucie powłok w lewym podbrzuszu. Pięciu chorym każdorazowo przed podaniem TNF odpuszczano 500-1000 ml płynu z jamy otrzewnej, a pozostałym ośmiu maksymalną możliwą ilość (od 4.500 do 8000 ml).

2.5.4.3. Dootrzewnowe podawanie rTNF

U chorych po laparotomii podawanie rTNF rozpoczynano w 3-4 dobie po zabiegu operacyjnym, a u chorych, u których cewnik zakładano drogą nakłucia jamy brzusznej, TNF podawano w kilka godzin po nakłuciu. Preparat rTNF rozcieńczano w objętości od 100 do 500 ml i podawano dootrzewnowo w powolnym wlewie. Po podaniu preparatu nie odpuszczano płynu z jamy otrzewnej przez okres 24 godzin.

U siedmiu chorych podano pięć dawek rTNF po 400 μg każda, co drugi dzień. U dwóch chorych podano pięć dawek po 200 μg rTNF co drugi dzień. Jednemu choremu podano 3 dawki po 500 μg rTNF co drugi dzień, a pozostałym trzem chorym podawano codziennie dawki rosnące, od 50 do 1000 μg rTNF przez 4-5 kolejnych dni.

2.5.4.4. Sposób postępowania z chorymi

Ze względu na występujący u pierwszych 4 chorych wzrost temperatury, u kolejnych przypadkach w chwili rozpoczęcia dootrzewnowego wlewu rTNF chorym podawano 5 ml pyralginy dożylnie lub 500 mg Paracetamolu doodbytniczo (154). W trakcie i po zakończeniu cyklu podawania rTNF, płyn z jamy otrzewnej badano bakteriologicznie.

2.5.4.5. Kryteria oceny

Objawy uboczne podawania rTNF oceniano wg skali ECOG/WHO. Miejscowy efekt działania preparatu po podaniu endoskopowym oceniano oglądając śródoperacyjnie zewnętrzną powierzchnię ściany narządu, natomiast błonę śluzową żołądka lub odbytnicy kontrolowano w trakcie badania histopatologicznego preparatu operacyjnego. Natomiast po zakończeniu dootrzewnowego podawania rTNF chorych poddano obserwacji ambulatoryjnej. Ilość wodobrzusza oceniano badaniem USG według skali Goldberga i Proto (48, 120).

2.5.4.6. Ocena czasu przeżycia

Wśród chorych z rakiem żołądka (por. 2.5.3.1), którym rTNF podawano miejscowo wyodrębniono grupę 13 chorych ze stopniem zaawansowania nowotworu III lub IVA wg klasyfikacji kliniczno-patologicznej Fieldinga. Porównano jej prawdopodobieństwo przeżycia do sparowanej grupy chorych o podobnych cechach rokowniczych (Tab. 5). Krzywe prawdopodobieństwa przeżycia obu grup porównywano przy pomocy testu log-rank. Za poziom istotności przyjęto $p < 0.05$.

Tab. 5. ***Charakterystyka grupy chorych z miejscowo zaawansowanym, resekcyjnym rakiem żołądka, którym podano rTNF doguzowo i grupy kontrolnej***

Grupa	rTNF i.t. n = 13	Kontrola n = 13
Wiek średni (SD)	53.4 (8.0)	57.2 (11.3)
Płeć M/K	7/6	7/6
Guz pierwotny T2	1	1
Guz pierwotny T3	3	3
Guz pierwotny T4	9	9
Typ histologiczny wg Laurena I	6	7
Typ histologiczny wg Laurena II	7	6
Przerzuty odległe	2	2
Stopień III zaawansowania raka wg Fieldinga	4	4
Stopień IVA zaawansowania raka wg Fieldinga	9	9
Całkowite wycięcie żołądka	3	3
Prawie całkowite wycięcie żołądka	10	10
Chemioterapia uzupełniająca FAM	7	8
Chemioterapia uzupełniająca FAM + BCG	6	5

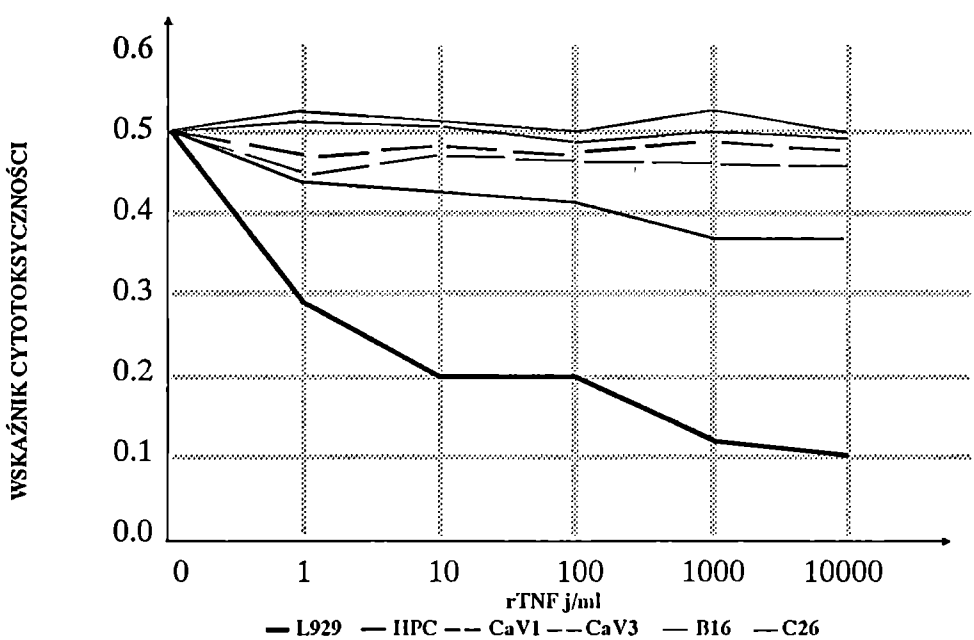
3. WYNIKI

Część doświadczalna

3.1. Ocena wrażliwości komórek nowotworowych na działanie rTNF in vitro

Przeprowadzone badania wykazały prawie całkowitą oporność badanych linii nowotworów ludzkich (CaV1, CaV3, HPC) i nowotworów doświadczalnych (czerniak B16 i rak jelita grubego C26) na działanie rTNF. Linię L929 użyto jako kontroli. Linia L929 wykazywała wrażliwość na działanie rTNF już przy stężeniu rTNF w podłożu około 1 j/ml (Ryc. 4).

Ryc. 4. *Efekt cytotoksyczny rTNF w stosunku do linii komórkowych*

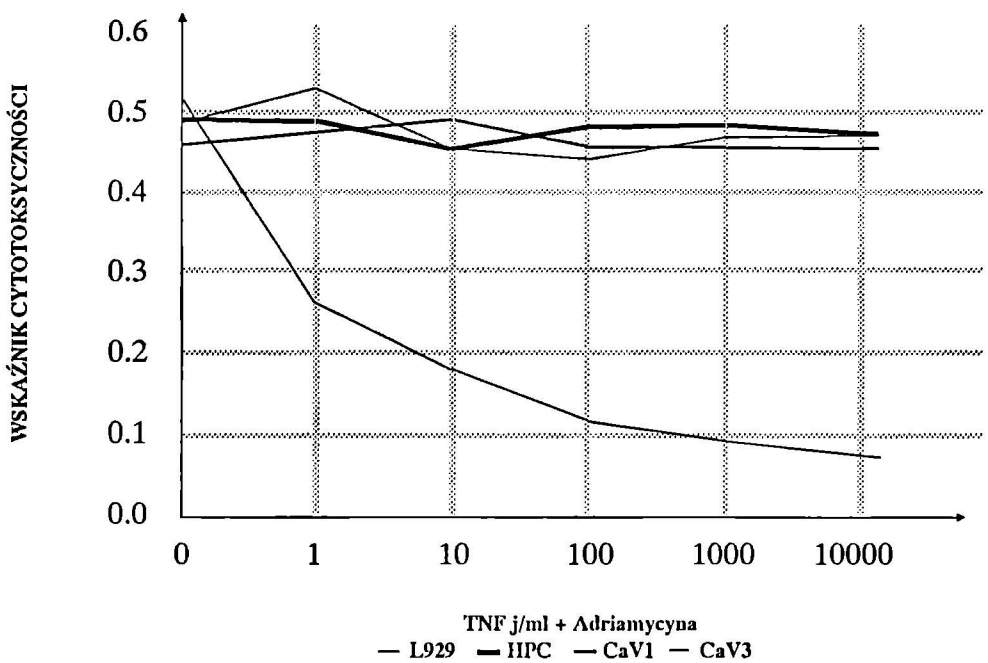


Badane linie komórkowe, zarówno mysich nowotworów doświadczalnych (B16, C26), jak i otrzymane linie komórkowe nowotworów ludzkich (HPC, CaV1, CaV3) nie wykazały wrażliwości na rTNF w zakresie stężeń $1\text{-}10^4$ j/ml.

3.2. Ocena wrażliwości ludzkich komórek nowotworowych na skojarzone działanie rTNF i cytostatyków in vitro.

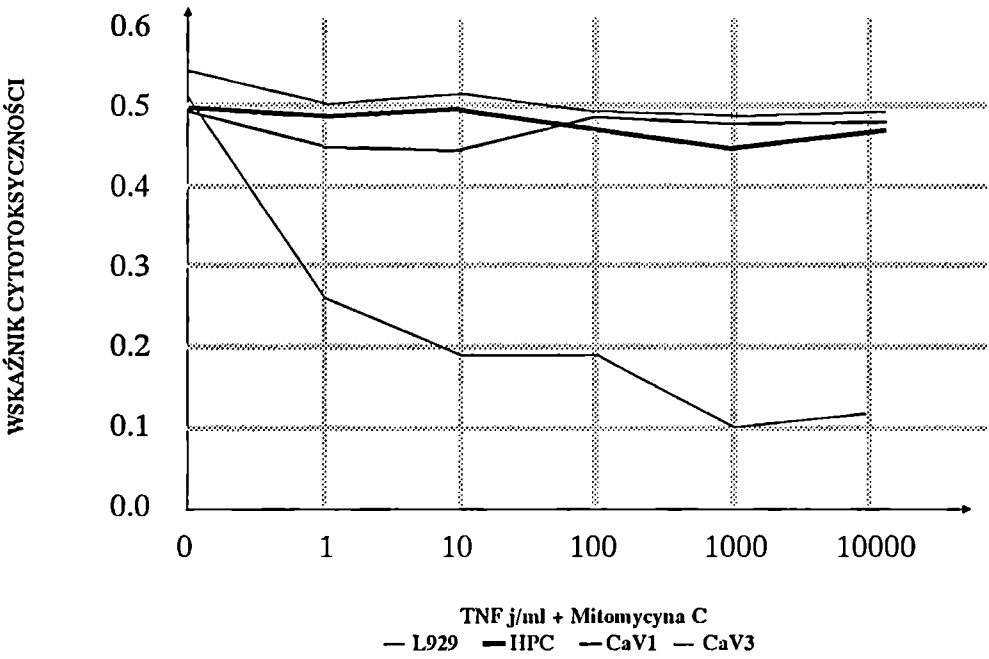
Przeprowadzone badania miały na celu określeni,e czy istnieje synergizm w działaniu przeciwnowotworowym rTNF i cytostatyków stosowanych w nowotworach przewodu pokarmowego (91). Dodanie adriamycyny do podłoża, w którym inkubowano komórki nie powodowało nasilenia niszczenia komórek nowotworowych. Wynik doświadczenia (Ryc. 5) był taki sam niezależnie od stosowanego stężenia chemioterapeutyku (0.17, 1.7, 17 μg/ml).

Ryc. 5. *Efekt cytotoksyczny rTNF i adriamycyny w stosunku do komórek nowotworowych*

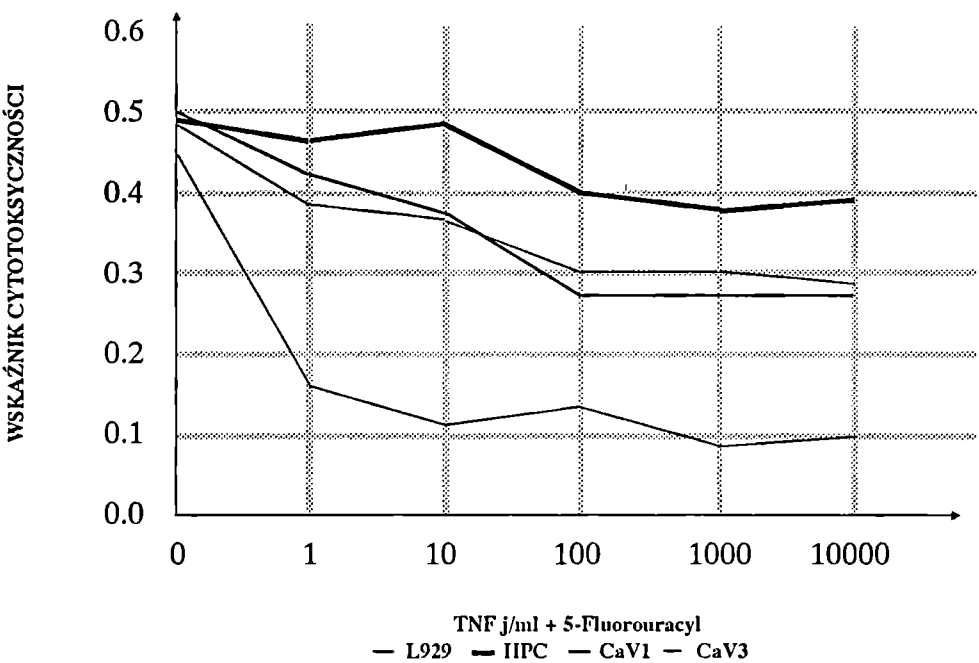


Również dodanie mitomycyny C w stężeniach 0.1, 1, i 10 μg/ml nie powodowało wystąpienia zjawiska cytotoksyczności (Ryc. 6). Jedynie 5-fluorouracyl w wysokim stężeniu (250 μg/ml) nasilał efekt cytotoksyczny rTNF (Ryc. 7).

Ryc. 6. *Efekt cytotoksyczny rTNF i mitomycyny C w stosunku do komórek nowotworowych*



Ryc. 7. *Efekt cytotoksyczny rTNF i 5-fluorouracylu w stosunku do komórek nowotworowych*

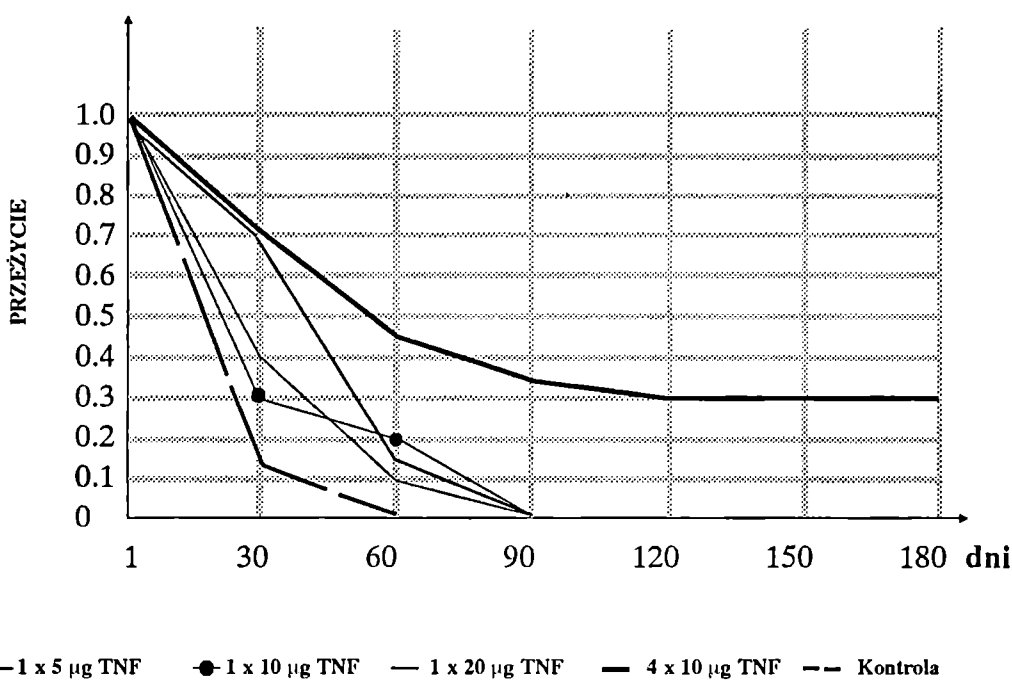


3.3. Wpływ miejscowego (doguzowego) podawania rTNF na wzrost przeszczepialnego czerniaka B16 u myszy C57Bl — model terapii paliatywnej (grupa A)

Jednorazowe dawki 5 i 10 μg rTNF podane doguzowo w pierwszej dobie po osiągnięciu przez guz wymiarów 5 x 5 mm, nie powodowały widocznego zahamowania wzrostu guza, a średni czas przeżycia wynosił odpowiednio 28.1 i 29.2 dni (Tab. 6). Przeżycia te nie różniły się istotnie od przeżyć w grupie kontrolnej (21.0 dni). W grupie A3 otrzymującej doguzowo 20 μg rTNF jednorazowo czas przeżycia wynosił 32.4 dni i był statystycznie znamiennie dłuższy ($p < 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże w wymienionych powyżej grupach nie obserwowano przeżycia dłuższego niż 120 dni ani nie stwierdzono wyleczenia (Ryc. 8). Najlepszy efekt terapeutyczny zaobserwowano w grupie A4 (cztery dawki po 10 μg rTNF). U 30% zwierząt uzyskano wyleczenie, a u dalszych 15% czas przeżycia przekroczył 60 dni. Średni czas przeżycia w grupie A4 wynosił 66.9 dni. W porównaniu do grupy kontrolnej (średni czas przeżycia 21.0 dni) jest to różnica statystycznie znamienna ($p < 0.04$). W grupie A4, średni wskaźnik powierzchni guza uległ redukcji do 24.0, podczas gdy we wszystkich pozostałych grupach wzrósł.

Wskazuje to, że efekt przeciwnowotworowy rTNF, choć ograniczony, to jednak jest zależny zarówno od dawki TNF, jak i sposobu podawania.

Ryc. 8. *Model terapii paliatywnej — przeżycie w grupach terapeutycznych*



Tab. 6. *Średni czas przeżycia, przeżycia 60 i 180-dniowe oraz średni wskaźnik powierzchni guza w grupach terapeutycznych — model terapii paliatywnej (grupa A)*

Grupa	Śr. czas przeżycia ± SD (dni)	Procent przeżyć 60-dniowych	Procent przeżyć 180-dniowych	Śr. wskaźnik pow. guza po okresie obserwacji (mm^2)
A1 (1 x 5μg rTNF i.t.)	28.1, 13.7	10	0	518.2
A2 (1 x 10μg rTNF i.t.)	29.2, 18.1	20	0	72.1
A3 (1 x 20μg rTNF i.t.)	32.4, 14.8	11	0	181.0
A4 (4 x 20μg rTNF i.t.)	66.9, 40.5	45	30	24.2
A0 (kontrola)	21.0, 7.0	0	0	601.2

3.4. Wpływ dootrzewnowego podawania rTNF u myszy C57Bl na występowanie wznowy miejscowej, przerzutów odległych oraz na czas przeżycia, po zabiegu usunięcia czerniaka B16 — model terapii adiuwancyjnej (grupa B)

3.4.1. Wznowa miejscowa

W grupie B1, tj. po zabiegu usunięcia guza pierwotnego otrzymującej niskie dawki rTNF (2μg), wznowa wystąpiła w 71.4% przypadków (Tab. 7). W grupie B2 otrzymującej wysokie dawki rTNF 10 μg) wznowa pojawiła się u 25% zwierząt, podczas gdy w grupie kontrolnej B0 wznowę stwierdzono u 64.2% zwierząt. Różnica pomiędzy grupą otrzymującą wysokie dawki TNF (B2) a pozostałymi (B1, B0) była statystycznie znamienna ($p < 0.05$). Średni czas wystąpienia wznowy miejscowej wynosił: w grupie B2: 27.7 ± 28.64 dni, w grupie B1: 19.6 ± 18.14 dni, a w grupie kontrolnej 11.9 ± 3.06 dni, różnice między poszczególnymi grupami były statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

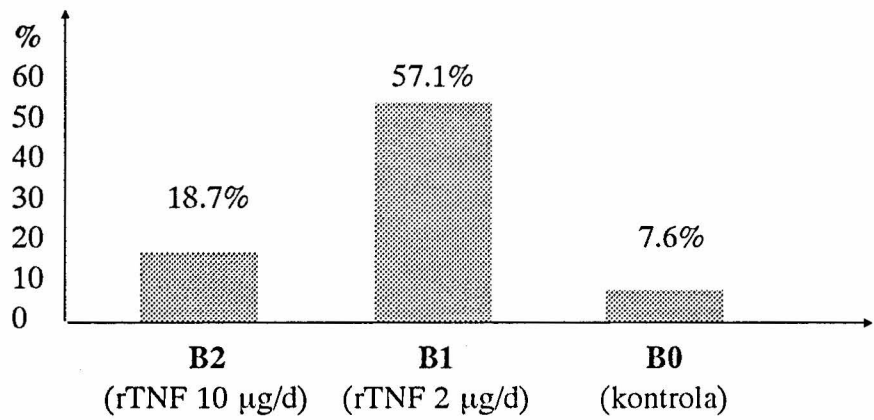
Tab. 7. *Częstość i czas występowania wznowy miejscowej u myszy C57B1 po zabiegu wycięcia guza w grupach terapeutycznych*

Grupa	Częstość występowania wznowy (%)	Czas występowania wznowy (dni)
B1 (15 x 2 μg TNF)	71.4	19.6 ± 18.6
B2 (15 x 10 μg TNF)	25	27.7 ± 22.6
B0 (kontrola)	64.2	11.9 ± 3.05

3.4.2. Przerzuty odległe

Największą częstość występowania przerzutów odległych czerniaka (płuca, wątroba, śledziona) stwierdzono (Ryc. 9) w grupie B1, która otrzymywała niskie dawki rTNF dootrzewnowo (57.1%). Częstość ta była znamiennie różna ($p < 0.05$) od częstości występowania przerzutów w grupie B2 otrzymującej rTNF w wyższych dawkach (18.7%) i w grupie kontrolnej B0 (7.6%). Te dwie ostatnie grupy nie różniły się istotnie pod względem częstości występowania przerzutów.

Ryc. 9. ***Częstość występowania przerzutów odległych po zabiegu usunięcia czerniaka B16 u myszy C57B1 w grupach terapeutycznych***



3.4.3. Czas przeżycia

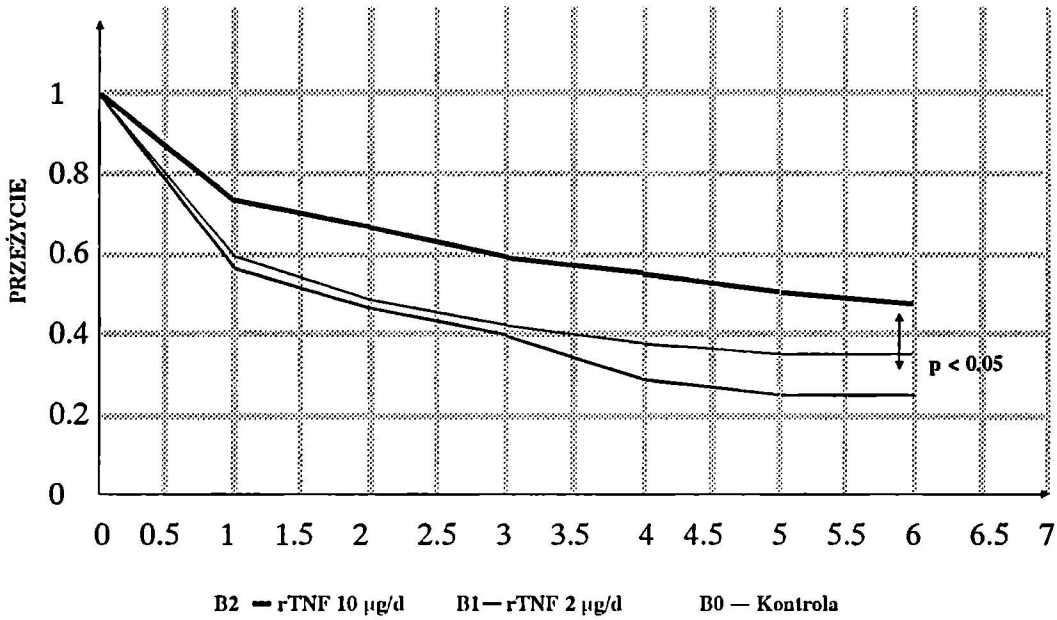
W grupie B2 otrzymującej wysokie dawki rTNF w okresie 6 miesięcy przeżycie wynosiło 50%, w grupie B1 (niskie dawki rTNF) 27.3% , a w grupie kontrolnej 35% (Ryc. 10). Natomiast średni czas przeżycia w powyższych grupach wynosił odpowiednio 112.2 ± 73.32 dni, 74.1 ± 42.19 dni a w grupie kontrolnej 87.6 ± 71.64 dni (Ryc. 11). Różnice przeżycia pomiędzy grupą B2 a grupami B1 i B0 (grupa kontrolna) były statystycznie istotne.

3.5. Wpływ dootrzewnowego podawania rTNF u myszy Balb/c na występowanie wznowy miejscowej, przerzutów odległych i czas przeżycia po zabiegu usunięcia raka jelita grubego C26 — model terapii adiuwancyjnej (grupa B)

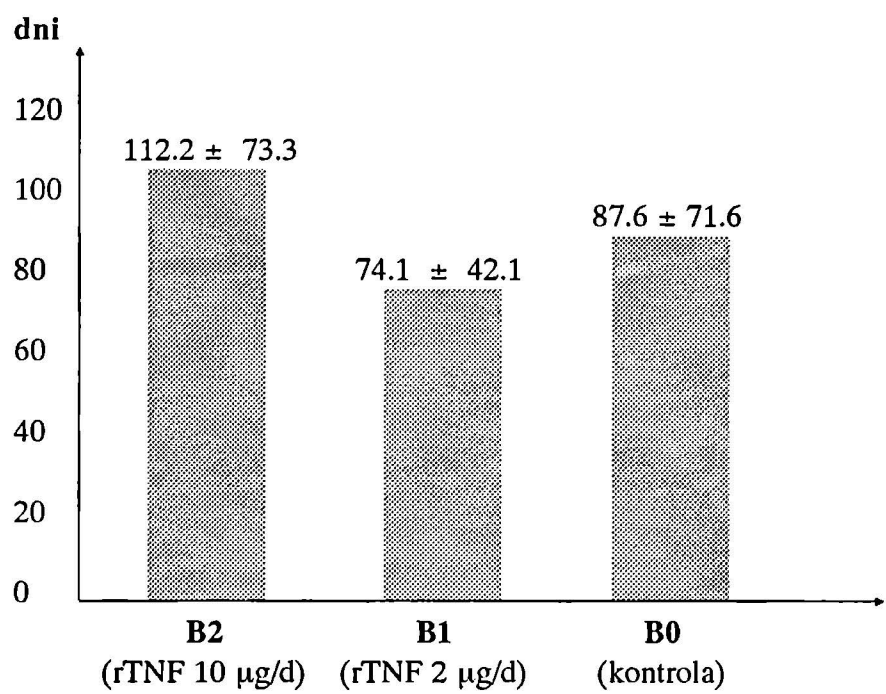
3.5.1. Wznowa miejscowa

W grupie B2 otrzymującej wysokie dawki rTNF wznowę zaobserwowano u 31.6% zwierząt, natomiast w grupie B1 i w grupie B0 (kontrolnej)

Ryc. 10. *Przeżycie myszy C57B1 po zabiegu usunięcia czerniaka B16 w grupach terapeutycznych*



Ryc. 11. *Średni czas przeżycia myszy C57B1 po zabiegu usunięcia czerniaka B16 w grupach terapeutycznych*



wystąpiła odpowiednio u 59.6% i 70.2% zwierząt (Tab. 8). Różnica częstości występowania wznowy pomiędzy grupą B2 a pozostałymi grupami była statystycznie istotna ($p < 0.05$). Podawanie rTNF nie powodowało jednak istotnego opóźnienia wystąpienia wznowy miejscowej.

Tab. 8. *Częstość i czas występowania wznowy miejscowej u myszy Balb/c po zabiegu usunięcia raka jelita grubego C26 w grupach terapeutycznych*

Grupa	Częstość wystąpienia wznowy (%)	Czas wystąpienia wznowy (dni)
B1 (15 X 2μg TNF)	59.6	19.6 +/- 5.1
B2 (15 X 10μg TNF)	31.6	17.4 +/- 3.7
B0 (kontrola)	70.2	10.8 +/- 3.6

3.5.2. Przerzuty odległe

Częstość występowania przerzutów odległych w grupie B1, B2 i grupie kontrolnej była podobna i wynosiła 12.7%-14.1%.

3.5.3. Czas przeżycia

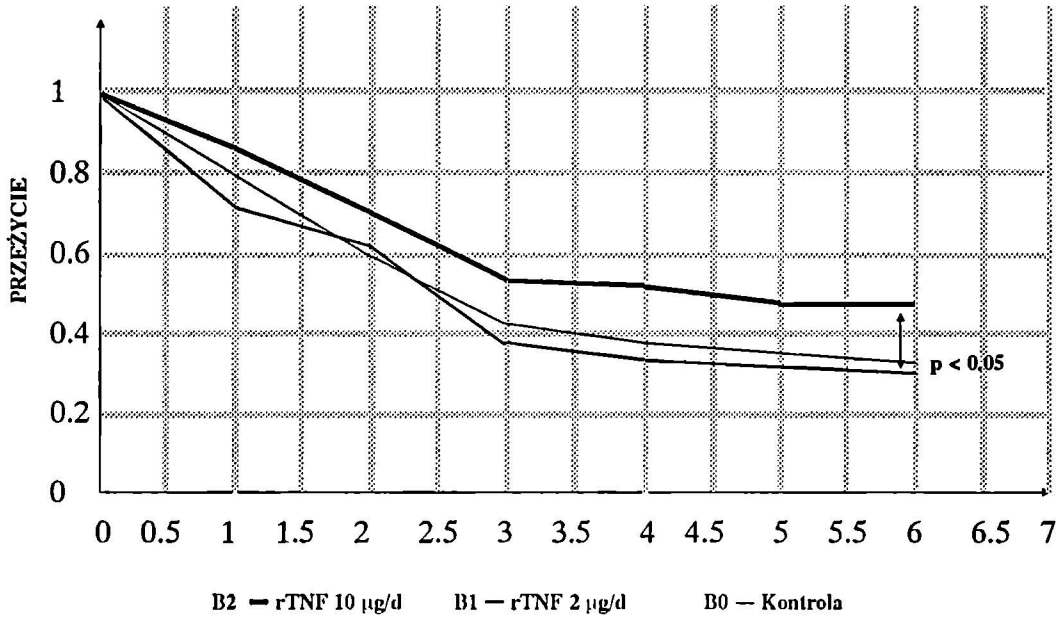
Przeżycia 6-miesięczne w grupie B2 (wysokie dawki rTNF) stwierdzono u 47% zwierząt (Ryc. 12), w grupie B1 (niskie dawki rTNF) u 29.2% a w grupie kontrolnej u 35%. Średni czas przeżycia wynosił odpowiednio 106.3 ± 70.32 dni, 79.7 ± 54.2 dni i 92.05 ± 69.73 dni (Ryc. 13). Przeżycie 6-miesięczne w grupie B2 było istotnie statystycznie dłuższe niż w pozostałych grupach ($p < 0.05$).

W przypadku raka jelita grubego C26 u myszy Balb/c efekt terapeutyczny obserwowano tylko w grupie otrzymującej wysokie dawki rTNF. Jednak nie stwierdzono promocji przerzutowania, jak w czerniaku B16.

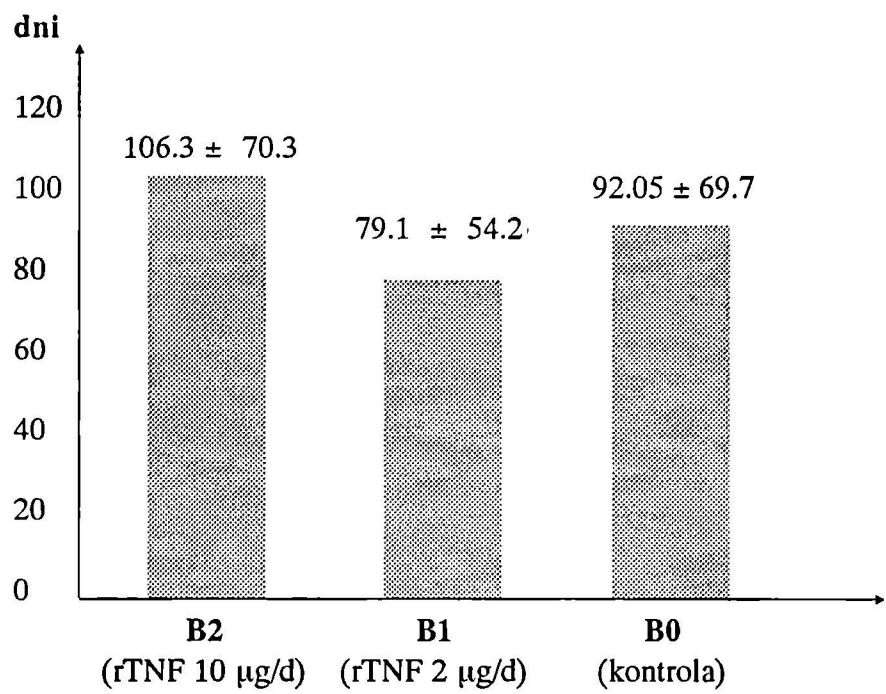
3.6. Wpływ dootrzewnowego podawania rTNF na czas przeżycia myszy z wznową miejscową czerniaka B16 i raka jelita grubego C26 — model terapii paliatywnej wznowy miejscowej (grupa C)

W przypadkach czerniaka B16 (Ryc. 12), w grupie C2 (otrzymującej rTNF w dawkach 10mg) uzyskano wyleczenie u 27.2% myszy. W pozostałych dwu grupach (C1, C0) wszystkie zwierzęta zginęły w okresie do 3 miesięcy (Ryc. 14).

Ryc. 12. *Przeżycie myszy Balb/c po zabiegu usunięcia raka jelita grubego C26 w grupach terapeutycznych*



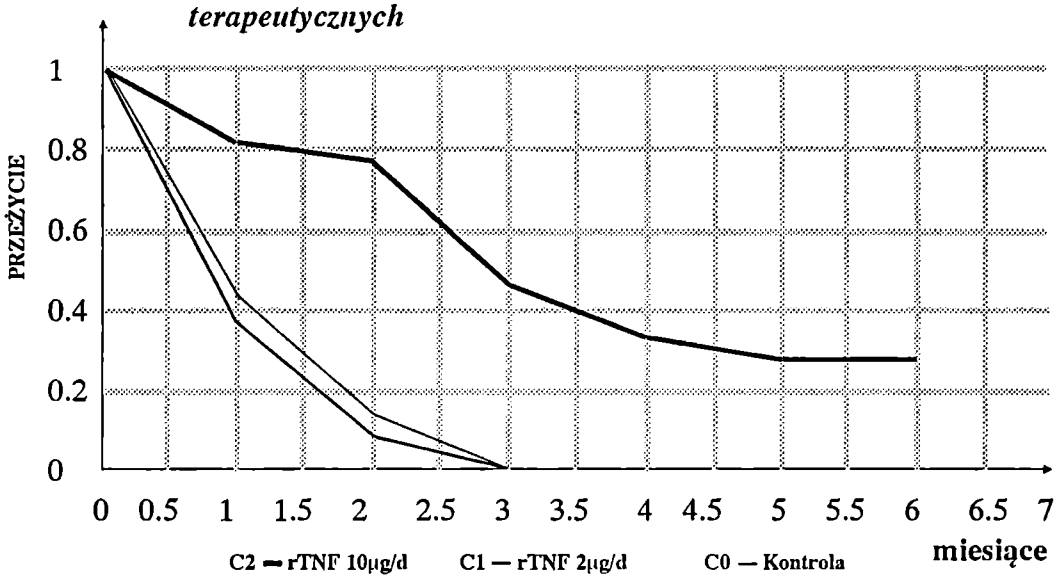
Ryc. 13. *Średni czas przeżycia myszy Balb/c po zabiegu usunięcia raka jelita grubego C26 w grupach terapeutycznych*



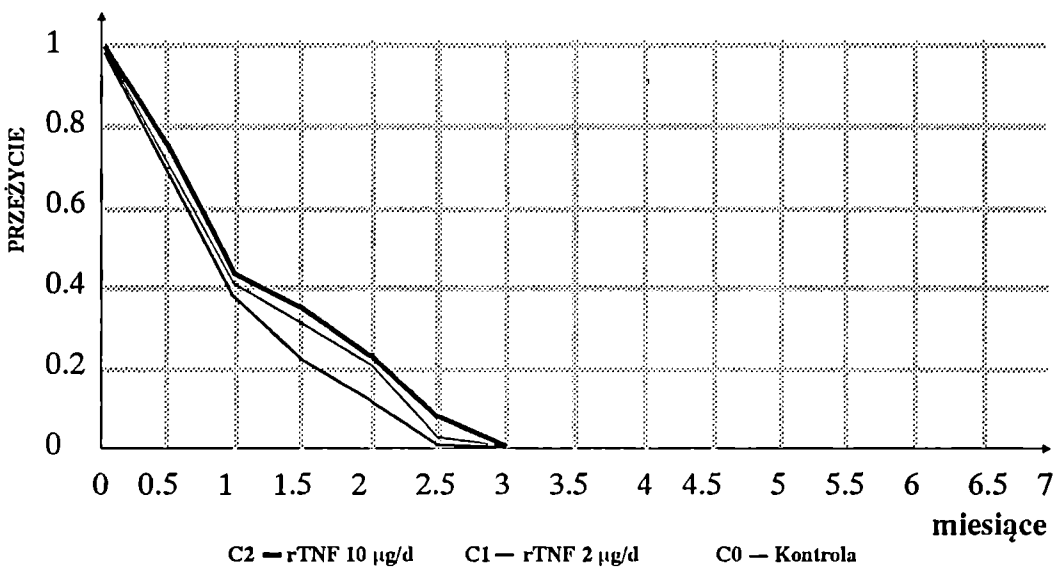
U myszy Balb/c z rakiem jelita grubego C26, w żadnej z grup nie uzyskano przeżycia dłuższego niż 3 miesiące (Ryc. 15), a średni czas przeżycia był podobny we wszystkich grupach.

Uzyskane wyniki świadczą o większej wrażliwości czerniaka B16 na działanie rTNF w stosunku do raka jelita grubego C26 w prezentowanym modelu. Potwierdzają one również efektywność rTNF w leczeniu wznowy nowotworowej.

Ryc. 14. *Przeżycie myszy C57B1 ze wznową czerniaka B16 w grupach terapeutycznych*

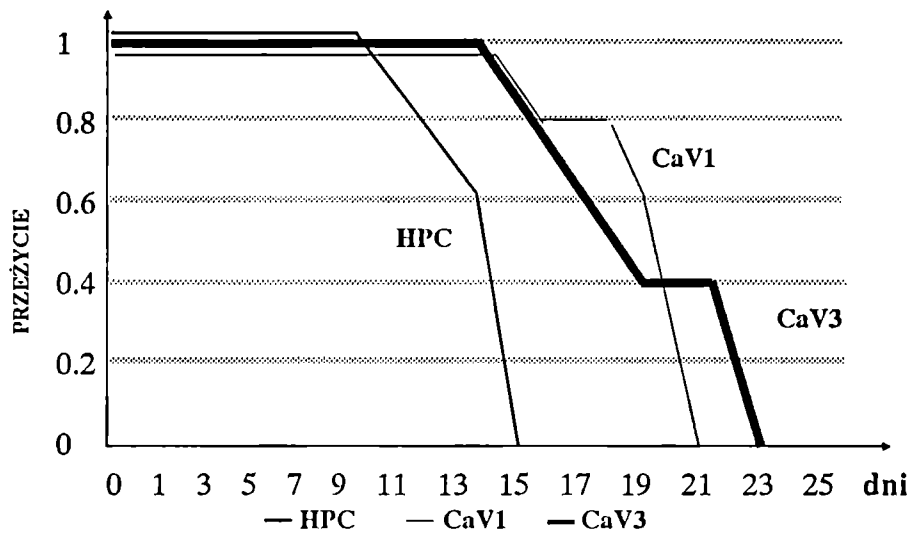


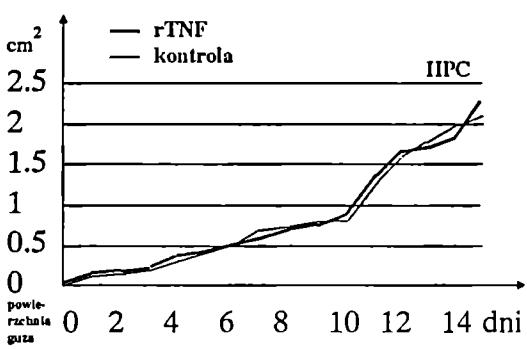
Ryc. 15. *Przeżycie myszy Balb/c ze wznową raka jelita grubego C26 w grupach terapeutycznych*

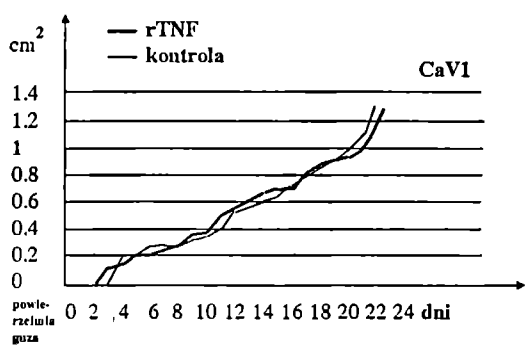


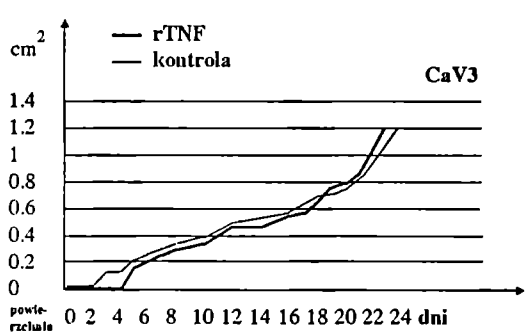
3.7. Wpływ doguzowego podawania rTNF na wzrost przeszczepialnych nowotworów ludzkich u myszy SCID oraz na czas przeżycia zwierząt

Ryc. 16. *Przeżycie myszy SCID z przeszczepionymi nowotworami ludzkimi CaV1, CaV3, HPC*









Ryc. 17.
Wpływ rTNF na wzrost nowotworów ludzkich u myszy SCID

Użyte do badań wyizolowane od chorych linie komórkowe CaV1, CaV3 (rak żołądka) i HPC (rak trzustki) po wszczepieniu myszom SCID w ciągu 5-14 dni prowadziły do powstania guza o wymiarach 5 x 5 mm. Największą dynamikę wzrostu wykazywały komórki linii HPC (Ryc. 16).

W grupach zwierząt otrzymujących rTNF, jak i w grupach kontrolnych obserwowano podobny wzrost nowotworów (Ryc. 17).

Wskazuje to na oporność badanych nowotworów na TNF. W zależności od typu nowotworu najdłuższe przeżycia sięgały odpowiednio dla zwierząt z przeszczepionym nowotworem HPC — 15 dni, z CaV1 — 22 dni, a z CaV3 — 23 dni.

Uzyskane rezultaty świadczą o wysokiej dynamice wzrostu nowotworów ludzkich u myszy SCID i ich oporności na rTNF w użytym modelu terapii paliatywnej.

Część kliniczna

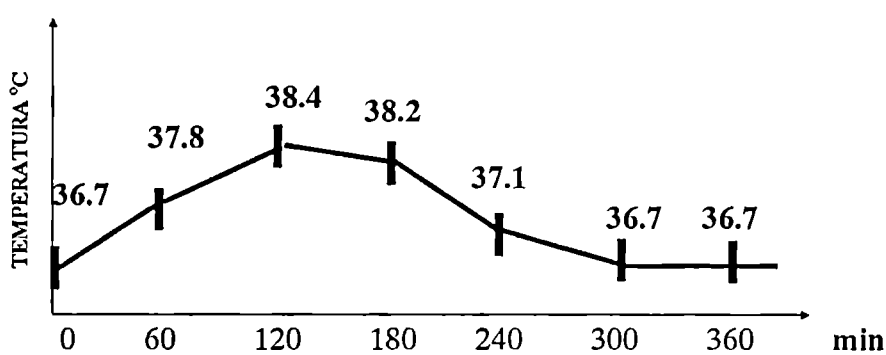
3.8. Ocena bezpieczeństwa miejscowego, doguzowego podawania rTNF u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy

Oceniano objawy uboczne występujące po doguzowym podaniu rTNF u 34 chorych z rakiem żołądka lub rakiem odbytnicy.

3.8.1. Objawy ogólne

Najczęstszym, występującym u wszystkich chorych objawem ubocznym była gorączka. Średnią temperaturę po podaniu rTNF przedstawia Ryc. 18. W około 120 minut po podaniu rTNF temperatura narastała do 38.4°C i wynosiła od 37.8

Ryc. 18. *Średnia temperatura ciała po podaniu rTNF u chorych, u których nie stosowano premedykacji*



do 39.5°C. Gorączka ustępowała po podaniu niesterydowych leków przeciwzapalnych (indometacyna, paracetamol).

U chorych, u których leki przeciwzapalne stosowano przed podaniem rTNF nie obserwowano istotnego wzrostu temperatury.

U żadnego chorego nie obserwowano zaburzeń układu krążenia (spadku ciśnienia tętniczego, zaburzeń rytmu serca). U chorych nie występowały nudności, wymioty, uczucie zmęczenia, ani nie zgłaszali też innych dolegliwości, które wiązaliby z podaniem preparatu.

3.8.2. Zaburzenia funkcji wątroby

U 3 chorych w 24 godziny po podaniu rTNF wystąpiło podniesienie poziomu AspAt i/lub AlAt oraz GGTP. U jednego z tych chorych obserwowano przejściowe podniesienie poziomu bilirubiny do 30 μmol/l. Wartości te wróciły do normy w następnej dobie (Tab. 9).

3.8.3. Funkcja nerek

U żadnego z chorych nie obserwowano wzrostu poziomu kreatyniny i mocznika w surowicy, krwiomoczu.

3.8.4. Morfologia krwi obwodowej

Podanie rTNF nie spowodowało zmian ani w ilości erytrocytów ani w poziomie hemoglobiny. Leukocytoza nie ulegała istotnym zmianom i mieściła się w przedziale 4.5-7.9 tys/μl^3. Również nie stwierdzono istotnego wpływu podania rTNF na liczbę płytek krwi.

3.8.5. Zmiany miejsowe

W ocenie śródoperacyjnej i histopatologicznej nie stwierdzono zmian martwiczych w sąsiedztwie nowotworu, ani perforacji guza nowotworowego.

3.9. Ocena wpływu podawania rTNF na czas przeżycia u 13 chorych z miejscowo zaawansowanym, resekcyjnym rakiem żołądka

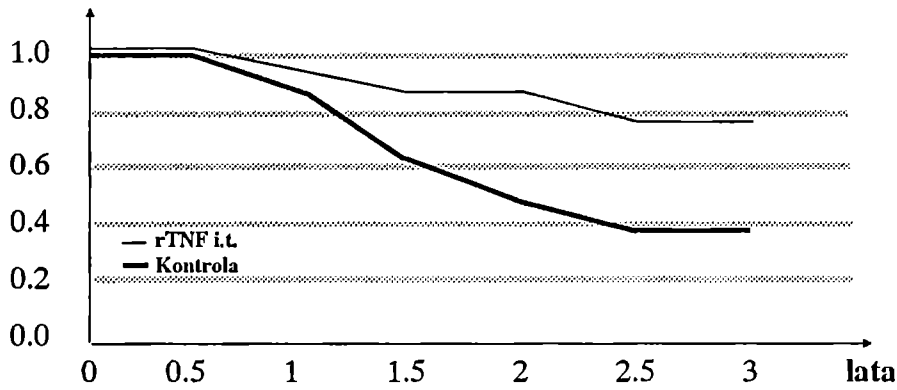
U 13 chorych otrzymujących przedoperacyjnie rTNF stwierdzono zaawansowanie nowotworu w stopniu III lub IVA według klasyfikacji Fieldinga. Ze względu na potencjalnie największy wpływ podawania rTNF na chorobę nowotworową w tym stopniu zaawansowania, oceniano wpływ zastosowanej immunoterapii na czas przeżycia.

Tab. 9. *Poziom AspAt, AlAt, GGTP i bilirubiny u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy przed i po doguzowym podaniu rTNF*

IM	AspAt			AlAt			GGTP			Bilirubina		
	0	24h	48h	0	24h	48h	0	24h	48h	0	24h	48h
1	12	13	15	17	16	16	8	10	10	13	13	13
2	17	19	15	18	18	21	4	4	5	9	8	9
3	14	14	16	15	19	17	10	12	12	16	18	14
4	17	31	18	15	40	22	14	14	13	12	12	11
5	8	11	11	13	14	12	4	7	7	8	12	8
6	15	15	16	19	21	17	10	10	12	11	19	19
7	16	19	17	20	22	22	14	13	13	10	9	9
8	10	13	11	14	14	16	5	7	7	4	4	9
9	8	8	9	11	13	16	10	12	12	7	7	7
10	12	18	17	20	16	16	15	18	18	12	17	17
11	13	12	16	21	20	22	18	16	16	8	9	8
12	18	6	15	16	14	14	7	10	8	5	5	4
13	12	18	13	17	15	19	11	14	11	13	14	10
14	6	8	11	9	8	14	6	6	4	15	13	17
15	18	16	18	21	21	22	17	17	20	15	12	12
16	15	14	14	16	19	17	10	11	8	9	15	17
17	11	11	10	8	10	10	5	7	7	11	11	6
18	17	38	19	16	43	22	16	18	18	15	30	21
19	12	10	10	17	19	17	12	16	15	10	11	6
20	9	13	11	13	15	15	9	7	9	12	12	16
21	14	14	17	15	13	15	10	11	17	16	12	8
22	9	10	9	11	9	13	7	8	11	19	15	12
23	14	28	18	17	31	20	12	22	19	15	14	15
24	13	15	11	16	15	15	10	10	12	7	9	10
25	15	16	15	19	22	22	13	11	16	18	17	18
26	18	18	17	20	19	21	21	21	16	12	12	9

Wartości normalne: AspAt do 18 U/l, AlAt do 22 U/l, GGTP do 22 U/l, bilirubina do 19 μmol/l

Ryc. 19. *Prawdopodobieństwo przeżycia u chorych z miejscowo zaawansowanym, resekcyjnym rakiem żołądka w grupach terapeutycznych*



W okresie trzyletniej obserwacji prawdopodobieństwo przeżycia chorych w grupie otrzymującej rTNF wynosiło 68.5%. W sparowanej grupie kontrolnej prawdopodobieństwo przeżycia określono na 38.5%. (Ryc. 19). Różnica prawdopodobieństwa przeżycia między grupami nie była statystycznie znamienna (p = 0.1), prawdopodobnie z uwagi na małą liczebność grup.

3.10. Ocena bezpieczeństwa dootrzewnowego stosowania rTNF oraz efektu terapeutycznego w rozsiewie procesu nowotworowego do otrzewnej

3.10.1. Temperatura

Jeżeli chorym nie podano równocześnie z rTNF środków przeciwgorączkowych, niezależnie od wielkości dawki preparatu w 60 do 120 minut po podaniu preparatu, występowała gorączka z dreszczami. Przy zastosowaniu premedykacji pyralginą lub paracetamolem nie notowano tych objawów.

3.10.2. Objawy miejscowe

U dwojga chorych po podaniu rTNF wystąpiły dolegliwości bólowe w jamie brzusznej, którym nie towarzyszyły objawy otrzewnowe. Ustępowały one po podaniu środków rozkurczowych i przeciwbólowych. Nie obserwowano powikłań związanych z zakładaniem i obecnością cewnika dootrzewnowego, ani zakażenia wodobrzusza.

3.10.3. Układ krążenia

W trakcie podawania rTNF nie zaobserwowano u żadnego z chorych objawów dekompensacji układu krążenia. U 3 chorych, którzy mieli niskie ciśnienie

tętnicze krwi (90-105 mmHg) przy podawaniu preparatu występowały spadki ciśnienia, jednak bez dalszych ujemnych skutków.

3.10.4. Czynność wątroby

W jednym przypadku u chorej z licznymi przerzutami nowotworu do wątroby wystąpił istotny wzrost poziomu transaminaz, przy normalnym poziomie bilirubiny. U pozostałych chorych nie występowały istotne zmiany funkcji wątroby.

3.10.5. Czynność nerek

We wszystkich przypadkach diureza dobowa była prawidłowa. Poziom kreatyniny w surowicy mieścił się w granicach normy. U 2 chorych nastąpił wzrost poziomu mocznika w surowicy do 17 i 24 mmol/l. Jednak wyjściowo u tych chorych poziom mocznika w surowicy był na górnej granicy normy.

3.10.6. Czas przeżycia

Średni czas przeżycia chorych, którym podawano rTNF wynosił około 6 tygodni (48 godz. do 13 tygodni)

3.10.7. Paliatywny efekt terapeutyczny

U 2 chorych w przypadku raka żołądka stwierdzono całkowity zanik wodobrzusza w 8-tygodniowym okresie obserwacji. W jednym przypadku stwierdzono niewielką ilość płynu po 4 tygodniach po zakończeniu podawania rTNF (czas przeżycia 5 tygodni).

U pozostałych chorych nie stwierdzono zahamowania narastania wodobrzusza. Tak więc paliatywny efekt terapeutyczny osiągnięto jedynie u części chorych, przy braku istotnych objawów ubocznych.

4. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały:

— oporność badanych linii komórek nowotworów doświadczalnych oraz wyizolowanych od chorych linii komórek nowotworów ludzkich na cytotoksyczne działanie rTNF w warunkach in vitro
— synergistyczny efekt działania przeciwnowotworowego rTNF i 5-Fluorouracylu w niektórych przypadkach komórek raka żołądka w warunkach in vitro. Takiego efektu nie obserwowano w skojarzeniu rTNF i Adriamycyny oraz Mitomycyny C
— aktywność terapeutyczną preparatu rTNF w eksperymentalnych modelach in vitro terapii adiuwancyjnej i paliatywnej
— brak istotnych efektów toksycznych miejscowego (doguzowego) podawania rTNF w przypadkach raka żołądka i raka odbytnicy
— przedłużenie przeżycia chorych z rakiem żołądka, którym przedoperacyjnie podawano doguzowo rTNF
— paliatywny efekt terapeutyczny dootrzewnowego podawania rTNF u części chorych z wodobrzuszem pochodzenia nowotworowego.

Ocenie wrażliwości na cytotoksyczne działanie rTNF poddano linie komórek nowotworowych użyte do dalszych badań *in vivo*. Wykazana oporność badanych komórek nowotworów doświadczalnych na szeroki zakres stężeń rTNF potwierdziła wcześniej publikowane dane (41). Jednak w innych badaniach (10, 173, 60) stwierdzono, że TNF hamuje wzrost hodowli czerniaka B16 *in vitro*. Efekt cytotoksyczny uzyskiwano kojarząc TNF z cytostatykami (10, 60) lub cytokinami (173).

Cytotoksyczne oddziaływanie TNF w stosunku do komórek czerniaka B16 w warunkach in vitro opisywano dotąd jedynie w eksperymentach bardziej złożonych. Wówczas komórki nowotworu znajdowały się w kohodowli ze zdrową tkanką płodową (84) lub były poddawane działaniu makrofagów stymulowanych BCG (70).

Interesującym jest fakt, że czerniak B16 mimo braku wrażliwości na TNF in vitro, przeszczepiony myszom C57Bl wykazuje wrażliwość na tę cytokinę. Podanie myszom z czerniakiem B16 TNF, zarówno dootrzewnowo, jak i doguzowo prowadziło do zahamowania wzrostu lub regresji guza (21, 38). Opisywane wyżej zjawiska opisywano też stosując niektóre muteiny TNF (43). Również wrażliwość na TNF może różnić się wśród poszczególnych klonów czerniaka B16 (43).

Podobnie linie komórek nowotworów ludzkich w części przypadków wykazują oporność na działanie TNF in vitro (41, 185), co nie implikuje jednoznacznie braku efektu tej cytokiny w warunkach in vivo (42, 190).

Zarówno niniejsze, jak i inne badania wykazały, że działanie przeciwnowotworowe TNF związane jest nie tylko z bezpośrednim cytotoksycznym uszkodzeniu komórki nowotworowej, ale i również z aktywowaniem szeregu mechanizmów immunologicznych gospodarza i indukcji zmian w mikrośrodowisku guza, a zwłaszcza układzie naczyniowym. TNF powoduje aktywację komórek układu immunologicznego, w tym monocytów, i komórek NK (72, 36, 112, 123). Indukuje również produkcję innych cytokin (49). Potęguje to efekt przeciwnowotworowy, gdyż TNF i inne cytokiny działają synergistycznie (72, 96, 178). Zarówno egzogenny, jak i endogenny TNF hamuje angiogenezę w obrębie nowotworu, co ogranicza wzrost guza (131).

Szereg badań wskazuje, że TNF może wykazywać synergistyczne działanie przeciwnowotworowe z niektórymi lekami cytostatycznymi (3, 18, 61, 140). Stanowiło to podstawę do oceny wrażliwości uzyskanych linii nowotworów ludzkich (HPC, CaV1 i CaV3) na działanie rTNF w skojarzeniu z adriamycyną, mitomycyną C i 5-fluorouracylem. Stwierdzony efekt synergistycznego działania rTNF i 5-FU w stosunku do komórek linii raka żołądka i raka trzustki występował jednakże dopiero przy wysokim stężeniu 5-FU (250 μg/ml). Potwierdza to obserwacje Shillera i Bittnera (139), którzy obserwowali synergizm TNF i 5-FU *in vitro* w przypadku komórek raka jelita grubego. Same cytostatyki w badanym zakresie stężeń nie miały wpływu na zachowanie się badanych komórek nowotworowych *in vitro.*

Natomiast łączne stosowanie rTNF z ADR lub MMC nie prowadziło do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych. Jednak w badaniach wykorzystujących model przeszczepionego ludzkiego raka jelita grubego myszom "nude" obserwowano synergizm działania ADR i TNF (89). Musi mieć to związek z innymi mechanizmami zachodzącymi w warunkach in vivo. W badaniach z użyciem linii komórkowych raka jelita grubego (in vitro) opisywano efekt krzyżowej oporności tych komórek na działanie TNF i ADR (189).

Zaobserwowane zjawisko synergistycznego działania 5-FU i rTNF może stanowić probę wyjaśnienia korzystnych wyników prób klinicznych immunochemioterapii obejmujących połączenie 5-FU i niespecyficznych modulatorów immunologicznych (5-FU+BCG, 5-FU+Decaris) (118, 119, 141). Należy przy tym zauważyć, że 5-FU działa stosunkowo słabo immunosupresyjnie.

Zastosowane w niniejszych badaniach modele eksperymentalne miały na celu symulację najczęściej spotykanych rodzajów terapii przeciwnowotworowej. Model A — doguzowego podawania rTNF był próbą doświadczalną leczenia paliatywnego na drodze miejscowej immunoterapii. W modelu B symulowano sytuację leczenia adiuwancyjnego po zabiegu wycięcia guza, a w modelu C sytuację paliatywnego leczenia wznowy nowotworowej po zabiegu operacyjnym. Większość opisywanych w literaturze badań jest opartych na modelu A, natomiast nieliczne doświadczenia dotyczą leczenia adiuwancyjnego lub leczenia wznowy (125). Opisane wyżej modele eksperymentalne mogą stanowić podstawę do oceny przydatności TNF i innych cytokin, czy immunomodulatorów w leczeniu nowotworów.

Wielu badaczy wyraża pogląd, że eksperymentalne modele choroby nowotworowej wnoszą szereg informacji pozwalających na ocenę badanego modelu immunoterapii ludzkich nowotworów. Panuje przy tym rozbieżność poglądów co do ich znaczenia dla praktyki klinicznej (172, 174). Badania na modelach zwierzęcych pozwalają ocenić aktywność przeciwnowotworową testowanego preparatu, sposób dawkowania i mechanizmy działania przeciwnowotworowego badanej substancji. Możliwość ekstrapolacji tych danych do badań klinicznych w dużej mierze zależy od właściwego doboru modelu zwierzęcego oraz od charakteru badanego preparatu (np. syntetyczne związki chemiczne, cytokiny, biopreparaty). W przypadku ludzkich cytokin niektóre wykazują bardzo zbliżone działanie u myszy i u człowieka (IL-2, TNF), a działanie innych (IL-6, IFNγ) różni się w mniejszym lub większym stopniu (174).

Wybór modeli syngenicznych guzów nowotworowych i przeszczepialnych nowotworów ludzkich u myszy SCID pozwolił na śledzenie efektów działania przeciwnowotworowego rTNF oraz na próbę oceny wpływu na nie mechanizmów immunologicznych gospodarza.

Pomimo braku bezpośredniego efektu cytotoksycznego in vitro (Ryc. 4) rTNF posiadał zdolność hamowania wzrostu doświadczalnych guzów nowotworowych. Przeprowadzone badania wykazały, że przeciwnowotworowe działanie rTNF było zależne od zastosowanej dawki i masy komórek nowotworowych w organizmie. Efekt przeciwnowotworowy był większy po zredukowaniu masy nowotworu przez zabieg operacyjny, a więc w modelu terapii adiuwancyjnej.

Działanie rTNF wykazano in vivo również w przypadkach nowotworów, których komórki w warunkach in vitro były niewrażliwe na TNF. TNF wykazywał efekt przeciwnowotworowy zarówno w modelu terapii adiuwancyjnej, jak i paliatywnej. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia wykazujące wrażliwość przeszczepionego czerniaka B16 na TNF (10, 21, 38).

W czerniaku B16 u myszy rTNF podany doguzowo wykazywał działanie przeciwnowotworowe zależne od dawki preparatu i schematu podania. Dawka 10 i 20 μg podana jednorazowo nie miała efektu przeciwnowotworowego, natomiast dawka 40 μg podana w 4 wstrzyknięciach prowadziła do wyleczenia u 30% zwierząt.

W analogicznym modelu eksperymentalnym opisanym w literaturze (21) około 30% wyleczeń uzyskano podając doguzowo 10 dawek po 5 μg rTNF. Jak wynika z innych doniesień, korzystniejszy efekt terapeutyczny uzyskiwano kojarząc TNF z interferonem γ (132, 21) w przypadku czerniaka B16, jak również innych nowotworów (105).

Efekt terapeutyczny uzyskany w grupie A4 (4 x 10 μg rTNF) modelu terapii paliatywnej był również porównywalny do efektu zabiegu operacyjnego wycięcia czerniaka B16 o tym samym stopniu zaawansowania (grupa B0).

Druga część eksperymentu (grupa B) symulowała model terapii adiuwancyjnej. Uzyskane wyniki wskazują, że systemowe (dootrzewnowe) podanie rTNF po zabiegu wycięcia guza poprawia przeżycia zarówno w przypadkach czerniaka B16, jak i raka jelita grubego C26 . Dotyczy to zastosowania wysokich dawek rTNF (grupa B2) w obu typach nowotworu. W grupach gdzie stosowano pięciokrotnie niższe dawki rTNF (B1) nie stwierdzono efektu przeciwnowotworowego. Potwierdza to doniesienie, że dootrzewnowe podawanie TNF w modelu przeszczepialnego czerniaka B16 (21, 38, 43) nie ma wpływu lub jest on nieznaczny. Jednak w cytowanych pracach nie usuwano guza nowotworowego przed podawaniem TNF. Fakty te wskazują, że efekt terapeutyczny TNF zależy od zastosowanej dawki preparatu i wielkości zmiany pierwotnej.

W modelu terapii adiuwancyjnej przeszczepialnego czerniaka B16 stwierdzono promocję przerzutowania w grupie otrzymującej niskie dawki rTNF. Tego zjawiska nie obserwowano w grupie otrzymującej wysokie dawki rTNF. Taka zależność promocji przerzutowania od dawki rTNF nie była do tej pory opisywana. Zjawisko nasilenia powstawania przerzutów było opisywane przez autorów stosujących model melanoma B16/C57Bl (110, 94, 80) , jak również w przeszczepialnych nowotworach ludzkich u myszy nude (106, 112). Jednak publikowane dotychczas wyniki dotyczyły przerzutów uzyskiwanych poprzez dożylne podanie komorek nowotworowych. W tych przypadkach wpływ na ilość przerzutów miał czas, w którym komórki nowotworu poddano inkubacji z TNF przed dożylnym ich podaniem.

Natomiast omawiane wyniki własne dotyczą przerzutów spontanicznych, co lepiej odzwierciedla naturalny przebieg choroby nowotworowej. Interesujące jest, że w innych doniesieniach opisywano regresję przerzutów czerniaka B16 pod wpływem działania TNF (131, 37). Należy jednak zauważyć, że pomimo zwiększonej częstości występowania przerzutów w grupie B1 nie obserwowano skrócenia czasu przeżycia w stosunku do grupy kontrolnej.

Jak się wydaje, promocja przerzutów może mieć związek z martwicą mikroognisk nowotworu pozostałych po usunięciu pierwotnej masy guza i uwolnieniem do krążenia komórek nowotworowych, właściwościami TNF jako induktora kolagenazy wewnątrz guza nowotworowego i aktywatora plazminogenu (45, 58), zwiększeniem zdolności adhezji komorek nowotworowych do śródbłonka naczyń (11, 110, 124), związane ze zwiększoną ekspresją molekuł adhezyjnych (94)

i nowotworzeniem naczyń (49). Prawdopodobnie przy podawaniu dużych dawek TNF efekt przeciwnowotworowy przeważa nad efektem promocji przerzutowania.

Wobec faktu, że promocja przerzutów nie występowała u myszy Balb/c z rakiem jelita grubego C26 i braku istotnego wpływu niskich dawek rTNF na przeżycie zwierząt, znaczenie wzmożenia przerzytowania w grupie B1 (u myszy C57B1) nie jest jasne.

W przypadkach wznowy miejscowej czerniaka B16 (grupa C) efekt przeciwnowotworowy rTNF stwierdzono przy stosowaniu dużych dawkek (grupa C2). Natomiast w innych grupach zwierząt z przeszczepionym czerniakiem B16 i rakiem jelita grubego C26 tego efektu nie obserwowano. Może to świadczyć o potencjalnej skuteczności rTNF w leczeniu wznowy nowotworowej. Wyniki te pozostają w zgodności z omówionymi wyżej efektami terapii adiuwancyjnej, gdzie największy wpływ rTNF obserwowano w grupie myszy z przeszczepionym czerniakiem B16 otrzymujących wysokie dawki preparatu. Jednak efekt działania rTNF był mniej wyrażony w grupie A i w grupie C niż w grupie B. Potwierdza to o zależność efektu terapeutycznego nie tylko od dawki rTNF, ale i od masy nowotworu.

Sumując, wszystkie badania dostarczyły dowodów na efektywność terapeutyczną rTNF w modelach terapii paliatywnej i adiuwancyjnej w przypadku doświadczalnych nowotworów mysich, nawet, gdy były one oporne na działanie rTNF *in vitro.*

Komórki ludzkich linii raka trzustki i żołądka HPC, CaV1 i CaV3 przeszczepione myszom SCID wykazywały dużą dynamikę wzrostu w porównaniu do linii komórkowych opisywanych w literaturze (140, 154). Może to świadczyć o dużej złośliwości nowotworów, z których uzyskano badane linie. W przeprowadzonych badaniach nie obserwowano wpływu podawania rTNF na wzrost guzów, pomimo stosowania potencjalnie skutecznego schematu podawania rTNF dobranego na podstawie modelu czerniaka B16 u myszy Balb/C. Podawanie rTNF nie miało również wpływu na czas przeżycia zwierząt. Może to świadczyć o oporności badanych nowotworów na TNF, zwłaszcza że taką oporność wykazano wcześniej w warunkach *in vitro.* Pośrednio pozostaje to w zgodzie z poprzednim wnioskiem, że TNF *in vivo* działa prawdopodobnie w drodze aktywacji układu immunologicznego gospodarza, co nie zachodzi u myszy SCID. Badania te, choć ograniczone do dwóch typów nowotworów przewodu pokarmowego wskazują, że immunobiologia nowotworów mysich i ludzkich jest istotnie różna i wyniki eksperymentów zwierzęcych nie mogą być automatycznie przenoszone do sytuacji klinicznych.

Wykazanie pewnej aktywności przeciwnowotworowej preparatu rTNF w przedklinicznej fazie badań doprowadziło do zaplanowania i przeprowadzenia prób klinicznych fazy I i II. Stwierdzona lepsza skuteczność miejscowego podawania preparatu w porównaniu z systemowym podawaniem rTNF sugerowała zastosowanie miejscowego (doguzowego i dootrzewnowego) podawania tego preparatu w fazie klinicznej badań.

Metoda doguzowego podawania substancji o działaniu przeciwnowotworowym jest uznana za bezpieczną i jest z powodzeniem stosowana w wielu ośrodkach celem podawania np. cytostatyków (28). Znalazła ona również zastosowanie w próbach leczenia nowotworów przewodu pokarmowego, np. podawanie preparatu OK432 (100, 165). Zarówno we własnych obserwacjach, jak i danych z piśmiennictwa nie stwierdzono istotnych powikłań miejscowych, tj. perforacji przewodu pokarmowego (56, 64, 165).

Należy zauważyć przy tym, że przy dożylnym stosowaniu TNF nie obserwowano efektów lokalnego uszkodzenia naczyń (97). Również podawanie podskórne, gdzie stosowano dawki podobne do użytych w przedstawianych badaniach (5-200 $\mu g/m^2$ pow. ciała) łączyło się jedynie z niewielkim odczynem zapalnym w miejscu wstrzyknięcia TNF. Odczyn ten ustępował po 12-24 godz. (164).

Z objawów ogólnych po miejscowym podaniu rTNF, obserwowano jedynie gorączkę, natomiast nie występowały inne objawy opisywane po dożylnym podawaniu TNF (spadek ciśnienia, drgawki) (97, 137, 154). Nie osiągnięto maksymalnej tolerowanej dawki (MTD), przy czym maksymalna podana dawka wynosiła 400 $\mu g/m^2$ pow. ciała. Inne badania wykazały, że przy zastosowaniu podawania dożylnego MTD waha się w granicach 160-300 $\mu g/m^2$ pow. ciała (97, 136). Obserwowane zaburzenia funkcji wątroby są porównywalne do obserwacji uzyskanych przy podawaniu TNF do jamy otrzewnej lub do tętnicy wątrobowej. Wydaje się, że TNF może wpływać na funkcję wątroby zwłaszcza gdy jest podawany w obrębie dorzecza żyły wrotnej. Jego prawdopodobnym mechanizmem działania jest blokowanie niektórych układow enzymatycznych, a w tym układu cytochromu p450 (18, 122, 186). Przedstawione dane o bezpieczeństwie doguzowego podawania preparatu pozostają w zgodności z obserwacjami Nakazawy i in. (100), którzy stosując u chorych z zaawansowanym rakiem żołądka preparat immunostymulacyjny OK432 stwierdzili brak istotnych ogólnych i miejscowych objawów ubocznych. Występowanie stosunkowo nieznacznych objawów ubocznych przy podawaniu relatywnie wysokich dawek TNF doguzowo może sugerować względnie małe wchłanianie TNF do krążenia. Może to sugerować, że TNF osiąga wysokie stężenie w łożysku guza, co może mieć istotne implikacje terapeutyczne. Uzyskane wyniki sugerują, że doguzowe podawanie preparatu rTNF jest dobrze tolerowane, nie prowadzi do występowania istotnych ogólnych objawów ubocznych jak i powikłań miejscowych. Stwarza to możliwość podjęcia badań klinicznych II fazy u chorych z nieoperacyjnym rakiem żołądka.

Prawdopodobieństwo przeżycia u chorych z grupy III i IVa kliniczno-patologicznego zaawansowania raka, którym przedoperacyjnie podawano rTNF wynosiło 68.5%, a w grupie kontrolnej do 38.5%. Świadczy to o potencjalnym efekcie leczniczym rTNF podawanego przedoperacyjnie, doguzowo. Jednak różnica przeżyć 3 letnich w grupie chorych otrzymujących doguzowo rTNF i w grupie kon-

trolnej nie była statystycznie znamienna, być może ze względu na niewielką liczebność grup. Należy zauważyć również, że grupa kontrolna nie została dobrana losowo, lecz została utworzona retrospektywnie. Jednak w doborze grupy uwzględniono szereg czynników rokowniczych (117), postępując tak, aby pod ich względem grupy były maksymalnie zbliżone. Prawdopodobny mechanizm działania TNF jest związany ze stymulacją układu immunologicznego w okresie okołooperacyjnym lub niszczeniem mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Jednakże dla potwierdzenia wpływu na przebieg choroby nowotworowej, doguzowego podawania TNF przedoperacyjnie, konieczne jest przeprowadzenie kontrolowanej próby klinicznej.

Wodobrzusze jest jednym z objawów terminalnej fazy choroby nowotworowej przynoszącym choremu znaczne dolegliwości. Dotychczasowe metody leczenia objawowego są mało skuteczne i rzadko przynoszą dłużej trwający efekt. Nakłucie jamy otrzewnej i odpuszczenie płynu wprawdzie przynosi natychmiastową ulgę choremu, niemniej jednak wodobrzusze nawraca w ciągu kilku dni. W przedstawionych badaniach podjęto próbę dootrzewnowego podawania rTNF w celu zahamowania procesu powstawania wodobrzusza. Zwracano uwagę na objawy toksyczne po dootrzewnowym zastosowaniu rTNF, jak również efekt terapeutyczny zastosowanego modelu terapii. Przy podaniu dawki jednorazowej 400 μg (230-300 $\mu g/m^2$ pow. ciała) nie obserwowano istotnych objawów ubocznych. Należy zwrócić uwagę, że dożylne podanie takiej dawki rTNF powoduje z reguły trudne do opanowania spadki ciśnienia tętniczego krwi i zaburzenia neurologiczne (133, 157). Również nie obserwowano wpływu podawania TNF na poziom leukocytozy i płytek krwi, co występuje przy podawaniu systemowym. Wzrost u dwu chorych poziomu mocznika w surowicy można wiązać z tym, że już wcześniej obserwowano u tych chorych tendencje do wysokich poziomów mocznika, co prawdopodobnie ma związek ze schyłkowym okresem choroby nowotworowej. Obserwując czas przeżycia chorych i dynamikę postępu choroby nie stwierdzono istotnych różnic w stosunku do innych chorych z rozsiewem procesu nowotworowego. Uzyskane zmniejszenie wodobrzusza u 3% chorych jest zbliżone do wyników innych ośrodków (20-60%) (122, 142). Jak się wydaje, redukcja wodobrzusza jest również związana z typem nowotworu, a przedstawiony materiał różni się pod tym względem od dotychczas prezentowanych dużą ilością przypadków raka żołądka. Jednak ostateczna ocena efektywności dootrzewnowego podawania TNF będzie możliwa przy poszerzeniu materiału chorych i ujednoliceniu dawki i schematu postępowania.

Wykazana w badaniach aktywność przeciwnowotworowa rTNF zarówno w modelach doświadczalnych, jak i klinicznych przy jednoczesnym braku istotnych efektów ubocznych może być przyczynkiem do prowadzenia dalszych badań, celem ustalenia wskazań i efektywności terapeutycznej TNF w chorobie nowotworowej.

5. WNIOSKI

1. Stwierdzono oporność komórek badanych linii nowotworów doświadczalnych i linii wyizolowanych od pacjentów z chrobą nowotworową na działanie TNF w warunkach *in vitro*.

2. W badaniach *in vitro* stwierdzono synergistyczne działanie TNF i wysokich dawek 5-fluorouracylu w niszczeniu komórek raka żołądka.

3. Opracowane modele eksperymentalne odzwierciedlają najczęściej spotykane sytuacje w praktyce klinicznej.

4. W przeprowadzonych doświadczeniach na myszach potwierdzono aktywność przeciwnowotworową TNF zarówno przy podawaniu doguzowym w terapii paliatywnej, jak i w modelu leczenia wznowy miejscowej.

5. W modelu terapii paliatywnej i adiuwancyjnej stwierdzono zależność efektu przeciwnowotworowego od dawki TNF i wielkości zmiany pierwotnej.

6. W przypadkach raka żołądka i raka odbytnicy doguzowe podawanie TNF w drodze endoskopii jest bezpieczne i nie powoduje istotnych objawów ubocznych.

7. Prawdopodobieństwa przeżycia chorych z miejscowo zaawansowanym resekcyjnym rakiem żołądka jest wyższe w grupie, której przedoperacyjnie podawano doguzowo TNF.

8. Dootrzewnowe podawanie TNF u chorych z wodobrzuszem pochodzenia nowotworowego jest bezpieczne i u części chorych pozwala na uzyskanie paliatywnego efektu terapeutycznego.

9. Dalsza ocena efektów klinicznych wymaga kontrolowanych badań prospektywnych.

Podsumowując, przeprowadzone badania moga sugerować możliwość poprawy efektów leczenia nowotworów przewodu pokarmowego poprzez wprowadzenie TNF do immunoterapii adiuwancyjnej, jak i paliatywnej. Najkorzystniej- szym rozwiązaniem wydaje się miejscowe (doguzowe) podawanie TNF ze względu na nikłe objawy uboczne i prawdopodobieństwo uzyskania istotnego efektu terapeutycznego. Badania te mogą również sugerować, że skojarzenie chemioterapii z podawaniem TNF może przynieść korzystne rezultaty. Niniejsze badania mogą uzasadnić podjęcie dalszych badań nad zastosowaniem TNF w leczeniu nowotworów przewodu pokarmowego.

6. STRESZCZENIE

Dążenie do poprawy wyników leczenia chorób nowotworowych skłania do poszukiwania nowych, bardziej skutecznych metod terapeutycznych. Jedną z możliwości leczenia nowotworów jest immunoterapia polegająca na wykorzystaniu mechanizmów odpornościowych w zwalczaniu choroby nowotworowej. Z chwilą wykrycia cytokin, substancji regulujących funkcje układu immunologicznego i poznania ich pośredniego i bezpośredniego działania przeciwnowotworowego podjęto próby oceny ich przydatności w leczeniu nowotworów. Jedną z cytokin o działaniu przeciwnowotworowym jest czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF). W przedstawianej pracy podjęto próbę oceny przydatności TNF w leczeniu nowotworów przewodu pokarmowego. Badania przeprowadzono w dwóch fazach, doświadczalnej i klinicznej. W części doświadczalnej badano wrażliwość na działanie TNF komórek nowotworów doświadczalnych (czerniaka B16 i raka jelita grubego C26) oraz wyizolowanych od chorych linii komórkowych nowotworów ludzkich (raka żołądka i raka trzustki).

Badano również efekt działania TNF w eksperymentalnych modelach zwierzęcych terapii paliatywnej i adiuwancyjnej oraz modelu terapii paliatywnej wznowy nowotworowej. Oceniano też wpływ podawania TNF na wzrost nowotworów ludzkich przeszczepionych myszom SCID. Uzyskane wyniki w części doświadczalnej stanowiły podstawę do przeprowadzenia badań klinicznych fazy I i fazy II.

W tej części badań oceniano objawy uboczne i efekt terapeutyczny po miejscowym podawaniu TNF. Preparat podawano doguzowo u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy i dootrzewnowo chorym z rozsiewem nowotworowym do otrzewnej i wodobrzuszem. Do badań użyto preparatu ludzkiego TNF otrzymanego drogą rekombinacji (rTNF) uzyskanego z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi.

Przeprowadzone badania wykazały oporność badanych linii komórek nowotworów doświadczalnych oraz wyizolowanych od chorych linii komórek nowotworów ludzkich na cytotoksyczne działanie rTNF w warunkach *in vitro*. Oporność obserwowano w szerokim zakresie stężeń rTNF wielokrotnie przekraczającym

stężenie, przy którym widoczny jest efekt cytotoksyczny w stosunku do wrażliwej linii L929. Stwierdzono jednak synergistyczny efekt działania cytotoksycznego rTNF i 5-Fluorouracylu, który obserwowano w przypadkach linii raka żołądka. Takiego synergizmu nie obserwowano dodając do przy użyciu Adriamycyny i Mitomycyny C. Stwierdzony efekt może w części tłumaczy stosunkowo korzystne efekty immunochemioterapii z zastoswaniem 5-Fluorouracylu. Biorąc pod uwagę doniesienia o wrażliwości badanych nowotworów na działanie TNF w warunkach *in vivo*, można sądzić, że TNF działa nie tylko bezpośredno cytotoksycznie na komórki nowotworów, ale i poprzez modulacje reaktywności organizmu nosiciela guza. Przeprowadzone badania z użyciem nowotworów doświadczalnych potwierdziły wrażliwość czerniaka B16 i raka jelita grubego C26 w modelach terapii paliatywnej i adiuwancyjnej. W przypadku czerniaka B16 przeszczepionego myszom C57Bl doguzowe podawanie 4 dawek rTNF po 10μg powodowało redukcję wymiarów guza, a w 30% przypadków jego zniknięcie i całkowite wyleczenie. Dootrzewnowe podawanie rTNF po wycięciu guza (model terapii adiuwancyjnej) powodowało zmniejszenie częstości występowania wznowy miejscowej, statystycznie znamienną poprawę przeżycia i wzrost odsetka wyleczeń w grupie otrzymującej wysokie dawki rTNF (15 dawek po 10μg rTNF). Takie samo zjawisko obserwowano w modelu terapii adiuwancyjnej raka jelita grubego C26 przeszczepianego myszom Balb/c. Natomiast dootrzewnowe podawanie rTNF myszom ze wznową miejscową nowotworu (po wcześniejszym zabiegu wycięcia guza) prowadziło do wyleczenia jedynie w przypadkach czerniaka B16.

Tak więc przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że w nowotworach doświadczalnych rTNF może działać skutecznie zarówno w modelu terapii paliatywnej jak i adiuwancyjnej oraz w leczeniu wznowy nowotworowej. W przypadkach nowotworów ludzkich przeszczepianych myszom SCID nie obserwowano wpływu podawania rTNF na wzrost guzów i czas przeżycia zwierząt.

Badania kliniczne I fazy oparte o schematy doguzowego i dootrzewnowego podawania rTNF wykazały bezpieczeństwo tych sposobów podania w szerokim zakresie dawek (do 400 μg/ m^2 doguzowo i do 550 μg/m^2 dootrzewnowo). Obserwowane objawy miały charakter przejściowy (objawy grypopodobne, bóle brzucha, zwyżka poziomu transaminaz) i nie wymagały intensywnego leczenia.

U 13 chorych z miejscowo zaawansowanym, resekcyjnym rakiem żołądka oceniano wpływ podawania rTNF na czas przeżycia. Porównywano w tym celu prawdopodobieństwo przeżycia w grupie leczonej rTNF do sparowanej grupy kontrolnej o maksymalnie zbliżonej charakterystyce. Prawdopodobieństwo przeżycia w 3 letnim okresie obserwacji w grupie rTNF wynosiło 68.5% w porównaniu do 38.5% w grupie kontrolnej. Ze względu na małą liczebność grup różnica ta nie była statystycznie znamienna.

W grupie chorych z wodobrzuszem pochodzenia nowotworowego, dootrzewnowe podawanie rTNF pozwoliło u części chorych na zredukowanie wodobrzusza na okres 4-8 tygodni.

Sumując, przeprowadzone badania pozwoliły na potwierdzenie przeciwnowotworowego działania TNF w różnych modelach doświadczalnych. Wskazują one na istotną rolę reaktywności gospodarza w niszczeniu komórek nowotworowych po podaniu TNF. Wykazano, że komórki nowotworowe oporne na cytotoksyczne działanie TNF *in vitro* mogą być nań wrażliwe *in vivo*. Potwierdzono również, że TNF może wykazywać synergizm działania z 5-Fluorouracylem co wskazuje na możliwość dalszych badań wyjaśniających to zjawisko. Wykazano również, że endoskopowe doguzowe, jak i dootrzewnowe podawanie TNF jest procedurą bezpieczną. Uzyskane w tych badaniach wyniki mogą wskazywać na potencjalne możliwości zastosowania tej cytokiny w terapii onkologicznej. Jednak ostateczna ocena przydatności TNF w leczeniu nowotworów wymaga kontrolowanych prób klinicznych.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Aggarwal B.B, Eessalu T.E, Hass P.E; Characterisation of receptors of human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. Nature, 1985, 318, 665-7
2. Aggarwal B.B, Kohr W.J, Hass P.E,et al; Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization. J Biol Chem,1985, 260, 2345-54
3. Alexander R.B., Tumor necrosis factor and chemotherapeutic drugs targeted at DNA topoisomerase II for the treatment of genitourinary malignancies. Cancer Treat Res, 1992, 59, 105-20
4. Asher A, Mule J.J, Reichert C.M, Shiloni E, Rosenberg S.A; Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administred recombinant necrosis factor against several murine tumors in vivo J Immunol, 1987, 138, 963-974
5. Astiz M.E., Rackow E.C., Kim J.W., Kim Y.B., Weil M.H., Monophosphoryl lipid A attenuates the effects of endotoxic shock in pigs. J Lab Clin Med, 1992, 119, 323-4
6. Baglioni C., McCandless S., Tavernier J., Fiers W., Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. J Biol Chem, 1985, 260, 1395-97
7. Balkwill F., Burke F., Talbot D., Tavernier J., Osborne R., Naylor S., Durbin H., Fiers W. Evidence for Tumour Necrosis Factor Production in Cancer. Lancet, 1987, 1229-1232.
8. Balkwill F.R, Lee A., Aldam G., Moodie E., Thomas J.A., Tavernier J., Fiers W., Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. Cancer Res, 1986, 46, 3990-93
9. Bancroft G.J., Schreiber R.D., Unanue E.R., Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. Immunol Rev, 1991, 124, 5-24
10. Baumgart J., Gase K., Schulze W., Suehnel J., Gutsche W., Behnke D., Synergistic cytotoxic effect of human recombinant tumor necrosis factor alpha combined with dihydroambazone. Cancer Lett, 1990, 54, 119-24
11. Bereta J., Bereta M., Coffman F.D., Cohen S., Cohen M.C., Inhibition of basal and tumor necrosis factor-enhanced binding of murine tumor cells to murine endothelium by transforming growth factor-beta 1. J Immunol, 1992, 148, 2932-40
12. Beutler B., Cachexia: a basic biochemical mechanism. Nutrition, 1989, 5, 129-31

13. Beutler B., Cerami A., Cachectin: More than a tumor necrosis factor. N Engl J Med, 1987, 316, 379-385

14. Beutler B., Cerami A., Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature, 1986, 320, 584-88

15. Beutler B., Greenwald D., Hulmes J.D., Identify of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin, Nature, 1985, 316, 552-54

16. Blasi E., Pitzurra L., Puliti M., Bartoli A., Bistoni F., Candida albicans hyphal form enhances tumor necrosis factor mRNA levels and protein secretion in murine ANA-1 macrophages. Cell Immunol, 1992, 142, 137-44,

17. Blick M., Sherwin S.A., Rosenblum M., Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. Cancer Res, 1987, 47, 2986-89

18. Blum N., Norberg A., Jacobs R., Sherman B., Ackerman N.: Augmentation of the effect of chemotherapy with low dose TNF in liver matastasis. Proc Am Soc Clin Oncol 1989, 8, 187

19. Bonavida B., TNF as immunomodulatory agent. Immunol Ser, 1992, 56, 315-29

20. Bromberg J.S., Chavin K.D., Kunkel S.L., Anti-tumor necrosis factor antibodies suppress cell-mediated immunity in vivo. J Immunol, 1992, 148, 3412-17

21. Brouckaert P.G.G., Leroux-Roels G.G., Guisez Y., Tavernier J., Fiers W., In vivo antitumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN gamma on a syngenic murine melanoma. Int J Cancer, 1986, 38, 763-69

22. Brown T.D., Goodman P., Fleming T., Macdonald J.S., Hersh E.M., Braun T.J., A phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in patients with adenocarcinoma of the pancreas: a Southwest Oncology Group study. J Immunother, 1991, 10, 376-78

23. Bruin K.F., Derkx H.H.F., van Deventer S.J.H., Endotoxin induced TNF release in whole blood and peripherial blood mononuclear cells (PBMC): a comparison between five families. Eur Cytokine Netw 1992, 3, 156

24. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.J., Green S., Fiore N., Wiliamson B., An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumours. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72, 3666-70

25. Chen W., Havell E.A., Harmsen A.G., Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against Pneumocystis carinii infection. Infect Immun, 1992, 60, 1279-84

26. Childs B., Kemeny N., Kelsen D., Rosado K., Phase II trial of recombinant human TNF in patients with advanced colorectal carcinoma. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 191

27. Clark I.A., Cowden W.B, Roles of TNF in malaria and other parasitic infections. Immunol Ser, 1992, 56, 365-407

28. Cohen J.M., Feinberg A.I., Glazer M.I., Simultaneous presentation of in situ colon cancer with massive hepatic metastases managed by surgery followed by immediate chemotherapy. Proc Am Soc Clin Oncol 1989, 8, 11

29. Corti A., Fassina G., Marcucci F., Cassani G., Antigenic regions of tumor necrosis factor alpha and their topographic relationships with structural/functional domains. Mol Immunol 1992, 29, 471-9

30. Creasey A., Reynolds M., Laird W., Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant tumor necrosis factor. Cancer Res, 1986, 46, 5687-90

31. Creasey A.A., Yamamoto R., Vitt C.R., A high molecular weight component of the human tumor necrosis factor receptor is associated with cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 3293-3297

32. Czupryna A., Szczepanik A., Tabor J., Siedlar M., Popiela T., ZembalaM., Badania kliniczne II fazy nad dootrzewnowym podawaniem czynnika martwicy nowotworów (TNF) u chorych z wodobrzuszem pochodzenia nowotworowego w przypadkach raka żołądka, trzustki i jelita grubego , Pamiętnik 56 Zajzdu TChP Lublin 1993, 1457-60

33. Darzynkiewicz Z., Williamson B., Carswell E.A, Old L.J., Cell cyccle-specific effects of tumor necrosis factor. Cancer Res, 1984, 44, 83-90

34. Driscoll K.E., Maurer J.K., Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity. Toxicol Pathol, 1991, 19, 398-405

35. Dyding J., Li W.J., Lopez A.R., Garovoy M., Arlinghaus R., DiesserothA., The TNF alpha and gamma interferon combination acts synergisticaly to increase class I HLA antigen expression in blast crisis CML cells., Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 184

36. Eisenthal A., Cameron R.B., Rosenberg S.A., Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo by IFN-alpha and its antitumor efficacy against established B16 melanoma liver metastases when combined with specific anti-B16 monoclonal antibody. J Immunol, 1990, 144, 4463-71

37. Eisenthal A., McIntosh J., Effect of recombinant human tumor necrosis factor alpha on the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in the treatment of established B16 melanoma liver nodules. Cancer Immunol Immunother, 1990, 31, 243-9

38. Fichtner I., Lemm M., Becker M., Tanneberger S., Determination of antineoplastic activity and toxicity of tumor necrosis factor (TNF) in animal experiments. Correlation to clinical findings. Neoplasma, 1990, 37, 301-15

39. Fiers W., Beyart R., Brouckaert P., Everaert B., Suffys P., Tavernier J., van Otade X., van Roy F., Mechanism of action of TNF in vitro and its toxicity in vivo. Immunobiol, 1987, 175, 11

40. Flad H.D., Loppnow H., Feist W., Wang M-H, Brade H., Kusumoto S., Rietschel E.Th., Ulmer A.J., Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor: Studies on the induction by Lipopolysacharide partial structure. Lymphokine Res, 1989, 8, 3, 235 -38.

41. Fransen L., Ruysschaert M-R., Van Der Heyden J., Fiers W., Recombinant tumour necrosis factor: species-specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. Cell Immunobiol, 1986, 100, 260-267.

42. Frei E. III, Springs D., Tumor necrosis factor: still a promising agent. J Clin Oncol, 1989, 19, 291-294

43. Gamm H., Meyenburg W., Herrmann F., Mertelsmann R., Phase I trial of recombinant TNf alpha in advanced malignancy. Immunobiol, 1987, 175, 22

44. Gatanaga T., Noguchi K., Tanabe Y., Inagawa H., Soma G., Mizuno D., Antitumor effect of systemic administration of novel recombinant tumor necrosis factor (rTNF-S) with less toxicity than conventional rTNF-alpha in vivo. J Biol Response Mod, 1989 8, 278-86

45. Georg B., Helseth E., Lund L.R., Riccio A., Dano K., Unsgaard G., Andreasen P., Tumor necrosis factor alpha regulates mRNA for urokinase type plasminogen activator and type I plasminogen activator inhibitor in human neoplastic cell lines. Mol Cell Endocrinol, 1989, 61, 87-96

46. Gerain J., Lienard D., Heymans C., Ewalenko P., Lejeune F., High serum levels of the TNF alpha and IL2 after high dose TNF alpha administration for isolation perfusion of the limb in man. Eur. Cytokine Netw, 1992, 3, 2, 230

47. Giavazzi R., Garofalo A., Bani M.R., Abbate M., Ghezzi P., Boraschi D., Mantovani A., Dejana E., Interleukin 1 - induced augmentation of expeimental metastases from a human melanoma in nude mice. Cancer Res, 1990, 50, 4771-75

48. Goldberg B., Evaluation of ascites by ultrasound. Radiology 1970, 96, 15-22

49. Grace H., Wong W., Goeddel D.V., Tumour necrosis factor. w: Zembala M., Asherson G.L., (red): Human Monocytes, Academic Press, London New York 1989

50. Hakes I., Hoskins W., Rubin S., Jones W., Almadrones L., Lewis J.L., Phase I trial of intraperitoneal recombinant tumor necrosis factor., Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8,64

51. Haranka K., Satomi N., Sakurai A., Haranaka R., Role of first stimulating agents in the production of tumor necrosis factor. Cancer Immunol Immunother, 1984, 13, 87-90

52. Haranaka K,Satomi N,Sakurai A;Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. Int J Cancer, 1984, 34, 263-267

53. Hasegawa A., Matsuzaki J., Urakami K., Ikehara M., Takeda K., Iwamoto S., Konno K., Comparison of biological activites of TNF muteins using chemically synthesized genes. Immunobiol, 1987, 175, 143

54. Hersh E.M., Metch B.S., Muggia F.M., Brown T.D., Whitehead R.P., Budd G.T., Rinehart J.J., Crawford E.D., Bonnet J.D., Behrens B.C., Phase II studies of recombinant human tumor necrosis factor alpha in patients with malignant disease: a summary of the Southwest Oncology Group experience. J Immunother, 1991, 10, 426-31

55. Heumann D., Gallay P., Barras C., Zaech P., Ulevitch R.J., Tobias P.S., Glauser M.P., Baumgartner J.D., Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. J Immunol, 1992, 148, 3505-12

56. Ijzermans J.N., Scheringa M., van der Schelling G.P., Geerling R.A., Marquet R.L., Jeekel J., Injection of recombinant tumor necrosis factor directly into liver metastases: an experimental and clinical approach. Clin Exp Metastasis, 1992, 10, 91-7

57. Ishikura H., Hori K., Bloch A., Differential biologic effects resulting from bimodal binding of recombinant human tumor necrosis factor to myeloid leukemia cells. Blood, 1989, 73, 419-424

58. Ito A., Sato T., Iga T,. Mori Y., Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteines and tissue inhibitor of metalloproteines (TIMP) production by human fibroblasts. FEBS Lett, 1990, 269, 93-95

59. Jacob C.O., Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? Immunol Today, 1992, 13, 122-5

60. Jones A.L., Millar J.L., Millar B.C., PowellB., Selby P., Winkley A., Lakhani S., Gore-M.E., McElwain T.J., Enhanced anti-tumour activity of carmustine (BCNU) with tumour necrosis factor in vitro and in vivo. Br J Cancer, 1990, 62, 776-80

61. Jones A.L., O'Brien M.E., Lorentzos A., Viner C., Hanrahan A., Moore J., Millar J.L., Gore M.E., A randomised phase II study of carmustine alone or in combination with tumour necrosis factor in patients with advanced melanoma. Cancer Chemother Pharmacol, 1992, 30, 73-6

62. Kahn J., Kaplan L., Zieger J., Volberding P., Crowe S., Saks S., Abrams D.,Phase II trial of intralesional recombunant TNF for AIDS assotiated Kaposi sarcoma. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 4

63. Karcz D., Popiela T., Szczepanik A., Czupryna A., Szymańska B., Siedlar M., Zembala M., Preoperative endoscopic intratumor application of Tumor Necrosis Factor alpha in patients with locally advanced resectable gastric cancer. Endoscopy, 1994, 26, 369

64. Karcz D., Szczepanik A., Czupryna A., Marecik J., Tabor J., Szymańska B., Siedlar M., Popiela T., Zembala M., Badania kliniczne fazy I nad endoskopowym doguzowym podawaniem czynnika martwicy nowotworów (TNF) u chorych z rakiem żołądka i rakiem odbytnicy. Acta Endosc Pol, 1992, 3, 28-31

65. Karunaweera N.D., Grau G.E., Gamage P., Carter R., Mendis K.N., Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in Plasmodium vivax malaria. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89, 3200-3

66. Kim J., The concept of immunochemosurgery in gastric cancer. World J Surg, 1987, 11, 465-9

67. Kirstein M., Baglioni C., Tumor necrosis factor induces synthesis of two proteins in human fibroblasts. J Biol Chem, 1986, 261, 9565-67

68. Kirstein M., Fiers W., Baglioni C., Growth inhibition and cytotoxicity of tumor necrosis factor in L 929 cells is enhanced by high cell density and inhibition of mRNA synthesis. J Immunol 1986, 137, 2277-80

69. Keller R., Gehri R., Keist R., The interaction of macrophages and bacteria: Escherichia coli species, bacterial lipopolysaccharide, and lipid A differ in their ability to induce tumoricidal activity and the secretion of reactive nitrogen intermediates in macrophages. Cell Immunol, 1992, 141, 47-58

70. Klostergaard J., Leroux M.E., Hung M.C.,Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms in vitro. Characterization of cytolytic responses to tumor necrosis factor and nitric oxide pathways in vitro. J Immunol, 1991, 147, 2802-8

71. Koltai M., Hosford D., Braquet P., Role of PAF and cytokines in microvascular tissue injury. J Lab Clin Med, 1992, 119, 461-6

72. Kos F.J., Augmentation of recombinant interleukin-2-dependent murine macrophage-mediated tumour cytotoxicity by recombinant tumour necrosis factor-alpha. Immunol Cell Biol, 1989, 67, 433-6

73. Koszarowski T., (red.) Onkologia Kliniczna. PZWL Warszawa 1985

74. Kull F.C., Cuatrecasas P., Possible requirement of internalization in the mechanism of in vitro cytotoxicity in tumor necrosis serum. Cancer Res, 1981, 41, 4885-90

75. Kumar S., Baglioni C., Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 protects human fibrosarcoma cells from human necrosis factor cytotoxicity. J Cell Biol, 1990, 111, 474a

76. Lienard D., Lejeune F.J., Ewalenko P., In transit metastases of malignant melanoma treated by high dose rTNF alpha in combination with interferon-gamma and melphalan in isolation perfusion. World J Surg, 1992 ,16, 234-40

77. Lin H., Chensue S.W., Strieter R.M., Remick D.G., Gallagher K.P., Bolling S.F., Kunkel S.L., Antibodies against tumor necrosis factor prolong cardiac allograft survival in the rat. J Heart Lung Transplant, 1992, 11, 330-5

78. Loetscher H.,. Purification and structural properties of two distinct TNF receptors on human cells. Immunol Ser, 1992, 56, 161-67

79. Lollini P., De Giiovanni C., Nicoletti G., Enhancement of experimental metastatic ability by tumor necrosis factor alone or in combination with interferon gamma. Clin Exp Metastasis, 1990, 8, 215-24

80. Malik S.T.A., Naylor M.S., Oliff A., Balkwill F.R., Cells secreting Tumor Necrosis Factor show enhanced metastasis in nude mice. Eur J Cancer 1990, 26, 1031-34

81. Mandi Y., Endresz V., Krenacs L., Regely K., Degre M., Beladi I., Tumor necrosis factor production by human granulocytes. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1991, 96, 102-6

82. Mannel D., Kist A., Ho A.D., Tumor necrosis factor production and natural killer cell activity in peripheral blood during treatment with recombinat tumor necrosis factor. Br J Cancer, 1989, 60, 585-88

83. Manor E., The effect of monocyte derived macrophages on the growth of Ricketsia conori in permissive cells. Acta Virol Praha 1992, 36, 13-8

84. Mareel M., Dragonetti C., Tavernier J., Fiers W., Tumor-selective cytotoxic effects of murine tumor necrosis factor (TNF) and interferon-gamma (IFN-gamma) in organ culture of B16 melanoma cells and heart tissue. Int J Cancer, 1988, 42, 470-3

85. Markowitz A., Parkinson D., Miller L., Levitt D., Sacks S., Gutterman J., Phase I study of recombinant Interleukin II and recombinant TNF. Proc Am Soc Clin Oncol 1989, 8, 195

86. Marsters S.A., Frutkin A.D., Simpson N.J., Fendly B.M., Ashkenazi A., Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. J Biol Chem, 1992, 267, 5747-50

87. Martinet N., Charles T., Vaillant P., Vignaud J.M., Lambert J., Martinet Y., Characterization of a tumor necrosis factor-alpha inhibitor activity in cancer patients. Am J Respir Cell Mol Biol,. 1992 , 6, 510-15

88. Martinet N., Vaillant P., Charles T., Lambert J., Martinet Y., Dexamethasone modulation of tumour necrosis factor-alpha (cachectin) release by activated normal human alveolar macrophages. Eur Respir J, 1992, 5, 67-72

89. Maruo Y., Konno H., Baba S., Therapeutic effects of liposomal adriamycin in combination with tumor necrosis factor-alpha. J Surg Oncol, 1992, 49, 20-24

90. Mavligit G.M., Zukiwski A., Charnsangavej C., Carrasco C.H., Regional biologic therapy. Hepatic arterial infusion of recombinant human tumor necrosis factor in patients with liver metastases. Cancer, 1992, 69, 557-61

91. McDonald J.S., Schein P.S., Wolley P.V, Fluorouracil, doxorubicin, mitomycin C (FAM) combination chemotherapy for advanced gastric cancer. Ann Intern Med, 1980, 93, 533-42.

92. McIntyre C.A., Chapman K., Reeder S., Dorreen M.S., Bruce L., Rodgers S., Hayat K., Schreenivasan T., Sheridan E., Hancock B.W., Treatment of malignant melanoma and renal cell carcinoma with recombinant human interleukin-2: analysis of cytokine levels in sera and culture supernatants. Eur J Cancer, 1992, 28, 58-63

93. Meister A., Andersom M.E., Glutathione. Annu Rev Biochem, 1983, 52, 711-15

94. Miele M.E., Bennett C.F., Miller B.E., Welch D.R., Enhanced metastatic ability of TNF-alpha-treated malignant melanoma cells is reduced by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) antisense oligonucleotides. Exp Cell Res, 1994, 214, 231-41

95. Mizuno D., Oshima H., Soma G., Endogenous and exogenous TNF therapy (EET therapy).Theoretical and experimental grounds. Immunobiol, 1987, 175, 37

96. Mizuno K., Sone S., Orino E., Mukaida N., Matsushima K., Ogura T., Spontaneous production of interleukin-8 by human lung cancer cells and its augmentation by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 at protein and mRNA levels. Oncology, 1994, 51, 467-71

97. Moritz T., Niederle N., Baumann J., May D., urschel E., Osieka R., Kempeni J., Schlick E., Schmidt C., Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor in advanced malignant disease. Cancer Immunol Immunother, 1989, 29, 144-50

98. De Mulder P., Debryune F., Rikken G., Frasen M., van Hoesel Q., Dasma O., Recombinant TNF alpha and interferon gamma in the treatment of advanced renal cell carcinoma. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 144

99. Munker R., Do Persio J., Koeffer H.P., Tumor necrosis factor: receptors on hematopoetic cells. Blood, 1987, 70 , 1730-34

100. Nakazawa S., Yoshiro I., Kijima Y., Yosumasa N., Okhaski S., Mizutani K. The Endoscopic Intratumor Administration of OK-432 in Gastric Cancer unsuitable for Surgery. Endoscopy, 1989, 21, 168-71

101. Nawroth P.P., Bank I., Handley D., Cassimeris J., Chess L., Stern D., Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of intrelleukin 1. J Exp Med, 1986, 163, 1363-75

102. Neale M.L., Fiera R.A., Matthews N., Involvement of phospholipase A2 activation in tumour cell killing by tumour necrosis factor. Immunology, 1988, 64 , 437-47

103. Negrier M.S., Pourreau C.N., Palmer P.A., Ranchere J.Y., Mercatello A., Viens P., Blaise D., Jasmin C., Misset J.L., Franks C.R., Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by recombinant tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. J Immunother, 1992, 11, 93-102

104. Neta R., Sayers T.J., Oppenheim J.J., Relationship of TNF to interleukins. Immunol Ser, 1992, 56, 499-506

105. Nio Y., Shiraishi T., Tsubono M., Morimoto H., Tseng C.C., Kawabata K., Masai Y., Tun T., Fukumoto M., Tobe T., In vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor alone and in combination with other biological response modifiers on human digestive organ cancer xenografts transplanted in nude mice. Biotherapy, 1991, 3, 337-44

106. Nishiyama Y., Fuchimoto S. ,Orita K., Preventive and antiproliferative effects against experimental hepatic metastases of mouse colon 26 tumor. Jpn J Cancer Res, 1989, 80, 366-72

107. Norton J.A., Fraker D.L.,. Tolerance to tumor necrosis factor. Nutrition, 1989, 5, 131-35

108. Nowak W., Szczepanik A.M., Chiavellatti L., Popiela T., Zembala M., Ochronna rola analogu prostaglandyny E_2 w eksperymentalnym modelu zespołu septycznego po częściowej resekcji wątroby. Pol Przegl Chir, 1995,67,238

109. Ogawa K., Yagawa H., Katsube T., Kajiwara T., Kimamura Y., Suzuki H., Ozawa T., Iai S., Hanaoka T., SasakiJ., Sakakibara N., Studies on the Postoperative Adjuvant Immunotherapy with OK-432 for Gastric Cancer. Procedings of International Conference on Gastric Cancer, Kyoto, 1995

110. Okahara H., Yagita H., Miyake K., Okumura K., Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. Cancer Res, 1994, 54, 3233-6

111. Old L., Tumor necrosis factor (rTNF). Science, 1985, 230, 630-32

112. Orosz P., Mannel D.N., Enhancement of Experimental Metastases by Endogenous and Exogenous Tumor Necrosis Factor. Eur, Cytokine Netw, 1992, 3, 235-41

113. Orr D., Oldham R., Lewis M., Bertoli L., Birch R., Phase I study of the sequence administation of Etoposide and recombinant TNF in patients with advanced malignancy. Proc Am Soc Clin Oncol 1989, 8, 190

114. Ott M-G., Mannel D., Kist A., Walter-Kirst R., Rath U., Enhanced Natural Killer Activity as Response to Effective TNF- alpha and IFN- gamma Therapy. Eur Cytokine Netw, 1992, 3, 234

115. Palladino M., Refaad Shalab M., Kramer S., Characterisation of the antitumor activities of human tumor necrosis factor alpha and the coparison with other cytokines: iduction of tumor-specific immunity. J Immunol, 1987, 138, 4023-32.

116. Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Human tumour necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin Nature, 1984, 312, 724-29

117. Popiela T., (red.) Rak żołądka , PZWL Warszawa 1987

118. Popiela T., Zembala M., Oszacki J., Jędrychowski W.: A follow up study of chemoimmunotherapy in gastric cancer. Cancer Immunol Immunother, 1982, 13, 182-87

119. Popiela T., Zembala M., Kulig J., Czupryna A., Uracz W., Immunoterapia w zaawansowanym raku żołądka. Immunologia Polska 1989, 14, 170-78

120. Proto A.V., Lane E.J., Marangola J.P., A new concept of ascites fluid distribution. Am J Roentgenol, 1976, 126, 974-80.

121. Radzikowski C., Pajtasz-Piasecka E., Glazman-Kusnierczyk H., Efekt przeciwnowotworowy cytokin o aktywności immunomodulatorowej. Acta Haematol Pol 1994, 25, 2, Suppl 1, 32-40.

122. Raeth U., Schmid H., Hofmann J., Wiedenmann B., Kempeni J., Schlick E., Kaufmann M.,Intraperitoneal application of recombinant human TNF as an effective palliative treatment of malignant ascites from ovarian and gastroenteropanceratic carcinomas., Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 181

123. Riccardi C., Migliorati G., Cannarile L., D'Adamio F., Frati L., Herberman R.B., In vivo effects of cytokines on development of natural killer cells and antitumor activity in lethally irradiated bone marrow transplanted recipients. J Biol Response Mod, 1990 9, 15-23

124. Rice G.E., Girnbone M.A., Bevilacqua M.P., Tumor cell endothelial interactions. Increased adhesion of human melanoma cells to activated vascular endothelium. Am J Pathol, 1988, 133, 204-10

125. Rodolfo M., Salvi C., Bassi C., Rovetta G., Melani C., Colombo M.P., Adjuvant adoptive immunotherapy with IL2 and lymphocytes from tumor-bearing mice: in vitro tumor-stimulated lymphocytes are more effective than LAK cells. Nat Immun Cell Growth Regul, 1991, 10, 308-19

126. Rothstein J.L, Schreiber H., Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock. Immunobiol, 1987, 175, 53

127. Rubin B.Y., TNF and viruses: multiple interrelationships. Immunol Ser, 1992, 56, 331-40

128. Rudolph A., Krigel R., Zamkoff K., Hersh E., Bell D., Lou Z., Young J. Pharmacokinetics of human recombinant TNF in rats, monkeys and humans. Proc Am Soc Clin Oncol 1989, 8, 194

129. Ruggiero V., Johnston S., Baglioni C., Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. Cell Immunol, 1987, 107, 317-25

130. Ruggiero V., Latham K., Baglioni C., Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. J Immunol, 1987, 138, 2711-17

131. Saiki I., Maeda H., Murata J., Yamamoto N., Kiso M., Hasegawa A., Azuma I., Antimetastatic effect of endogenous tumor necrosis factor induced by the treatment of recombinant interferon gamma followed by an analogue (GLA-60) to synthetic lipid A subunit. Cancer Immunol Immunother, 1989, 30, 151-7

132. Saiki I., Sato K., Yoo Y.C., Murata J., Yoneda J., Inhibition of tumor-induced angiogenesis by the administration of recombinant interferon-gamma followed by a synthetic lipid-A subunit analogue (GLA-60). Int J Cancer, 1992, 51, 641-5

133. Saks S., Rosenblum M., Recombinant human TNF-alpha: preclinical studies and results from early clinical trials. Immunol Ser, 1992, 56, 567-87

134. Satomi N., Sakurai A., Haranaka R., Haranaka K., The mechanism of antitumor activity of TNF regarding factors influencing antitumor activity and side effects. Immunobiol, 1987, 175, 31

135. Sato N., Goto T., Haranaka K., Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition and cytoxicity. JNCI, 1986, 76, 1113-22

136. Savona S., Mittelman A., Gaffney E., Skelos S., Coombe N., Wood D., Arlin Z., Ahmed T., Puccio C., Ashikari R., Nadler P., Toxicity of a 5 day continous infusion of recombinant human TNF. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 188

137. Schadt M., Pfreundschuh M., Steinmetz H.T., Lorscheidt H.G., Schel E., Muller R.P., Diehl V., Phase II trial of repeted short term infusion of recombinant human TNF in patients with colorectal carcinoma. Proc Am Soc Clin Oncol 1989, 8, 118

138. Schell-Frederick E., Gahl R., Pfreundschuh M., Schaadt M., Steinmetz T., Diehl V., Endogenous production of tumor necrosis factor (TNF) in a patient with hepatocellular carcionoma:in vivo and vitro studies. Immunobiol, 1987, 175, 19

139. Scheurich P., Ucer U., Kronke M., Pfizenmeier K., Quantification and characterisation of high affinity membrane receptors for tumor necrosis factor on human leukemic cell lines. Int J Cancer, 1986, 38, 127-33

140. Schiller J.H., Bittner G., Anti-proliferative effects of tumour necrosis factor, gamma interferon and 5-fluorouracil on human colorectal carcinoma cell lines. Int J Cancer 1990, 41, 61-66

141. Schiller J.H., Lindstrom M., Witt P.L., Hank J.A., Mahvi D., Wagner R.J., Sondel P., Borden E.C., Immunological effects of levamisole in vitro. J Immunother, 1991, 10, 297-306

142. Schmid H., Kaufmann M., Minckwitz G., Grischke E.M., Bastert G., Kempini J., Raeth U., Intraperitoneal administration of tumour necrosis factor (rTNF) in combination with interferon alpha or gamma in 22 patients with tumour persistence of ovarian cancer. Eur Cytokine Netw, 1992, 3, 246

143. Schultz R.M., Altom M.G., Protective activity of recombinant murine tumor necrosis factor alpha and interferon gamma against experimental murine lung carcinoma metastases. J Interferon Res,1990, 10, 229-36

144. Schwartzberg L., Tauer K., Birch R., Orr D., Lewis M., Oldham R., West W., Phase I study of sequential recombinant TNF and recombinant interleukin II in patients with advanced malignancy. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 183

145. Shalaby M.R., Palladino M.A.jr, Hirabayashi S.E., et al. Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor. J Leucocyte Biol, 1987,41,196-204

146. Sherman M.L., Spriggs D.R., Demetri G.D., Arthur K., Imamura K., Kufe D.W., Frei III E., Phase I study of recombinant human TNF in cancer patients. Immunobiol, 1987, 175, 33

147. Sherman M.L., Spriggs D.R., Arthur K.A., Recombinant human tumor nercrosis factor administered as five day continuous infusion in cancer patients. Phase I toxicity and effects on lipid metabolism. J Clin Oncol, 1989, 6, 344-50

148. Sidhu R.S., Bollon A.P., Tumor necrosis factor analogs: identification of functional domains. Anticancer Res 1989, 9, 1569-76

149. Siedlar M., Stachura J., Szczepanik A.M., Mattei M., Popiela T., Vendetti S., Colizzi V., Zembala M., Characterisation of Human Pancreatic Adenocarcinoma cell lines with high metastasis potential in SCID mice. Invasion Metastasis, 1995, w druku

150. Smith R.A., Baglioni C., Characterization of TNF receptors. Immunol Ser, 1992, 56, 131-47

151. Sochmura Y., Antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha(rHu-TNFalpha: PT-050) and its augmentation in vitro and in vivo. Immunobiol, 1987, 175, 57

152. Spatafora M., Gjomarkaj M., Merendino A., Melis M., Chiappara G., Pace E., Antitumour activity of mononuclear phagocytes: role of tumour necrosis factor alpha. Respiration, 1992, 59 Suppl 1, 47-9

153. Strassmann G., Fong M., Kenney J.S., Jacob C.O., Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. J Clin Invest, 1992, 89, 1681-84

154. Suffys P., Beyaert R, Van Roy F., Fiers W., Reduced tumor necrosis factor -induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. Biochem Biophys Res Commun 1987, 149, 735-43

155. Suffys P., Beyaert R., Van Roy F., Fiers W., Involvement of a serine protease in tumor necrosis factor mediated cytotoxicity. Eur J Biochem, 1988, 107, 257-65

156. Surgarman B.J., Aggarwal B.B., Hass P.E., Figari I.S., Palladino M.A., Shepard M.A., Recombinant human tumor necrosis factor-alpha:effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 1985, 230, 943-45

157. Taguchi T., Clinical studies of recombinant human tumor necrosis factor (rHu-TNF). Immunobiol, 1987, 175, 63

158. Takagi K., Fujiyoshi T., Takano M., Somma G.-I., Oshima H., Mizuno D., Endogenous and exegenous TNF therapy (E.E.T therapy) to metastatic lesion in liver and local reccurent lesion of colorectal carcinoma. Immunobiol, 1987, 175, 20

159. Talmadge J.E., Philips H., Schneider M., Rowe T., Pennington R., Boowersox O., Lenz B., Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tummor necrosis factor. J Biol Response Mod, 1988, 7, 54-64

160. Tamwa K., Aso H., Nakamwa T., Hemmi H., Ishida N., Evaluation of recombinant human tumor necrosis factor by scheduled intratumoral administration in mice bearing transplantable tumors. Tohoku J Exp Med, 1988,157,107-118

161. Tomazic V., Farha M., Loftus A., Elias E., Antitumor activity of recombinant tumor necrosis factor on mouse fibrosarcoma in vivo and in vitro. J Immunol, 1988, 140, 4056-61

162. Tracey K.J.,Beutler B., Lowry S.F., Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science, 1986, 234, 470-74

163. Tracey K.J., Tumor necrosis factor (cachectin) in the biology of septic shock syndrome. Circ Shock, 1991, 35, 123-28

164. Tsuboi R., Morioka R., Yaguchi H., Shimokawa R., Inaba M., Ogawa H., Primary cutaneous plasmacytoma: treatment with intralesional tumour necrosis factor-alpha. Br J Dermatol, 1992, 126, 395-97

165. Tsujitani S., Okamura T., Baba H., Korenasa D., Haraguchi M., Sugimachi K., Endoscopic intratumoral injection of OK-432 and Langerhans cells in patients with gastric carcinoma. Cancer, 1988, 61, 1749-53

166. Waage A., Espevik T., Bakke O,.Halstensen A., Brandtzaeg A., Nissen-Meyer J., Lamvik J., Detection of TNF in human septicaemia. Immunobiol, 1987, 175, 69

167. Walsh C., Chachoua A., Hochster H., Downey A., Wood D., Nadler P., Speyer J., Wernz J., Oratz R., Meyers M., Blum R.H., Phase I study of recombinant human TNF. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 193

168. Wang M.H., Flad H.D., Feist W., Muschold J., Kusumoto S., Brade H., Gerdes J., Rietschel H.T., Ulmer A.J., Inhibition of endotoxin or lipid A-induced tumor necrosis factor production by synthetic lipid A partial structures in human peripheral blood mononuclear cells. Lymphokine Cytokine Res, 1992, 11, 23-31

169. Watanabe N., Niitsu Y., Neda H., Cytocidal mechanism of TNF: effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibitors on cytotoxicity. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1988, 10, 109-116

170. Wiedenmann B., Reichardt P., Rath U., Phase I trial of intravenous continuous infusion of tumor necrosis factor in advanced metastatic carcinomas. J Cancer Res Clin Oncol, 1989, 115, 189-92

171. Williamson B.D., Carswell E.A., Rubin B.Y., Prendergast Y.S., Old L.J., Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80, 5397-401

172. Wilson A.P., Tumour immunobiology. A practical approach., GallagherG.., Rees R.C., Reynolds C.W. eds. Oxford University Press Inc., New York, 1993, 1 - 14

173. Wing M.G., Montgomery A.M., Harley C., Lachmann J., Cytostasis of different tumours by a murine PPD-reactive CD4+ T lymphocyte clone is mediated by interferon-gamma and tumour necrosis factor alone or synergistically. Clin Exp Immunol, 1990, 82, 208-13

174. Winstanley F.P., Tumour immunobiology. A practical approach., Gallagher G.., Rees R.C., Reynolds C.W. eds. Oxford University Press Inc., New York, 1993, 179-90

175. Vilcek J., Palombella V.J., Henryksen-De Stefano D., Fibroblast growth enhancing activity of Tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors, J Exp Med. 1986, 163, 632 - 643

176. Vincent J.L., Bakker J., Marecaux G., Schandene L., Kahn R.J., Dupont E.,Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. Results of a pilot study. Chest. 1992, 101, 810-15

177. Yamauchi N., Kuriyama H., Watanabe N., Neda H., Maeda M., Niitsu Y., Intracellular hydroxiradical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumour cells in vitro. Cancer Res, 1989, 49, 1671-75

178. Yasumoto K., Okamoto S., Mukaida N., Murakami S., Mai M., Matsushima K., Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. J Biol Chem, 1992, 267, 22506-11

179. Yoshie O., Tada K., Ishida N., Binding and crosslinking of 125I labeled recombinant human tumor necrosis factor to cell surface receptors. J Biochem 1986, 100, 531-41

180. Young S., Licciardello J., Owen-Schaub L., Grimm E., Hong W., RothEvaluation of combination low dose TNF alpha and Iterleukin II for advanced non small cell lung cancer. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 226

181. Zembala M., Czupryna A., Więckiewicz J., Jasiński M., Pryjma J., Ruggiero I., Siedlar M., Popiela T., Tumour-cell-induced production of tumour necrosis factor by monocytes of gastric cancer patients receiving BCG immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 1993, 36, 127-132

182. Zembala M., Kowalczyk D., Pryjma J., Ruggiero I., Mytar B., Klysik I., Stec W.J., The role of tumor necrosis factor in the regulation of antigen presentation by human monocyte. Interventional Immunol. 1990, 2, 337-42

183. Zembala M., Myta B., Wołoszyn M., Popiela T., Uracz W., Czupryna A., Monocyte TNF production in gastrointestinal cancer. Lancet, 1988, 2, 1262

184. Zembala M., Siedlar M., Ruggiero I., Więckiewicz J., Mytar B., Mattei M., Colizzi V., The MHC class II and CD44 molecules are involved in the induction of tumour necrosis factor gene expression by human monocytes stimulated withtumour cells., Int J Cancer, 1994, 56, 269

185. Zhao X., van Steenbrugge G.J., Schroder F.H., Differential sensitivity of hormone-responsive and unresponsive human prostate cancer cells (LNCaP) to tumor necrosis factor. Urol Res, 1992, 20, 193-7

186. Zimmerman R.J., Marafino B.J., Winkelhake J.L., Role of free radicals in tumor cell sensivity to recombinant human TNF implications for mechanism of action. Immunobiol, 1987, 175, 44

187. Zimmerman R.J., Marafino B.J., Chan A., Landre P., Winkelhake L., The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo. J Immunol, 1989, 142, 1405-9

188. Zukiwski A., Wallace S., Guttermann J., Saks S., Mavligit C., Hepatic arterial infusion of recombinant tumor necrosis factor in patients with metastatic carcinoma to the liver. Proc Am Soc Clin Oncol, 1989, 8, 122

189. Zyad A., Benard J., Tursz T., Clarke R., Chouaib S., Resistance to TNF-alpha and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression. Cancer Res., 1994, 54, 825-31

190. Zyad A., Branellec D., Mahe Y, Tursz T., Chouaib S., The development of human tumour cell resistance to TNF alpha does not confer resistance to cytokine induced cellular cytotoxic mechanism. Eur Cytokine Netw, 1992, 3, 187