

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН
ФГБУ «Научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П.Сербского Минздрава РФ
ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированной медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА
России АНО «Национальный институт регенеративной медицины»
ЗАО Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»

«УТВЕРЖДЕН»

на заседании Ученого Совета НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Российский
онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»
Российской Академии Медицинских Наук

Протокол заседания № от «26» июня 2012 г.

«УТВЕРЖДЕН»

на заседании Ученого Совета ФГБУ Федеральный
научно-клинический центр специализированной
медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА
России

Протокол заседания № от «20» июня 2012 г.

ПРОТОКОЛ № 1 GVM/2012 НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ «ПРОТЕОМ-ОСНОВАННАЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ГЛИОБЛАСТОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА» ОТКРЫТОЕ РАНДОМИЗИРОВАННОЕ МУЛЬТИЦЕНТРОВОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Тип документа:	клинический протокол
Фаза:	I/IIa
Дата выпуска:	12.05.2012
Количество страниц:	95

Запрещается использование, опубликование, разглашение без письменного согласия ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН, ЗАО Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии «НейроВита», ФГБУ «Научный центр социальной и судебной психиатрии им В.П.Сербского» Минздрава РФ, АНО «Национальный институт регенеративной медицины», ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России

Москва 2012

СПИСОК ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ:

Главный исследователь:

Барышников Анатолий Юрьевич д.м.н. профессор, член –корр. РАМН Директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН

Координатор исследования:

Брюховецкий Андрей Степанович д.м.н., профессор, директор АНО «Национальный институт регенеративной медицины», генеральный директор ЗАО Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»

Рабочая исследовательская группа протокола:

Менткевич Г. Л., -Заместитель директора по лечебной и научной работе НИИ детской онкологии ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН д.м.н., профессор

Евсеев Н.Г. д.м.н.профессор Заместитель генерального директора по научной и лечебной работе - Главный врач ЗАО Клиника «НейроВита»

Аверьянов А.В. д.м.н. профессор Заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и новых медицинских технологий ФМБА России

Долгополов И.С. Руководитель отделения гемабластозов и трансплантации костного мозга НИИ детской онкологии ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН д.м.н.

Чехонин В.П. д.м.н., профессор, академик РАМН Руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Научный центр социальной и судебной психиатрии им В.П.Сербского»,

Бекашев А.Х. д.м.н. Руководитель нейрохирургического отделения НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН

Меркулов И.А. д.м.н. Руководитель онкологического центра ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и новых медицинских технологий ФМБА России

Фу Р.Г. к.м.н., научный сотрудник нейроонкологического отделения НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им Блохина РАМН

Коваленко Н.И. Руководитель стационарного отделения ЗАО Клиника «НейроВита»

Казьмин С.Н. к.м.н. Руководитель отделения анестезиологии и реанимации ЗАО Клиника «НейроВита»

Мхеидзе Д.М., к.м.н. Руководитель Банка костного мозга НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им Блохина РАМН

Тупицын Н.Н. д.м.н., профессор Руководитель лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Чакуда Г.З. к.м.н. Научный сотрудник НИИ экспериментальной терапии опухолей ФГБУ РОНЦ им Блохина РАМН .

Орехов М.Н. врач –онколог ЗАО Клиника «НейроВита»

Илюхов А. Н. врач- онколог ЗАО Клиника «НейроВита»

Савченко Е.А. научный сотрудник, лаборатория иммунохимии ФГБУ «Научный центр социальной и судебной психиатрии им В.П.Сербского»

Шевченко В.Е. д.б.н., профессор Руководитель лаборатории онкопротеомики НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Ковалев С.В. аспирант лаборатории онкопротеомики НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Аушкап С.С. м.н.с. лаборатории онкопротеомики НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Коноплянников М.А. к.б.н. – заведующий лаборатории клеточных технологий ФГБУ ФНКЦ ФМБА Роси

1. Введение

Злокачественные астроцитарные глиомы составляют до 50% всех первичных опухолей мозга, причем половину из них представляют глиобластомы (ГБ) – наиболее агрессивный вариант с наихудшим прогнозом – продолжительность жизни больных с момента установления диагноза обычно не превышает 50 недель. В США ежегодно выявляется 2 - 3 случая ГБ на 100 000 населения. Возрастной пик заболеваемости наблюдается в группе от 50 до 70 лет. Средний возраст больных

составляет 60,2 года. В последние 25 лет отмечена четкая тенденция роста частоты возникновения злокачественных глиальных опухолей головного мозга в развитых странах, параллельно с увеличением заболеваемости и смертности от рака. ГБ чаще выявляются у мужчин. ГБ обычно рассматривается как спорадически возникающая опухоль. Тем не менее, отмечается увеличение вероятности возникновения глиобластом в семьях, где были зарегистрированы случаи рака молочной железы, толстой кишки, сарком мягких тканей и лейкоза.

ГБ в подавляющем большинстве случаев локализуются в полушариях большого мозга. В толще больших полушарий опухоли располагаются в белом веществе, нередко распространяясь на глубинные структуры, включая мозолистое тело, подкорковые узлы и боковые желудочки. Около 10 % полушарных ГБ имеют поверхностную локализацию с "эпицентром" опухоли в зоне перехода серого вещества в белое. Эти опухоли имеют очерченные микроскопические границы и определенное сходство с метастатическими новообразованиями.

Динамика развития симптомов у больных с глиобластомами может быть представлена несколькими вариантами. В 10-15 % случаев развитию симптомов при глиобластоме предшествует длительный, до нескольких лет, период, проявляющийся только судорожными припадками. При этом установлено, что у больных с длительным анамнезом пароксизмов прогноз более благоприятный. Это связывают с возможной злокачественной трансформацией предсуществующей доброкачественной астроцитомы. Более типично развертывание клинических проявлений за 3 - 6 мес. в виде нарастающей внутричерепной гипертензии и очаговой неврологической симптоматики. В 15-20% случаев наблюдается молниеносное развитие симптомов в течение нескольких недель, что чаще связано с развитием кровоизлияния в ткань опухоли.

Наиболее информативными методами диагностики являются КТ и МРТ с контрастным усилением. Характерным признаком ГБ является зона гетерогенного изменения плотности, в основном по гиподенсивному типу с кольцевидной зоной повышения плотности, что особенно четко выявляется при контрастном усилении. В четверти случаев классический "кольцевидный" тип контрастного усиления может отсутствовать. У таких больных выявляется смешанный или гомогенный тип контрастирования опухоли. Петрификаты в ГБ встречаются редко. Обычно контрастируемая часть опухоли окружена зоной перифокального отека, распространяющегося в белом веществе мозга на большом протяжении. Область перитуморального отека обычно не превышает размеров самой опухоли, что отличает ГБ от метастатических опухолей.

МРТ выявляет характерную гетерогенность структуры опухоли. Томограммы в режиме T1 выявляют нечетко отграниченное объемное образование со смешанным (изо- и гипointенсивным) сигналом, центральным некрозом, который имеет обычно сниженный по отношению к опухолевой массе сигнал. Проявления опухоли в режиме T2 имеют мозаику разноинтенсивных сигналов с участками гипо - изо - и гиперинтенсивного сигнала от стромы ГБ, некроза, кист и кровоизлияний. Эффект объемного воздействия и отек белого вещества часто сопровождает небольшие опухоли. Границы опухоли могут сливаться с перифокальным отеком. Гипервентиляция улучшает визуализацию солидной части опухоли. Для объективизации истинного объема оставшейся части опухоли после проведенной операции наиболее информативна МРТ с контрастным усилением, выполненная в течение первых суток после удаления опухоли.

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) не применяется для верификации инициального диагноза, поскольку по качеству изображения и степени разрешения значительно уступает и КТ и МРТ, но может использоваться для дифференциальной диагностики лучевого некроза и продолженного роста ГБ.

Впервые термин "глиобластома" был использован в классификации опухолей ЦНС, разработанной Bailey и Cushing, построенной по гистогенетическому принципу. К середине 20 века в теоретической онкологии лидирующие позиции заняла концепция опухолевой прогрессии, предполагающая возникновение новообразований не из эмбриональных клеточных зачатков, а вследствие стадийной неопластической трансформации стволовых клеточных элементов зрелого организма. В современной нейроморфологии большое распространение получил классификационный принцип St. Anne-Mayo, предусматривающий существование 4 категорий астроцитарных глиом, различающихся по степени злокачественности. Последняя, определяется по идентификации в опухоли 4 морфологических признаков: атипии ядер, наличия фигур митозов, пролиферации эндотелия сосудов и очагов некрозов. Сумма признаков составляет градацию злокачественности опухоли. Четвертая

степень злокачественности по классификации St-Anne-Mayo соответствует глиобластоме ВОЗ и идентифицируется на основе одновременного выявления в опухоли композиции трех или всех четырех патогистологических признаков. В НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко разработана цитологическая классификация, включающая три разновидности глиобластом: изоморфноклеточная, полиморфноклеточная и гемистоцитарная.

1.2. Молекулярная генетика глиобластом

Для ГБ наиболее типичны следующие формы патологии генома. В 30-40 % ГБ выявлена мутация гена – p53, локализуемого на коротком плече 17 хромосомы. Мутация проявляется либо полной потерей генетического материала вследствие делеции плеча, либо в виде перегруппировки экзонной последовательности гена. В 60-70% ГБ обнаружена амплификация гена c-erbB-1, кодирующего синтез рецепторов эпидермального фактора роста. В результате этого происходит многократное увеличение концентрации наружного и внутреннего доменов этого рецептора в опухолевых клетках. В большинстве ГБ выявлена делеция одной или обеих хромосом 10-й пары.

На основе анализа комбинаций этих аномалий von Deimling и соавт. предложили следующую молекулярно- генетическую классификацию ГБ: 1) опухоли, содержащие мутацию гена p53, при отсутствии амплификации гена, кодирующего синтез РЭФР. Это больные, как правило, молодого возраста, имеющие длительный анамнез заболевания; 2) ГБ с наличием делеции 10-й хромосомы при отсутствии мутации гена p53. Это больные, как правило, более пожилого возраста, имеющие короткий анамнез (ГБ, развившиеся первично).

ГБ всегда является инвазивно растущей опухолью с диффузно-инфильтративным характером роста по отношению к мозговому веществу. Инфильтрация происходит либо по ходу волокон проводящих путей (периаksonальный тип, лежащий в основе распространения опухоли по комиссуральным волокнам мозолистого тела в противоположное полушарие), либо по периваскулярным пространствам. Субэпендимарная инфильтрация наблюдается при рецидивах ГБ. Возможно прорастание опухоли в толщу твердой мозговой оболочки, а при наличии костного дефекта – и в мягких ткани покровов черепа .

Высокие инвазивные свойства клеток ГБ объясняют активной продукцией ими разнообразных протеолитических ферментов (металлопротеиназ, коллагеназ и т.д.), а также способностью продуцировать белки экстрацеллюлярного матрикса (тенасцин, ламинин), которые являются благоприятным субстратом для миграции опухолевых клеток в ткани мозга. Встречаемость мультифокальных форм ГБ достигает 10%, хотя чаще это - единая опухоль, имеющая несколько зон интенсивного клеточного размножения.

1.3. Терапия глиобластом головного мозга

В настоящее время общепринятым (конвенциональным) является комбинированное лечение опухолей ЦНС, включающее хирургию, лучевую терапию и различные схемы химиотерапии.

1.3.1. Роль и методы хирургического лечения.

По современным представлениям, максимально возможное удаление ГБ или метастатической опухоли является технологией выбора, так как приводит как к одномоментной элиминации большого количества жизнеспособных опухолевых клеток, включая терапевтически резистентные пулы, так и к уменьшению внутричерепной гипертензии. Одномоментное удаление большой массы опухолевых клеток активирует у оставшихся клеточных пулов пролиферативные процессы, что делает их более чувствительными к терапевтическому воздействию, эффект которого максимально выражен для клеток, находящихся в митотическом цикле. Кроме того, расширенное оперативное вмешательство сопровождается выраженным нарушением целостности гемато-энцефалического барьера в перифокальной зоне опухоли, что облегчает проникновение химиотерапевтических агентов к месту их непосредственного воздействия.

Роль повторных операций при ГБ достаточно неоднозначна: выигрыш в продолжительности жизни, исчисляемый несколькими неделями не сопоставим с затрачиваемыми усилиями и высоким риском операции, а сроки жизни с более высоким качеством жизни минимальны. Показания к реоперации определяются возрастом, состоянием больного, темпами прогрессии рецидива опухоли.

Большое значение имеет планирование предстоящего вмешательства. При этом осуществляется трехмерное определение объема контрастируемой части новообразования и его взаимосвязь с различными анатомическими структурами. Доступ должен быть выбран таким образом, чтобы длина разреза коры и транскортикального хода были минимальными. Объем удаляемой массы должен приближаться к до операционно установленным размерам новообразования.

Для верификации гистологического диагноза целесообразно применение стереотаксической биопсии (СТБ) под контролем КТ или МРТ. Показаниями к СТБ являются: опухоли глубинного или срединного расположения, опухоли размером менее 2 см, опухоли, имеющие выраженный кистозный компонент, первично множественные опухоли. СТБ рекомендуется также в случае изменения рентгенологической семиотики, при тяжелом состоянии больного или же, наоборот, в случаях минимально выраженного неврологического дефицита.

1.3.2. Лучевая терапия.

Наиболее эффективным методом лечения больных с ГБ является комбинированное, сочетающее хирургическое удаление опухоли с последующим курсом лучевой терапии. Основной эффект ионизирующего облучения на клеточном уровне связан с развитием повреждений молекулы ДНК электронами и свободными радикалами, которые образуются при взаимодействии рентгеновского облучения и гамма - фотонного облучения с молекулой воды. Одной из причин радиорезистентности злокачественных глиом является то, что напряжение кислорода в ткани опухоли значительно ниже, чем в окружающем мозговом веществе. Продолжительность жизни четко коррелирует с увеличением суммарной очаговой дозы облучения, достигающей 70 грей. Дальнейшее увеличение дозы ограничено развитием радиационного некроза. Рост опухоли во время облучения - прогностически плохой признак. Электрон-акцепторные препараты (метронидазол, мисонидазол) являются радиосенсибилизаторами и способны увеличивать терапевтическую чувствительность аноксических опухолевых клеток к ионизирующему излучению. Внутритканевая брахитерапия позволяет подвести большую дозу облучения непосредственно к опухоли путем доставки радиоактивных изотопов йода, золота и иридия непосредственно в опухоль при небольшом рассеивании в окружающем мозге. Альтернативой интерстициальной брахитерапии является стереотаксическая радиохирurgia с помощью линейных ускорителей, однако результаты использования этого технически сложного метода у больных с ГБ пока не показывают преимуществ по сравнению с дистанционным облучением. Недостатком метода является максимальная локализация дозы облучения, не позволяющая воздействовать на "зоны инфильтрации" ГБ.

В настоящее время предпринимаются попытки увеличения эффективности интерстициального облучения в комбинации его с химиотерапией, тканевой гипертермией, фотодинамической терапией.

Активно изучается нейтрон-захватная терапия. Эта бимодальная форма лучевой терапии, основанная на селективной аккумуляции стабильных изотопов бора опухолью с последующим облучением нейтронным пучком. Энергия тяжелых частиц, освобождаемая при взаимодействии изотопа бора с нейтронами, обладает разрушающим действием на клетки, распространяясь лишь в непосредственной близости (<10 nm) от места накопления изотопа.

1.3.3. Химиотерапия.

Существует ряд причин относительно низкой химиотерапевтической чувствительности ГБ. Прежде всего, гематоэнцефалический барьер является препятствием на пути проникновения адекватной дозы препарата в ткань опухоли. Помимо этого, лекарственная устойчивость ГБ может быть обусловлена общими для всех опухолей причинами (редукция внутриклеточного накопления препарата, инактивация цитохромов и диафораз, усиливающих химиотерапевтическое воздействие, а также увеличение концентрации ферментов и белковых субстанций, инактивирующих или разрушающих лекарственные препараты). Структурно-биологическая гетерогенность ГБ также является причиной их лекарственной резистентности.

Хотя некоторые проблемы, связанные с лекарственной резистентностью ГБ, могут быть решены путем увеличения дозы препарата, подобная тактика чревата риском развития нейротоксичности. Применение препаратов нитрозомочевины являлось основным методом химиотерапии злокачественных глиом. Оптимальный эффект дает беллустин - BCNU у больных с продолженным ростом глиальных опухолей. Разработан дифференцированный подход к назначению

химиотерапии препаратами нитрозомочевины для различных типов ГБ: при изоморфноклеточной опухоли химиотерапия целесообразна при субтотальном удалении опухоли, при полиморфноклеточном типе – она показана во всех случаях, в том числе при частичном удалении опухоли, а при гемистоцитарной форме назначение химиотерапии лишь ухудшает прогноз.

В настоящее время препаратом выбора лечения ГБ является темодал в дозе 200 мг на м² тела перорально.

Разобраться в хитросплетениях показаний и обоснованности назначений современной лекарственной терапии при ГБ очень не просто. В фундаментальном современном руководстве по нейроонкологии «Principles of Neuro-Oncology», вышедшем в 2005 г в США под редакцией David Schiff и Brian Patrick O'Neill впервые были представлены основные принципы применения и практические подходы к лекарственной терапии глиальных опухолей мозга, исходя из основных стандартных, так и новых представлений о генезе опухоли в свете последних открытий в области молекулярной генетики, исследований путей трансдукции сигнала, которыми в основе своей управляется рост злокачественных глиом.

Расширение наших познаний в области молекулярной биологии опухолей головного мозга позволило уже сегодня создать новые вещества, ориентированные на новые мишени. Какое будущее ждет «стандартную», или «традиционную» химиотерапию типа прокарбазина и CCNU, используемую для лечения таких пациентов? Нет сомнения, что от произошедшей молекулярной революции больше всего выиграла именно онкология, тем не менее, та же революция скорее привлекла большее внимание к некоторым традиционно используемым препаратам, нежели отвлекла от них.

Основными мишенями для современной лекарственной терапии опухолей мозга сегодня рассматриваются : 1. Рецепторы факторов роста клеточной поверхности и направленное воздействие (таргетинг) на рецептор фактора роста 2. Нейтрализация антител к EGFR, 3. Фармакологические ингибиторы EGFR и ингибиторы рецептора фактора роста тромбоцитов, 4. Применение внутриклеточных компонентов вторичного мессенджера, 5. Воздействие на Ras ингибиторами фарнезилтрансферазы, 6. Ингибиторы протеинкиназы C, 7. Препараты, напрямую воздействующие на ДНК или же процесс ее репликации 8. Алкилирующие вещества 9. Ингибиторы клеточного цикла, 10. Фармакологическая терапия, воздействующая на контрольной точке G1/S, 11. Генная терапия, направленная на укрепление барьера G1/S, 12. Протеиназы и интегринны как медиаторы инвазивности опухоли, 13. Эффекторные молекулы целенаправленного воздействия на протеинкиназы, интегринны, медиаторы ангиогенеза 14. Способы повышения эффективности таргетинга препаратов в опухоль, 15. Доставка в опухоль большего количества препарата: вещества, повышающие проницаемость гематоэнцефалического барьера, 16. Химиотерапия проводимая непосредственно в паренхиму головного мозга: интерстициальная терапия, 17. Лучшее распределение лекарственного вещества по мозгу: конвекционный подход, 18. Функциональный таргетинг лекарственного средства в опухолевую клетку.

1.3.4. Общая оценка результатов лечения глиобластом головного мозга (ГБ ГМ).

Несмотря на значительное совершенствование разнообразных методов лечения ГБ и МО ГиСМ, не удается вплоть до настоящего времени существенно увеличить продолжительность жизни больных. Только 10% больных с ГБ жили дольше 18 месяцев после установления диагноза, а 5-летняя выживаемость близка к 0. В последние десятилетия отмечено увеличение числа больных, проживших более 2 лет, однако общая средняя продолжительность жизни больных не претерпела существенных изменений. Достоверные прогностические критерии, определяющие увеличение средней продолжительности жизни больных, следующие: возраст больных моложе 40 лет, индекс Карновского до и после операции выше 70 баллов, максимально возможное удаление опухоли, СОД не менее 60 Гр. Патоморфологические факторы, влияющие на продолжительность жизни больных с ГБ: наличие в опухоли участков, имеющих строение доброкачественной астроцитомы, наличие мононуклеарных и лимфоидных инфильтратов при отсутствии обширных очагов некроза. Кардинальная проблема в подходе к лечению ГБ состоит в несопряженности избирательной агрессивности клеток новообразования и неселективности методов лечебных воздействий. Технологии, обеспечивающие избирательно высокую концентрацию препарата в ткани опухоли следует называть «химиохирургией». Важной предпосылкой увеличения избирательности, концентрированности лечения гиперпролиферативных новообразований мозга является использование

специфических аутологичных стволовых клеток для обеспечения селективного транспорта агрессивных цитолитических агентов в строму ГБ и МО Г и СМ.

1.4. Иммуноterapia глияльных опухолей головного мозга

1.4.1. Общая методология и существующие методы иммунотерапии опухолей

Несмотря на значительные достижения современной онкологии, выживаемость больных со злокачественными опухолями ГМ и СМ остается крайне низкой. Медиана выживаемости онкологических пациентов с возвратными и рефрактерными злокачественными опухолями зависит от степени пролиферативности неопластического процесса и находится на уровне 2-3-х лет. Лишь при небольшом количестве отдельных возвратных форм рака выживаемость составляет более 5 лет .

Как мы отмечали выше, применяемые противоопухолевые методы лечения, среди которых основными, наряду с хирургическими, являются химиотерапия, отдельно или в сочетании с лучевой и радиотерапией, часто бывают недостаточно эффективны. Кроме того, все эти воздействия сами по себе вызывают иммуносупрессию, следствием которой являются подавление костно-мозгового кроветворения и инфекционные осложнения, а также развитие дисбиоза кишечника. В итоге, иммунная система, уже ослабленная в результате развития опухоли, подвергается еще одному, дополнительному удару, подавляющему ее активность. Отсюда следует, что успешное излечение от опухоли может зависеть от баланса между противоопухолевой эффективностью химиотерапевтических комплексов и потенциалом иммунной системы, достаточным (или недостаточным) для того, чтобы справиться с оставшимся после лечения количеством опухолевых клеток. В связи с этой проблемой было предложено несколько дополнительных или альтернативных способов лечения опухолей, большинство из которых направлено на усиление противоопухолевой активности иммунной системы. Это новое направление в современной онкологии, получило название иммуноterapia. Иммуноterapia различных злокачественных опухолей уже давно доказала необходимость своего клинического применения в структуре комплексной терапии рака и других онкологических заболеваний, однако широкого клинического применения она пока к сожалению не приобрела.

История иммунотерапии рака и других злокачественных опухолей мозга обращается к 1891 году, когда доктор W.Coley в Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (США, Нью-Йорк) впервые предпринял попытки лечения больных раком вытяжками из культур стрептококка. В результате, у некоторых больных рост опухолей подавлялся, другие же погибали от кахексии, не связанной с онкологическим заболеванием. Именно тогда и возникло предположение о губительном воздействии на опухоль каких-то факторов, появляющихся в ответ на введение бактериальных вытяжек. В 1962 году O'Malley с соавторами в опытах на мышах доказали, что геморрагические некрозы в опухолях после введения бактериального липополисахарида (ЛПС) обусловлены действием не самого ЛПС, а какого-то промежуточного фактора, который появляется в сыворотке крови в ответ на инъекцию ЛПС. Эта сыворотка обладала способностью убивать опухолевые клетки при введении другим мышам, которые не получали инъекций ЛПС. И, наконец, в 1975 году, опять же в Memorial Sloan-Kettering Cancer Institute, E. Carswell с соавторами открыли и описали медиатор, обладающий цитотоксическим действием на различные опухолевые клетки, появляющийся в крови мышей в ответ на введение ЛПС от *Bacillus Calmette-Guerin* и назвали его "Tumor necrosis factor" - фактором некроза опухоли (А.М.Попович , 2010) .

Еще в начале XX века о вирусной природе злокачественных опухолей высказывались И. И. Мечников и Н. Ф. Гамалея. В 50-е годы XX века Л. А. Зильбер создал вирусогенетическую концепцию опухолей. Его работы по иммунологии опухолей привели к исследованию опухолевых антигенов и, в конце концов, - к открытию специфического печеночного альфа-фетопротеина, что позволило разработать ценную диагностическую реакцию на рак печени. В апреле 1981 года Национальный Институт по Изучению Рака (США) начал широкомасштабную научную программу по исследованию биологических методов в лечении рака. В течение 10 лет работы над этой программой ученые института разработали 3-х ступенчатую методику оценки эффективности методов биотерапии рака. На основании этой методики была подробно изучена эффективность существующих на тот момент времени способов биотерапии рака (интерферонов альфа, бета, гамма, ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО, КСФ, ЛАК и

ТИЛ терапии, моноклональных антител, ростовых факторов) и определены основные направления для создания новых методов лечения этого заболевания.

Иммунотерапия рака основана на том, что многие опухоли характеризуются слабым иммунным ответом и выраженным иммуносупрессивным действием, механизмы формирования которого до конца еще не исследованы. Состояние иммунодепрессии расценивается как важный патогенетический фактор неблагоприятного течения злокачественных опухолей, а перспективы их лечения связывают с разработкой и внедрением в практику методов иммунотерапии. Основными положениями иммунологии опухолей, которые создали теоретические предпосылки для иммунотерапии, являются следующие: 1) клетки опухолей экспрессируют на поверхностной мембране антигены, отличающиеся от нормальных; 2) при экспериментальном канцерогенезе и предраковых заболеваниях человека наблюдается недостаточность иммунной системы; 3) клинически выявляемый рост новообразований происходит при нарушении состояния иммунной системы, которое усугубляется противоопухолевым лечением; 4) более высокая реактивность иммунной системы до и после лечения коррелирует с лучшим прогнозом.

Доказано, что иммунотерапия эффективна для опухолевых клеток, но она не воздействует на раковые стволовые клетки (РСК) опухоли, так на поверхностной мембране РСК нет презентации специфических раковых антигенов. В настоящее время общепризнано в свете концепции раковой стволовой клетки, что опухоль начинается с РСК, которая делится симметричным делением (на две РСК или две РСК-прогениторные клетки) или асимметричным делением (на РСК и РСК-прогенитору клетку). По современным представлениям РСК это аутологичная стволовая клетка, получившая в процессе своей жизнедеятельности и функционирования критический набор мутаций генов и анеуплоидий, в результате которых у нее сформировалась неустойчивость генома (кариотипа), она вышла из под контроля регуляторных механизмов иммунной системы и регионарных противоопухолевых систем, стала неуправляемо пролиферировать и делиться, а также приобрела характеристики бессмертной клеточной системы. Потомки РСК имеют различную степень дифференцировки и характеризуются более быстрым и частым делением клеток, по сравнению с их нормальными аналогами. Раковые клетки приобретают генетические мутации, которые наделяют их аномальными характеристиками. Эти мутации воздействуют на способность иммунной системы распознавать раковые клетки как аномальные. Для них характерно отсутствие регуляции роста, зависимой от факторов роста. Раковые клетки приобретают способности к росту в суспензии, имеют высокий индекс митозов, характеризуются бессмертием, резистентность к апоптозу, потерей «гена – супрессора опухоли». И конечно же, на поверхностной мембране раковых клеток различной стадии дифференцированности имеет место презентация раковых антигенов, которые могут быть выявлены специфическими онкомаркерами.

Возникает вопрос: Как раковые клетки и РСК вторгаются в иммунную систему? Ответ на этот вопрос сегодня однозначен. Раковые клетки растут быстрее, чем обычные клетки, имеют сниженную экспрессию антигенов и соответственно сниженную иммуногенность, выделяют иммуносупрессорные факторы, снижающие отклик хозяина, ингибируют апоптоз, могут быстро давать метастазы в другие органы и ткани. Соответственно иммунная система реагирует на интервенцию раковых клеток активацией и напряжением всех своих компонентов. Напряжение иммунной системы проявляется клеточным ответом (активация лейкоцитов), тканевым ответом (иммунная реакция кожи, реакция первичных лимфоидных органов: костный мозг, тимус, активацией вторичных лимфоидных органов: печень, селезенка, лимфоузлы ...), а также выделяемыми молекулами (цитокины, факторы роста) разных клеток, антителами (иммуноглобулины) вырабатываемыми В клетками. В итоге, клеточный иммунитет проявляется специфической цитотоксичностью Т-клеток, NK -клеток, макрофагов и опосредуют цитотоксичность, выделяя цитокины, а гуморальный иммунитет реагирует на опухоль образованием антиопухолевых антител В-клеток.

При этом вся современная иммунотерапия пытается усилить иммунный ответ организма пациента: активация NK клеток (усиливает контроль за раком), активация макрофагов (усиливает цитотоксичность), иммунизация В-клеток (выработка анти-опухолевых антител), активация Т-клеток (усиливает специфическую цитотоксичность Т-клеток). В Интернете (<http://www.lechenie-raka.ru/tradicionnaja/tradicionnye-metody-lechenija-opuholej/26-immunoterapiya.html>) мы нашли еще несколько различных определений и разновидностей иммунотерапии. Так, вариантом иммунотерапии является *иммунокоррекция* - исправление дефектного функционирования иммунной системы.

Иммунотерапия достигается применением методов заместительной или *иммуномодулирующей* (стимулирующей или депрессивной) терапии, а также *иммунореконструкции*. Заместительная иммунотерапия — восполнение недостающих эффекторов иммунитета главным образом за счет антител, содержащихся в лечебных препаратах иммуноглобулина (гамма-глобулина), плазмы, иммунных сывороток. Применение для заместительной иммунотерапии жизнеспособных донорских клеток имеет крайне ограниченные показания. Иммуномодулирующая терапия — воздействие на нарушенный или нормальный иммунитет через регуляторные механизмы. Ее осуществляют с помощью иммуномодуляторов — препаратов, способных в зависимости от дозы и способа применения стимулировать или угнетать иммунитет либо активировать одни элементы иммунной системы и подавлять другие. Препараты, которые в диапазоне обычно назначаемых доз и схем стабильно проявляют депрессивный эффект, называют иммунодепрессантами, а препараты, обладающие стимулирующим эффектом, — иммуностимуляторами (стимуляторами иммуногенеза). Иммунореконструкция — воссоздание иммунитета, как правило, путем трансплантации живых полипотентных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга или эмбриональной печени, реже центральных органов иммуногенеза, например вилочковой железы.

В таблице 1 мы представили основные виды современной иммунотерапии рака и других злокачественных опухолей. Как видно из этой таблицы она не включает в себя подходов иммуно-реконструкции. На сайте <http://www.tumor.ru/leshenie/immunother.html> было показано, что различные иммунные агенты могут воздействовать на опухоль посредством одного или более механизмов, а именно: 1. Стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, увеличивая количество эффекторных клеток (например, лимфокинов); 2. Выступать в качестве эффектора или медиатора; 3. Подавлять иммунодепрессивный эффект опухоли на организм; 4. Влиять на опухолевые клетки так, чтобы повышалась их иммуногенность и вероятность повреждения за счет иммунологических реакций; 5. Увеличивать устойчивость организма к цитотоксической или лучевой терапии.

Как утверждает М.В. Киселевский (2002) эффект иммунотерапии зависит от основных антигенных различий опухолевых и нормальных клеток. Преимущество иммунотерапии заключается в возможности подавления пролиферации опухолевых клеток без подавления пролиферации нормальных. К опухолям, в отношении которых уже доказана эффективность иммунотерапии, относятся: 1) меланома; 2) рак почки; 3) неходжкинская лимфома; 4) волосатоклеточный лейкоз; 5) рак прямой кишки; 6) рак яичника; 7) глиома и глиобластома; 8) саркома мягких тканей. Активная специфическая терапия опухолей основывается на способности иммунной системы воздействовать на рост опухоли. Целью такой терапии является усиление иммунного ответа организма на опухоль. Оказалось, что иммунная система «умеет» отличать опухолевые клетки организма от нормальных и избирательно убивать клетки опухоли. Задача онколога провести активацию иммунной системы для её эффективной работы против опухоли.

Внутри активной иммунотерапии существует три основных подхода: первый — это стимуляция Т-лимфоцитов, второй (менее распространенный) — это стимуляция нормальных киллеров (NK cells), третий — манипуляции с дендритными клетками. Последние методы в основном определяются как вакцинотерапия опухолей. В литературе, посвященной вопросам иммунотерапии опухолей, достаточно часто можно встретить термин "противораковая вакцина". К сожалению, в некоторых случаях авторами это понятие используется ошибочно или некорректно. Вакцинация — способ создания активного иммунитета с помощью вакцин. Необходимое условие при этом — способность к правильной иммунной реакции у пациента на вакцину (отсутствие иммунодефицита, правильное распознавание и презентация клетками иммунной системы антигена). Другой термин — "иммунизация" — имеет более широкое понятие, подразумевает возможность создания не только активного, но и пассивного иммунитета. Это может быть достигнуто различными способами, в том числе путем введения в организм готовых факторов иммунной защиты (антител, иммунокомпетентных клеток и др.). Пассивная иммунизация часто проводится на фоне имеющегося у пациента иммунодефицита.

В связи с этим к противоопухолевым вакцинам относятся только те методы иммунотерапии, которые приводят к созданию у пациента специфического активного противоопухолевого иммунитета или противовирусного иммунитета к онкогенным вирусам (<http://www.anticancer.net/reviews/immunotherapy.php>). Противоопухолевая вакцинация — это способ создания активного специфического противоопухолевого иммунитета в организме с помощью

вакцины, содержащей иммуногенные антигены. Противоопухолевые вакцины могут включать в свой состав целые опухолевые клетки либо только их антигены. В зависимости от их состава и, следовательно, механизма формирования иммунного ответа противоопухолевые вакцины классифицируются следующим образом: 1. Вакцины на основе целых клеток: а) аутологичные; б) аллогенные. 2. Антигенные вакцины: а) белки или фрагменты белков опухолевых клеток; б) ДНК и РНК-содержащие вакцины; в) рекомбинантные вирусы; г) антиидиотипические вакцины. 3. Вакцины на основе дендритных клеток.

В случае *клеточных вакцин* опухолевые клетки берутся непосредственно у пациента и выращиваются в специальных условиях. Затем эти клетки используют в лечебных целях, предварительно убедившись, что они больше не размножаются и не содержат никакого материала, способного инфицировать пациента. При введении клеточной вакцины у пациента генерируется иммунный ответ против опухолевых антигенов. Существует два типа клеточных противоопухолевых вакцин. 1. Аутологичные клеточные вакцины содержат собственные клетки пациента (предварительно инактивированные). 2. Аллогенные клеточные вакцины изготовлены из целых инактивированных клеток другого пациента или представляют собой комбинацию из клеток нескольких пациентов.

Антигенные вакцины не содержат в своем составе целых клеток, а только антигены опухолевых клеток. Одна опухоль может быть представлена широким спектром антигенов. Некоторые антигены представлены у всех опухолей определенного типа, а некоторые антигены уникальны и могут быть обнаружены только у данного пациента. Существует много путей включить антиген в состав антигенной вакцины. Белки или фрагменты белков опухолевых клеток непосредственно вводятся в организм в качестве вакцины. В организм вводится генетический материал, кодирующий эти протеины (ДНК- и РНК-вакцины). В качестве «средства доставки» антигена в организм пациента может быть использован вирус. Вирусы, используемые подобным образом, называют «вирусными векторами» и не обладают никакими инфекционными свойствами. Эти вирусы в лабораторных условиях инфицируют клетки организма человека и становятся носителями на своей поверхности опухолевых антигенов. Вирус способен инфицировать только небольшое количество клеток организма — достаточное для генерации иммунного ответа, но недостаточное для того, чтобы вызвать заболевание.

С помощью методов генной инженерии можно также использовать вирусы для выработки цитокинов или встраивать протеины в поверхность вируса, что способствует активации иммунокомпетентных клеток. Таким образом, модифицированные вирусы можно вводить в организм пациента самостоятельно или в комбинации с вакциной для усиления генерации иммунного ответа.

Иногда в качестве антигенов в вакцине используют антитела. Пациенту вводят антитела к опухолевым антигенам, затем В-лимфоциты вырабатывают антитела к этим антителам, которые также распознают опухолевые клетки. Это так называемые «антиидиотипические вакцины», отличающиеся от пассивного лечения антителами.

АПК-вакцины изготовлены на основе антигенпрезентирующих клеток, которые обладают наибольшей способностью активировать Т-лимфоциты для уничтожения опухолевых клеток. Чаще всего используются дендритные клетки. Противоопухолевые вакцины содержат в своем составе дендритные клетки, которые либо подвержены первичному воздействию антигена, либо растут в его присутствии. Дендритные клетки (или другие АПК), подверженные воздействию антигена, несут опухолевые антигены на своей поверхности и при попадании в организм готовы активировать размножение Т-лимфоцитов и уничтожение ими опухолевых клеток.

Клиническое применение противоопухолевых вакцин – разновидность иммунотерапии, которая пока является преимущественно экспериментальной. В настоящее время проводятся клинические испытания множества вакцин против различных злокачественных опухолей. 8 апреля 2008 года биотехнологическая компания Antigenics сообщила о государственной регистрации в Российской Федерации препарата Oncophage® (витеспен, HSPPC-96) для лечения пациентов с раком почки с риском рецидивирования. Вакцина представляет собой белок теплового шока, выделенный из опухоли определенного пациента и направленный именно против нее. Препарат Oncophage проходил испытания в качестве вакцины для профилактики рецидивов рака почек, точнее от гипернефромы.

Исследование показало, что у пациентов с раком почки, у которых вероятность рецидива была минимальна, "Oncophage" удлинил период ремиссии на 45%, в среднем на 1,8 года по сравнению с контрольной группой, сообщает Antigenics.

Противоопухолевая вакцина Onyva (антиидиотипическая вакцина на основе моноклональных антител 105AD7) с 25 апреля 2002 года по настоящее время проходит клинические испытания (лечение поздних стадий колоректальной аденокарциномы) в одной из больниц Лондона (St. George's Hospital, London, UK). Вакцину назначают внутривенно одновременно с вакциной BCG или внутримышечно одновременно с адьювантом – гидроксидом алюминия.

Cancer VAX (поливалентная вакцина против меланомы) с 17 февраля 2000 года используется совместно с хирургическим лечением при лечении 3-й стадии меланомы в трех медицинских центрах Австралии, во Франции (Pitie-Salpetriere, Paris), в Израиле и в 25 центрах США. Для усиления клеточного иммунного ответа эту вакцину назначают совместно с вакциной BCG.

С 1 марта 2001 года в Университете штата Техас (University of Texas, USA) для лечения пациентов с II-IV стадиями раковых опухолей желудочно-кишечного тракта (пищевода, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки), содержащих клетки с канцероэмбрионическим антигеном (carcinoembryonic antigen – CEA) на их мембранах, используются пептидные фрагменты этого антигена из семи аминокислот (пептид канцероэмбрионического антигена 1-6D). Совместно с этим пептидом назначают GM-CSF (NLM Identifier <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00012246>).

Со 2 апреля 2001 года в Нью-Йорке, США (Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, New York) применяется пептидная вакцина NY-ESO-1, которую вводят внутривенно при II-IV стадиях сарком мягких тканей, если данная опухоль экспрессирует антигены NY-ESO-1, LAGE NY-ESO-1 или LAGE. Совместно с этой вакциной подкожно вводят гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony stimulating factor - GM-CSF). GM-CSF вводят в течение 5 дней, начав курс за 2 дня до назначения вакцины (NLM Identifier <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00027911>).

С 8 ноября 2001 года в Калифорнии, США (Hoag Memorial Hospital Presbyterian, Newport Beach, California) для лечения пациентов с рецидивами рака почек III-IV стадии применяют аутологичные дендритные и опухолевые клетки, а также рекомбинантный гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор (NLM Identifier <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00014131>).

С 9 ноября 2001 года в Чикаго, США (University of Chicago Cancer Research Center, USA) для лечения метастатического гормонрезистентного рака простаты применяют вакцину, разработанную на основе простатоспецифического мембранного антигена (prostate specific membrane antigen). Кроме того, для подавления ангиогенеза в метастазах вводят IL-12 (NLM Identifier <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00015977>).

Вакцина ALVAC-CEA/B7.1 представляет собой дезактивированный штамм вируса, антигенная структура которого во многом повторяет антигены, экспрессируемые колоректальными опухолями. Препарат проходит клинические испытания при лечении метастатического колоректального рака в нескольких крупных медицинских центрах Северной Америки (в Лос-Анжелесе, Нью-Йорке, Вашингтоне, Филадельфии, Чикаго и Онтарио). ALVAC-CEA/B7.1 назначается сразу же после установления диагноза вместе с химиотерапией, и уже получены первые обнадеживающие результаты без каких-либо побочных эффектов.

Вакцина VG-1000 действует против защитных механизмов злокачественных клеток. Эта вакцина наиболее эффективна в лечении карцином и меланом, а также с успехом применяется при некоторых видах сарком и лейкемии. Условием применения вакцины является отсутствие угнетения системы иммунитета вследствие предшествующей химиотерапии или лучевой терапии. VG-1000 может быть рекомендован в качестве препарата первой линии для пациентов с недавно диагностированным раком, а также для предотвращения рецидивирования рака. Этот метод лечения в настоящее время применяется в двух клиниках Северной Америки: во Фрипорте (Багамы) – The Immuno-Augmentative Clinic, Freeport, Grand Bahamas, а также в Тихуане (Мексика) – CHIPSA's – Center for Integrative Medicine in Tijuana, Baja California, Mexico.

Исследователи из Нью-Йорка считают, что кратчайший путь к разработке новой вакцины против рака – использование особого класса протеинов, так называемых белков теплового шока (HEAT SHOCK PROTEINS: NEW AVENUE TO CANCER VACCINES).

В Мериленде (США) в настоящее время проводится вторая фаза клинических испытаний вакцины «TRICOM» для оценки эффективности лечения поздних стадий рака простаты с метастазами в кости. Название "Tricom" – сокращение для комбинации из трех взаимостимулирующих друг друга молекул, которые усиливают Т-клеточный ответ (B7-1, ICAM и LFA-3). Первая фаза клинических испытаний вакцины у пациентов со злокачественными новообразованиями (все раковые опухоли экспрессировали карциноэмбрионический антиген – СЕА) продемонстрировала безопасность препарата и его эффективность.

Обобщая вышесказанное, наиболее перспективным направлением иммунотерапии является иммунизация пациента опухолевыми антигенами, создание противоопухолевых вакцин на основе дендритных аутоклеток, а так же использование антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, полученных при активации лимфоцитов *ex vivo* в присутствии опухолевых антигенов. Для активации специфического противоопухолевого иммунитета в последнее время созданы методы получения автовакцин на основе дендритных клеток (ДК). ДК обладают высокой способностью презентировать Т-киллерам специфические опухолевые антигены и делать их иммунными по отношению к клеткам опухоли. ДК генерируются из периферических стволовых клеток или клеток костного мозга посредством культивирования с колониостимулирующими факторами (ГМ-КСФ, ИЛ-4 и др.). ДК инкубируются с опухолевыми антигенами, вводятся в организм больного и активируют *in vitro* специфический противоопухолевый иммунитет. Эта процедура позволяет повысить распознавание опухолевых клеток, характеризующихся низкой иммуногенностью, цитотоксическими Т-лимфоцитами. Клинические испытания этой вакцины проводятся у больных с распространенными формами злокачественных новообразований традиционно считающихся чувствительными к иммунотерапии (меланома, рак почки и колоректальный рак). Вместе с тем вакциноterapia может быть использована и при раке яичников. Очевидно, что наиболее оптимально ее применение после радикальной операции и стандартной химиотерпии, т. е. после максимального удаления опухоли. Кроме того, хирургическое вмешательство позволит получить необходимое количество ткани, антигены которой будут презентированы дендритными клетками (Киселевский М.В., 2010).

Очень перспективным направлением применения иммунотерапии в нейроонкологии считаются работы в области направленного использования иммунной «реакции трансплантат против опухоли». Э.И. Подольцева, (2003) в своей статье «Реакция «трансплантат против опухоли» – перспективный метод иммунотерапии злокачественных новообразований» ([http:// www. practical - oncology.ru/arh015/07.pdf](http://www.practical-oncology.ru/arh015/07.pdf)) показала, что современная иммунотерапия может оказаться разумной альтернативой для больных, резистентных к химиотерапии. Несмотря на определенные успехи в лечении злокачественных новообразований различными режимами стандартной химиотерапии, их излечение до настоящего времени остается проблемой. Нарастивание доз цитостатических препаратов до субмаксимальных с целью полной эрадикации остаточных клеток опухолевого клона потребовало введения в клиническую практику метода трансплантации аллогенных или аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Традиционно считалось, что высокодозная химиотерапия является основным компонентом в процедуре ТГСК и трансплантация совместимых гемопоэтических стволовых клеток выполняется для заместительной терапии пациентов, получивших летальные дозы химиопрепаратов. Однако в последующем, через многие годы наблюдения, было установлено, что у части пациентов все равно возникал рецидив, причем частота рецидивов была выше у больных с аутологичной или сингенной (от однойяцевых близнецов) ТГСК по сравнению с аллогенной ТГСК. Наименьшая частота рецидивов отмечалась у пациентов с аллогенной трансплантацией, имевших проявления реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

Данный факт позволил предположить наличие у таких больных иммуноопосредованного эффекта «трансплантат против лейкемии» (ТПЛ), играющего ведущую роль в элиминации остаточных злокачественных клеток, «переживших» химио- или лучевую терапию. В дальнейшем это позволило сформулировать концепцию индукции эффекта «трансплантат против лейкемии» или «трансплантат против опухоли» инфузией донорских лимфоцитов после ТГСК.

Вероятность того, что аллогенные лимфоциты при ТГСК могут элиминировать лейкозные клетки благодаря иммуноопосредованному эффекту, ТПЛ предполагалась на основании полученных результатов экспериментальной и клинической ТГСК. Прямая корреляция между острой и хронической РТПХ и снижением частоты рецидивов лейкозов в клинической практике была впервые описана Р. Weiden и соавт. Эффект «трансплантат против опухоли» (ТПО), аналогичный эффекту ТПЛ, также был описан сначала в эксперименте у мышей со спонтанной саркомой, а затем и в клинике у пациентов с раком молочной железы. Роль иммуноопосредованного эффекта ТПЛ в течение ТГСК в дальнейшем была подтверждена наблюдениями, согласно которым, рецидивы, возникшие на фоне иммуносупрессивной терапии циклоспорином А (ЦСА), купировались при ее отмене. Было установлено также, что возникновение рецидивов уменьшалось у пациентов, получавших сниженные дозы ЦСА. Все эти данные свидетельствуют о том, что при аллогенной ТГСК иммунокомпетентные донорские Т-лимфоциты могут реагировать против остаточных опухолевых клеток. Таким образом, преимущество ТГСК перед стандартной химиотерапией заключается в комбинированном эффекте миелоаблативной дозы химио- или радиотерапии в предтрансплантационном периоде и в способности иммунокомпетентных аллогенных донорских Т-лимфоцитов элиминировать остаточные опухолевые клетки в результате эффекта ТПЛ или ТПО. Исходя из этого, возникло предположение, что инфузии донорских аллогенных лимфоцитов в посттрансплантационном периоде можно использовать для лечения или профилактики рецидивов у пациентов с высоким риском. Первая успешная инфузия донорских лимфоцитов (ИДЛ) была выполнена у двухлетнего ребенка с острым пре-В лимфобластным лейкозом в Иерусалиме в 1986 г.. В последующем этот метод лечения рецидивов после ТГСК стал применяться во многих клиниках мира у пациентов с острым лимфобластным (ОЛЛ) и миелобластным (ОМЛ) лейкозами, с хроническим миелолейкозом (ХМЛ), миелодиспластическим синдромом (МДС). Основываясь на экспериментальных данных, полученных на мышах, для лечения рецидивов в некоторых клиниках стали также использовать ИДЛ, активированные рекомбинантным интерлейкином-2 (рИЛ₂).

Учитывая данные об эффективности лечения ИДЛ у пациентов с «минимальной остаточной болезнью», в настоящее время настоятельно рекомендуется у пациентов высокого риска рецидива после трансплантации проводить частый регулярный мониторинг химеризма (маркеров ДНК донора и реципиента). Наряду с Т-лимфоцитами другие типы клеток также вовлечены в индукцию и реализацию эффекта ТПЛ. ЕК-клетки, моноциты, макрофаги оказывают противоопухолевый эффект, независимый от экспрессии антигенов гистосовместимости. В то же время известно, что многие опухолевые клетки, в частности метастатические, не экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости.

Как следует из результатов исследований, выполненных на мышах и в клинике, аллореактивные ЕК-клетки могут быть хорошими индукторами эффектов ТПЛ и ТПО без активации РТПХ. Таким образом, в настоящее время имеются экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о возможности полной эрадикации опухолевых клеток в посттрансплантационном периоде ИДЛ как при злокачественных заболеваниях системы крови, так и при солидных опухолях. При этом в лечении злокачественных заболеваний системы крови важная роль принадлежит аллореактивным Т-лимфоцитам.

1.4.2. Современное состояние иммунотерапии глиальных опухолей головного мозга

Оригинальную методику иммунотерапий глиальных опухолей предложили ученые из г. Санкт-Петербурга В.Е. (Олюшин, Г.С. Тиглиев, О.В. Острейко, М.В. Филатов, 2009), по технологии разработанной в РНХИ им. А.Л. Поленова, совместно с ПИЯФ им. Б.П. Константинова (заявка на изобретение “Способ лечения злокачественных опухолей головного мозга” от 17.08.2000, № 023265). Иммунотерапия осуществлялась у 6 пациентов с рецидивной глиобластомой следующим образом: во время хирургической операции забирали фрагмент опухоли не менее 1 см³, содержащий живые опухолевые клетки и не содержащий нормальные и некротизированные ткани. Опухоль помещали в стерильный раствор и передавали для изготовления антигенного материала в течение первых суток. Для приготовления антигена фрагмент опухоли облучают в дозе 200 Гр, диссоциировали на клетки. Полученные опухолевые клетки отмывали и разрушали путем повышения рН среды, в которой находятся клетки, до 11.5 с последующим понижением до 6.5. Полученный из них экстракт белков используют как антиген для предоставления дендритным клеткам. Перед каждым раундом лечения производят забор 40-60 мл периферической крови больного в шприц, содержащий раствор гепарина. Конечная концентрация гепарина 30 единиц на 1 мл. Кровь поступает на обработку не позднее 6 часов

после забора. Из взятой крови выделяют моноциты, которые культивируются в течение 7 дней с ростовыми факторами (гранулоцитарный-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор и интерлейкин-4 в количестве 1000 ед/мл) с постоянным контролем и сменой среды. На 6 день к дендритным клеткам добавляли приготовленный из опухоли данного больного антигенный материал, и в этот же день антигенный материал вводили внутрь полученных дендритных клеток с помощью электрического разряда (электропорация). Забор периферической крови для приготовления активированных лимфоцитов производили аналогично, как и для дендритных клеток, но в количестве 15-20 мл. Для приготовления активированных лимфоцитов из крови выделяли мононуклеарные лейкоциты, которые активировали к пролиферации с помощью фитогемагглютинаина и на 4 сутки вводили внутривенно. Цель процедур - активация возможно большего числа Т-лимфоцитов при преимущественной стимуляции Th-1 клеточного пути иммунного ответа. На 8 сутки больному вводили внутривенно дендритные клетки, при этом в растворе, содержащем дендритные клетки, находился лизат клеток опухоли больного. Количество вводимых клеток варьировали от 2×10^5 до 10^7 . Курс лечения состоял из трех инъекций активированных лимфоцитов и трех инъекций дендритных клеток. Интервал между курсами 2-3 месяца. Таким образом, иммунотерапия имела 3 составляющие: дендритные клетки, нагруженные опухолевыми антигенами, активированные аутологичные лимфоциты и лизат клеток опухоли. Все пациенты, включенные в данное исследование, живы. У больных, получающих иммунотерапию, интервал от начала специфической противоопухолевой иммунотерапии превысил интервал между последними операциями у 5 из 6 больных, у одного пациента он сравнялся. При этом у некоторых пациентов превышение интервала было весьма заметное - в 6-8 раз. Средний временной интервал от начала иммунотерапии до дня контрольного обследования составил 10.2 ± 3.1 месяцев. Исходное значение по шкале Карновского на момент начала иммунотерапии соответствовало от 40 до 80 баллов. Анализ изменений оценок по шкале показал, что за период лечения у 4 пациентов оценка понизилась на 10-20 баллов, у 1 пациента - повысилась на 10 баллов и у 1 пациента не изменилась.

Аналогичные исследования по иммунотерапии солидных опухолей метастазирующих в мозг проводились Джоном Яннелли (John R. Yannelli, Ph.D) из University of Kentucky, который работает в области иммунотерапии опухолей с 1985 года. Джон Яннелли с 2004 и 2005 г. пытается применить иммунотерапию у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Часто метастазирующим в головной мозг. Немелкоклеточный рак легкого - заболевание с плохим прогнозом и низким ответом на стандартную противоопухолевую терапию, поэтому возможности иммунотерапии для этого заболевания особенно интересны. В свое исследование Джон Яннелли включил 16 больных немелкоклеточным раком легкого I-IIIВ стадии. Все пациенты до иммунотерапии получали стандартные виды лечения (хирургическое или мультимодальное лечение). Исследователь также работает с иммунизированными дендритными клетками. Целью исследования было, получить иммунологический ответ больного на вакцину с дендритными клетками. John R. Yannelli задался вопросом: «Как можно увеличить иммунный ответ больного на вакцину?» Для этого, по его мнению, необходимо провести совместное культивирование дендритных клеток больного с «мертвыми» клетками опухоли. После такого культивирования дендритные клетки эффективнее стимулируют пролиферацию и дифференцировку антигенспецифических Т-лимфоцитов, тем самым инициируя сильный иммунный ответ на опухоль. В качестве опухолевых клеток-индукторов Джон Яннелли и его соавторы выбрали клеточную линию 1650: эта клеточная линия продуцирует большое количество опухолевых антигенов (Her2/neu, CEA, WT1, Mage2, и белок сюрвивин). Опухолевые клетки обрабатывались УФ-излучением для индукции апоптоза, а затем летальной дозой радиации (источник цезий-137). Препарат, полученный из умирающих клеток опухоли, добавляли в отношении 1/1 к культуре дендритных клеток больного для их стимуляции и «обучения».

Больные получали препарат из «обученных» дендритных клеток подкожно 2 раза (перерыв между прививками 1 месяц). Исследователи оценивали специфическую иммунологическую реакцию у больных: у 5 из 16 пациентов реакция не проявилась, у 5 - реакция была, но не специфичная к опухолевым антигенам, у 6 - наблюдалась специфическая иммунологическая реакция. Необходимо провести дальнейшие исследования этого протокола для формирования групп больных с наибольшей чувствительностью к вакцине и выяснения отдаленных результатов по каждой из групп. В целом, клинический протокол с использованием дендритных клеток больного очень перспективен, так как имеет относительно мало побочных эффектов и практически не снижает качество жизни больного.

Аналогичные данные применения дендритных вакцин и системного интратекального введения гемопоэтических аллогенных (близкородственных, гаплоидентичных) стволовых клеток

при глиальных опухолях головного мозга у 8 детей получила научная группа возглавляемая профессором Г.Л. Менткевич (I. Dolgoplov et al., 2010). Они продемонстрировали в Бостоне (США) результаты этой работы и получили полную поддержку международной онкологической общественности. Более того им удалось продлить выживаемость 3-х пациентов до 3.5 лет.

Комбинация различных подходов способна повысить ожидаемый эффект иммунотерапии. Например, в серии из 65 больных с глиобластомой и анапластической астроцитомой 3 ст. анаплазии пациенты получали интратекальные инъекции аутологических мононуклеаров, инкубированных с опухолевыми клетками в присутствии ИЛ-2 с последующими подкожными введениями комплекса цитокинов. Был отмечен существенный прирост 2-х летней выживаемости с 25,9% в контрольной группе до 50% в основной. При этом в 2 раза больше пациентов из основной группы оставались в ремиссии в течение 3 лет (Олешко М.И с соавт.2009).

Таким образом, принцип иммунотерапии нейроонкологических заболеваний заключается в терапии больных с опухолями мозга нативными или активированными иммунокомпетентными клетками пациента или гаплоидентичного донора в комбинации с различными цитокинами, а также производстве аутовакцин путем ко-культивирования клеток иммунной системы пациента с клетками (или их белками) его опухоли. В результате совместного культивирования Т-лимфоцитов с клетками опухоли пациента иммунные клетки приобретают новые противоопухолевые иммунные свойства и способны подавлять рост опухолевых клеток. За последнее десятилетие было показано, что иммунологическое взаимодействие между донорскими Т-лимфоцитами и опухолевыми клетками реципиента играют важную роль в терапии гематологических злокачественных заболеваний. К настоящему времени ясно так же, что рецидивы лейкозов, возникшие после аллогенной трансплантации, могут быть излечены путем трансфузии донорских лейкоцитов . Эти факты позволили предположить, что именно «реакция трансплантат против опухоли» (РТПО) является основным терапевтическим фактором при аллогенной трансплантации, а не высокие дозы химиопрепаратов, в комбинации с лучевой терапией или без нее, включенные в режим кондиционирования. При применении гаплоидентичных иммунокомпетентных клеток эффект «транспланта-против-опухоли» реализуется по двум направлениям: с помощью Т-лимфоцитов и НК-клеток. Диссонанс между малым количеством рецидивов при гаплоидентичной трансплантации по сравнению с HLA совместимыми трансплантациями может быть объяснен открытиями последних лет в области функционирования НК клеток и их роли в противоопухолевом иммунитете. При частично-совместимых трансплантациях происходит распознавание варианта HLAС детерминант (KIR2D рецепторов) НК клетками донора и реализуется прямой цитотоксический эффект.

Обобщая современные традиционные подходы к терапии опухолей мозга в современной нейронкологии можно отметить, что за последние годы удалось добиться некоторого позитивного клинического эффекта, однако это существенно не сказалось на выживаемости нейроонкологических пациентов. Сегодня доказано в эксперименте, что в норме иммунная система человека способна самостоятельно бороться с опухолевыми клетками, если их количество не превышает 500 000 опухолевых клеток. Однако, в настоящее время большинство исследователей убеждены, что данное количество (10^5) опухолевых клеток в здоровом организме человека обусловлено не только противоопухолевыми литическими возможностями его иммунной системы, но и её регуляторным воздействием на раковые стволовые клетки. Контроль пролиферативных свойств РСК иммунной системой осуществляется через здоровые гемопоэтические СК и предшественники гемопоэза, что неоднократно показано в работах гематологов. Нарушения регуляции и контроля РСК со стороны ГСК и ГПК приводит к возникновению опухолей или рецидивам злокачественной опухоли. Нарушение регуляторного контроля со стороны иммунной системы за клетками ниши РСК обуславливает генерацию новых опухолевых клеток (ОК).

1.5. Предпосылки и теоретическое обоснование создания данного протокола протеом- основанной персонализированной иммунотерапии глиальных опухолей головного мозга

Терапия онкологических болезней вообще и нейроонкологических заболеваний в частности, дело достаточно трудное и, как видно из представленных выше литературных данных, пока еще не очень благодарное. В мире не существует ни одного реального протокола терапии злокачественных опухолей мозга, при котором выживаемость этого контингента пациентов превысила бы 2 года.

Очевидно, что нельзя пренебрегать уже реально достигнутыми достижениями в терапии опухолей, которые, например, позволили только в США за последние 10 лет на 24,2 % повысить выживаемость онкологических пациентов за счет применения самых современных таргетных противоопухолевых химиопрепаратов. Современное нейрохирургическое лечение с использованием технологий интраоперационной флюоресценции опухоли мозга позволяет достаточно качественно и эффективно удалить максимальный объем опухолевых клеток. Общеизвестно, что хирургическое пособие позволяет уменьшить объем опухолевой клеточной массы у онкологического пациента до уровня 10^9 непластических клеток. Применение современных методов лучевой терапии, радиохирургии и химиотерапии способно обеспечить уменьшение клеточной опухолевой массы до уровня 10^7 клеток (Черных Е.Г., Ступак В.В., Центнер М.И. с соавт., 2004). Известно также, что собственные саногенетические возможности иммунной системы работают только при наличии в организме пациента количества опухолевых клеток не более 10^5 , то есть не превышающее 500 000 опухолевых клеток (А.И. Арчаков, 2010). Разрыв между саногенетическими возможностями иммунной системы организма человека при онкологическом процессе и терапевтическими возможностями классических методов противоопухолевой терапии составляет около 2 порядков опухолевых клеток (от 10^5 клеток до 10^7 клеток). Именно на иммунную терапию многие научные исследовательские группы, занимающиеся терапией опухолей мозга, возлагают основные надежды уничтожения этих 10^2 опухолевых клеток при злокачественном неопластическом процессе (Черных Е.Г. с соавт., 2006). В ряде случаев это действительно возможно и в настоящее время в 30 % -34,2% случаев иммунотерапией (ИТ) действительно удается добиться эффективного иммунного ответа при опухолях мозга и снижения ОК до уровня 10^3 , который позволяет существенно продлить жизнь этих пациентов.

Но иммунотерапия не является панацеей в нейроонкологии и имеет значительные ограничения при генерализованном опухолевом процессе и практически «не работает» при общей опухолевой клеточной массе, превышающей количество 10^7 клеток. В то же время, даже при максимальном уменьшении количества опухолевых клеток вследствие эффективной противоопухолевой иммунотерапии (ниже уровня 10^3 - 10^4 опухолевых клеток) в организме онкологического пациента остаются раковые стволовые клетки (РСК), являющиеся прародителями и причиной генерации всех ОК конкретного неопластического образования пациента. РСК способны, при благоприятных условиях, очень быстро восстановить критическую массу неопластических клеток злокачественного фенотипа. Регуляторные функции собственных ГСК и прогенеторов гемопоэза в значительной степени ограничены в условиях манифестации опухоли и они не способны адекватно управлять пролиферативными процессами в СК с мутациями, т.е. осуществлять регуляцию РСК. При этом, очень мало современных протоколов ИТ опухолей, которые рассматривают возможность терапевтического использования клеток самой иммунной системы пациента для воздействия на РСК. Существующие подходы к терапевтическому воздействию на РСК направлены на полное уничтожение РСК. Однако уничтожение РСК пока не принесло существенных результатов и вряд ли когда либо принесет, так как «стволовость» соматической клетки это наиболее оптимальная и универсальная форма выживания клетки в неблагоприятных условиях. Это в полной мере относится к РСК. Потенциальная возможность направленного воздействия иммунной системы на РСК опухоли связана с тем, что именно ГСК, являющаяся родоначальником иммунной системы пациента должны оказывать таргетное регуляторное воздействие на эффекторные функции (митоз, деление, миграция и т.д) РСК и управлять пролиферативными процессами в РСК (Bryukhovetskiy A.S. et al., 2011). Однако эти противоопухолевые функции ГСК и прогенеторов гемопоэза в условиях развития злокачественной опухоли ингибируются, но тем не менее в определенной мере все-таки сохраняются. В основу протокола нами положены доклинические исследования, выполненные на базе ФГБУ Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им В.П.Сербского Минздрава РФ, а также предыдущие клинические исследования специалистов ФГБУ РОНЦ РАМН им Н.Н.Блохина. Российские ученые из НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ РОНЦ РАМН под руководством профессора Г.Л.Менткевича (I. Dolgoplov et al. , 2010) доказали, что в результате иммунотерапии злокачественных глиальных опухолей мозга (глиобластом, астроцитом, глиом) дендритными вакцинами, полученных из биоптатов опухолей этих клеток и интратекальной трансфузией аллогенных гаплоидентичных гемопоэтических стволовых клеток удается добиться в 30 % трехлетней ремиссии при глиобластоме и повышение сроков выживаемости этих больных. Как показали I. Dolgoplov et al. (2010) при ПЭТ – исследовании головного мозга - злокачественная опухоль не исчезает полностью. Она продолжает существовать у больного в форме небольшого опухолевого очага, но её пролиферативный и метастатический потенциал резко ограничен. Возможно, что эта регуляция достигается именно регуляторным воздействием гаплоидентичных аллогенных ГСК и ГПК на РСК этих опухолей.

Становится очевидным, что все конвенциональные терапевтические подходы и на их базе созданные инновационные методы лечения опухолей мозга являются необходимыми и достаточно обоснованными при планировании современной противоопухолевой терапии, так как у них есть свой ограниченный и зачастую «фиксированный» уровень терапевтической эффективности, объективно снижающий общее количество опухолевых клеток (ОК) до определенных критических концентраций. По-видимому, они должны использоваться в каждом протоколе в рамках своего уже доказанного терапевтического ресурса. Нельзя в новых протоколах лечения отказываться от уже существующих достижений противоопухолевой терапии. Это методологически не верно, и теоретически не обосновано. Необходимо так формировать современные протоколы противоопухолевой терапии, что бы в них методологически просматривалась преемственность, своевременность и последовательность программного количественного уменьшения ОК в результате противоопухолевого лечения. Любой протокол противоопухолевой терапии должен в обязательном порядке содержать (1) конвенциональную хирургическую составляющую лечения, обеспечивающую максимальную элиминацию основной массы ОК (до 10^9 ОК) и (2) проведение морфологического, гистологического, иммунохимического, геномного и постгеномного анализа, (3) стандартную лучевую терапию в диапазоне до 60 Грей и (4) современную химиотерапию, обеспечивающих цитостатическое и цитотоксическое воздействие на ОК, расположенные вне зоны хирургической резекции. Это гарантирует уменьшение объема ОК до 10^7 - 10^6 . ИТ должна стать естественным и логичным продолжением обязательной системы современных противоопухолевых мероприятий, так как она позволяет завершить процесс количественного сокращения ОК в организме пациента до физиологически допустимого уровня ($<10^5$ ОК). Но также очевидно, что при концентрации ОК, ниже физиологически допустимого уровня $<10^5$, классическая ИТ не позволяет применить стандартные подходы современной активной и пассивной (адоптивной) ИТ (см. таблицу №1), широко используемые в современной онкологии. Основная задача иммунной системы при физиологических концентрациях ОК в организме пациента это регуляторная, т.е. управляющая и контролирующая уровень ОК. Однако, это не значит, что современные методы ИТ в принципе не приемлимы для регуляции ОК на этих уровнях их концентрации в организме онкологического пациента. ИТ в широком смысле этого понятия, это более ёмкий научно- клинический термин, чем только понимание ИТ как иммуностимуляция, иммуномодуляция или иммуносупрессия количества и (или) функций иммунокомпетентных клеток. ИТ опухолей в широком смысле этого понятия предполагает частичное или полное восстановление противоопухолевых регуляторных функций и свойств всей иммунной системы пациента. Частичное восстановление этих функций иммунная система способна реставрировать традиционными и инновационными методами активной и пассивной (адоптивной) ИТ или заместительным переливанием собственных мононуклеарных и СК пациента или путем мобилизации ГСК в периферической крови с использованием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. На основании собственных экспериментальных материалов мы установили, что однократное применение СК и КП человека позволяет использовать в терапевтических целях естественные противоопухолевые свойства прогениторных клеточных систем человека и дает возможность значительно (почти на 30%-50%) приостановить неопластический рост глиальной опухоли головного мозга у животных и человека (Брюховецкий А.С., 2011). Возможно, что системные иммунотерапевтические интратекальные введения СК и КП человека пациентам с глиобластомой смогут усилить потенциал противоопухолевой системы головного мозга, обеспечить определенный противоопухолевый клеточный ответ и позволят приостановить или замедлить скорость развития и распространения неопластического процесса. Возможно, они также способны запустить другой противоопухолевый иммунный механизм « трансплантат против опухоли» (Менткевич Г.Л.с соавт., 2010).

Другой путь частичного восстановления противоопухолевых свойств иммунной системы возможен за счет генетической модификации аутологичных иммунокомпетентных стволовых клеток для получения плюрипотентных индуцированных стволовых клеток (iPSC) или получения iPSC из стволовых клеток пуповинной крови. Несмотря на то, что источником получения iPSC являются аутологичные СК, в настоящее время доказано , что в этих клетках, в результате генных трансформаций, нарушаются механизмы гистосовместимости и они распознаются иммунной системой реципиента как чужеродные. К ним возникает типичная иммунная реакция отторжения клеточного трансплантата. Поэтому возможности применения этих технологий в современной нейроонкологии крайне ограничены.

Полное восстановление противоопухолевых функций сегодня возможно путем замены клеток иммунной системы пациента на HLA- совместимые донорские (аллогенные или гаплоидентичные) клетки иммунной системы, которые формируются в результате приживления донорских стромальных стволовых клеток костного мозга после процедуры высокодозной химиотерапии и последующей

трансплантации клеток костного мозга (ТККМ) или мобилизованных аллогенных или гаплоидентичных гемопоэтических СК донора. Также описаны успешные случаи полной замены иммунной системы реципиента на донорскую путем проведения операций ТККМ клетками пуповинной крови.

Именно полное восстановление противоопухолевых свойств иммунной системы путем глобальной замены её (технологии ТККМ) или частичной замены её системных элементов (применением iPSC) является достаточно понятным и методологически оправданным. Очевидно, что банальное изменение количества клеточных элементов иммунной системы пациента (иммуностимуляция, иммуномодуляция или иммуносупрессия), не может позволить добиться регуляции эффекторных функций ОК и контроля их количества. Необходимо не количественная, а качественная модификация аутологичных СК для обеспечения регуляции ОК клетками иммунной системы пациента.

Очевидно, что основные положения иммунологии опухолей в современной онкологии требуют уточнения в связи выявлением в последнее время целого ряда инноваций и особенностей картирования белков и протеомного профилирования (ПП) клеток опухолей и клеток иммунной системы различной степени дифференцировки у онкологических пациентов: от СК до высокодифференцированных иммунокомпетентных клеток. Выявленные при картировании и профилировании белков иммунокомпетентных и опухолевых клеток особенности позволяют по новому посмотреть на проблему иммунологии опухолей (Bryukhovetskiy A.S., 2012). Именно выявление этих закономерностей клинической онкопротеомики опухолевых клеток создало теоретические предпосылки для возникновения и развития представлений о ресторативной (от англ.- restore – восстанавливать) иммунотерапии. Этими особенностями ПП ОК являются следующие: 1) Клетки опухолей экспрессируют на поверхностной мембране антигены, отличающиеся от нормальных и хотя количество опухолевых антигенов в общей структуре ПП ОК составляет от 95 до 60% , представленность их на мембране напрямую зависит от степени дифференцированности ОК: чем выше степень дифференцировки, тем больше выявляется антигенная представленность онкоспецифических белков;. 2) На мембране Раковых СК (РСК) практически не содержится опухоле-специфичных антигенов и поэтому они практически не доступны иммунологическому контролю собственной иммунной системы; 3) Количество опухолеспецифичных антигенов на мембране ОК при неблагоприятных условиях (токсическое, механическое, ионизирующее воздействие) сокращается в разы за счет активации эволюционных процессов выживания путем дедифференцировки ОК, появлением признаков стволовости (потеря маркеров клеточной поверхности, ошаривание мембраны ОК, подавление основных эффекторных функций ОК, активация внутриклеточных репаративных процессов и репродуктивного потенциала), что значительно снижает возможности противоопухолевой регуляции собственными регионарными стволовыми клетками и иммунокомпетентными клетками; 4) недостаточность иммунной системы, наблюдаемая при экспериментальном канцерогенезе и предраковых заболеваниях человека обусловлена протеомной несовместимостью регуляторных иммунных клеточных систем с опухолевыми клетками, что является основной причиной потери контроля управления иммунокомпетентными клетками над регуляцией численности ОК и их эффекторными функциями ; 5) клинически выявляемый рост новообразований происходит вследствие не адекватности лечебных иммунотерапевтических мероприятий реальным иммунологическим процессам происходящим в организме онкологического пациента; 6) Иммуносупрессия, иммуномодуляция, иммуносупрессия как способы иммунотерапии опухолей могут быть эффективными только на ранних стадиях онкологического заболевания, а при прогрессивности процесса основные механизмы иммунокоррекции должны быть направлены на регуляцию функционального состояния РСК и прогенеторных ОК через сохранившиеся пути сигнальной трансдукции, 7) более высокая реактивность иммунной системы во время лечения будет зависеть от таргетности воздействия на РСК и правильности выбора на них протеомных антигенов –мишеней для терапевтической иммунокоррекции и иммунорегуляции.

Нами предложена дополнительная и частично альтернативная методология протеом – основанной персонализированной иммунотерапии опухолей ЦНС, основанная на базовых, фундаментальных принципах саногенеза и клеточных механизмах повышения местного противоопухолевого иммунитета мозга – ресторативная иммунотерапия. Этот вид иммунотерапии опухолей существует в клинике практически уже более 60 лет, но он рассматривался не в рамках иммунологии опухолей , а в рамках трансплантологии или точнее в рамках отдельной научной дисциплины – трансплантации костного мозга.

Очевидно, что достаточно большой объем опухолевой клеточной массы ($>10^7$ ОК) не позволяет получить требуемый противоопухолевый цитолитический эффект от проводимой иммунотерапии. Целесообразно рассматривать иммунотерапию не как самостоятельный вид противоопухолевой терапии, а как обязательное и логичное продолжение конвенционального подхода специфической противоопухолевой терапии. То есть любой курс противоопухолевого хирургического лечения, лучевой и химиотерапии опухоли должен заканчиваться обязательной иммунотерапией. Для усиления эффективности и персонализации проводимой иммунотерапии целесообразно использовать результаты картирования и профилирования белков ОК и РСК, выделенных из опухоли пациентов. Специфичность, индивидуальность и концентрация выявляемых белковых изменений в протеомных профилях ОК и РСК каждого пациента позволяет определить наиболее терапевтически значимые антигенные цели и мишени иммунотерапии, а также выявить не модифицированные неопластическим процессом мембранные белки, белки сигнальных путей и белки экспрессируемые генами, через которые можно осуществлять регуляцию эффекторных функций и количество РСК и ОК.

Диагностика наиболее индивидуально значимых иммуногенных онкоспецифических белков и белков-мишеней в РСК пациента, способных адекватно ответить на целенаправленное регуляторное воздействие осуществляется путем сравнительного картирования и профилирования всего спектра протеинов анализируемых опухолевых клеточных систем и прогенеторов гемопоэза. В дальнейшем это позволяет осуществить протеом – обоснованные персонализированные модификации фенотипа всех иммунокомпетентных клеток (дендритных клеток, ЦТЛ, ГСК) пациента, используемых для иммунотерапии, нагружая их дополнительными индивидуально значимыми для конкретного пациента высокоспецифичными онкоантигенами или регуляторными белками. Протеомная диагностика ОК, РСК и ГСК также дает возможность обнаружить белки-мишени в РСК и ОК, воздействие на которые позволяет регулировать эффекторные функции и функциональное состояние ОК и РСК. По существующим стандартным информационным «База данных белок-белковых взаимодействий» определяются основные протеины, способные оказать регуляторное и управляющее воздействие на белки-мишени в РСК и ОК. «Нагружая» этими (индивидуально подобранными по протеомному профилю) белками ГСК или региональные прогенеторные клетки пациента мы получаем аутологичные клеточные системы с ремоделированным протеомным профилем, способным оказать регуляторное воздействие на РСК пациента. Учитывая, тот факт, что мы используем в целях регуляции РСК и ОК трансплантацию собственных клеточных систем с неизменным геном, эти клетки по механизму хоуминга придут в опухоль и через заданный период времени (от 2 до 7 суток) освободятся от этих белков и эти протеины будут выделены в межклеточное пространство опухолевой ткани и окажут таргетное целенаправленное регуляторное воздействия на белки - мишени РСК и ОК. Это позволяет рассматривать проведение протеом-основанной иммунотерапии в нескольких базовых направлениях: 1. Активная специфическая иммунотерапия вакциной из аутологичных дендритных клеток, нагруженных не только недифференцированными опухолевыми антигенами и индивидуально значимыми опухолеспецифичными рекомбинантными белками, обеспечивающая более эффективное формирование иммунного ответа организма пациента на вводимые антигены и способствующая образованию таргетных цитотоксических лимфоцитов, 2. Индивидуализированная пассивная (адоптивная) специфическая иммунотерапия инфузией цитотоксическими лимфоцитами, обладающими специфическими противоопухолевыми детерминантами и приводящими к разрушению опухоли в организме реципиента. 3. Персонифицированная специфическая ресторативная иммунотерапия аллогенными гаплоидентичными или аутологичными СК с таргетно ремоделированным регуляторным протеомным профилем. Метод ремоделирования протеомного профиля запатентован в РФ (подана заявка на патент РФ). Основная цель специфической ресторативной иммунотерапии – восстановление противоопухолевых регуляторных функций собственных СК (антипролиферативных, антимиотических, антиангиогенных, антимиграционных функций и т.д.) в иммунной системе пациента и обеспечить регуляторное и управляющее воздействие их на функциональную эффекторную активность РСК пациента.

Все вышеизложенные соображения позволили нам предложить протокол исследования возможности мультивекторного иммунного воздействия на глиальное новообразования мозга у нейроонкологических пациентов.

Протокол создан для лечения пациентов с рецидивами и рефрактерными формами глиом головного мозга различной степени злокачественности. В исследование включаются пациенты, получившие не менее 1-ой линии конвенциональной комбинированной терапии. Перед началом терапии всем пациентам проводится комплексная диагностика для оценки размеров и распространенности опухоли, сбор мононуклеарных клеток крови (аутоМНК) на

клеточном сепараторе, а так же, обследование членов семьи и выбор из них оптимального донора аллогенных иммунокомпетентных клеток (алло ИК) с последующим сбором этих алло ИК на клеточном сепараторе после стимуляции кроветворения Г-КСФ. Пациентам, которым будет осуществлен забор опухолевого материала, будет проводиться протеомный анализ как опухолевых клеток, так и здоровых стволовых клеток. На первом этапе, всем больным будет проводиться иммунотерапия, включающая повторные интратекальные, интравентрикулярные или стереотаксические введения алло ИК от родственного HLA гаплоидентичного донора в комбинации с аутологичными дендритными противоопухолевыми вакцинами (ДВ). После первой оценки эффекта терапии, через 2 мес. от начала лечения, пациенты подразделяются на 3 группы в зависимости от динамики опухолевого процесса. При достижении полного, частичного эффекта или стабилизации процесса пациент продолжает получать ту же иммунотерапию, как и на первом этапе. При наличии прогрессии опухоли пациенты, которым был проведен протеомный анализ будут получать протеом- обоснованную терапию согласно его результатам. Если протеомный анализ у пациента не проводился, то при выявлении прогрессирования заболевания больной начинает получать предварительно культивированные *in vitro* аутологичные противоопухолевые цитотоксические лимфоциты в комбинации с аллогенными противоопухолевыми цитотоксическими лимфоцитами и продолжает получать ДВ.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью настоящего протокола является увеличение общей выживаемости пациентов с рецидивными и рефрактерными к терапии глиомами ЦНС.

Задачи исследования:

1. Изучить эффективность повторных введений донорских иммунокомпетентных клеток от близкородственного донора и аутологичной дендритной вакцины у больных с глиомами.
2. Изучить переносимость и побочные явления повторных введений иммунокомпетентных клеток напрямую в ЦНС пациента
3. Оценить иммуномодулирующий эффект вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных вакцин.
4. Разработать критерии оценки и прогнозирования формирования противоопухолевого иммунитета.
5. Изучить возможность проведения терапии глиом ЦНС терапии, основанной на протеомном анализе.
6. Изучить возможность и эффективность проведения терапии на базе выращенных *in vitro* специфических противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов.

3. ДИЗАЙН ПРОТОКОЛА

Протокол создан для лечения пациентов с рецидивами и рефрактерными формами глиом головного мозга различной степени злокачественности. В исследование включаются пациенты, получившие не менее 1-ой линии конвенциональной комбинированной терапии. Перед началом терапии всем пациентам проводится комплексная диагностика для оценки размеров и распространенности опухоли, сбор моноклеарных клеток крови (аутоМНК) на клеточном сепараторе, а также, обследование членов семьи и выбор из них оптимального донора аллогенных иммунокомпетентных клеток (алло ИК) с последующим сбором этих алло ИК на клеточном сепараторе после стимуляции кроветворения Г-КСФ. Пациентам, которым

будет осуществлен забор опухолевого материала, будет проводиться протеомный анализ как опухолевых клеток, так и здоровых стволовых клеток. На первом этапе, всем больным будет проводиться иммунотерапия, включающая повторные интратекальные, интравентрикулярные или стереотаксические введения алло ИК от родственного HLA гаплоидентичного донора в комбинации с аутологичными дендритными противоопухолевыми вакцинами (ДВ). После первой оценки эффекта терапии, через 2 мес. от начала лечения, пациенты подразделяются на 3 группы в зависимости от динамики опухолевого процесса. При достижении полного, частичного эффекта или стабилизации процесса пациент продолжает получать ту же иммунотерапию, как и на первом этапе. При наличии прогрессии опухоли пациенты, которым был проведен протеомный анализ будут получать протеом- обоснованную терапию согласно его результатам. Если протеомный анализ у пациента не проводился, то при выявлении прогрессирования заболевания больной начинает получать предварительно культивированные *in vitro* аутологичные противоопухолевые цитотоксические лимфоциты в комбинации с аллогенными противоопухолевыми цитотоксическими лимфоцитами и продолжает получать ДВ.

4. ВКЛЮЧЕНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЕ

В исследование включаются больные глиомами головного мозга:

1. рефрактерные к 1-ой и последующим конвенциональным линиям химиотерапии и лучевой терапии, , если невозможно их радикальное удаление.
2. рецидивы глиом после проведения не менее 1-ой линии конвенциональной химиотерапии и лучевой терапии, если невозможно их радикальное удаление.

3.1. КРИТЕРИИ ВКЛЮЧЕНИЯ:

- возраст 4-60 лет
- наличие морфологически подтвержденного первичного диагноза глиомы (при развитии рецидива и невозможности биопсии, диагноза, поставленного на основании радиологических и других методов исследования);
- наличие родственного HLA частично-совместимого донора
- ожидаемая продолжительность жизни без лечения не менее 3 мес.,
- отсутствие тяжелой декомпенсированной органной дисфункции (>3 ст. по NCI, см. Приложение 4).
- наличие подписанного информированного согласия пациента или родителей (и детей старше 15 лет) на лечение по данному протоколу,
- наличие подписанного информированного согласия донора иммунокомпетентных клеток.

3.2. КРИТЕРИИ НЕ ВКЛЮЧЕНИЯ:

- один из критериев включения не соблюден;

3.3. КРИТЕРИИ ИСКЛЮЧЕНИЯ ИЗ ПРОТОКОЛА

- Отказ родителей (больного) от продолжения терапии;
- Потеря из наблюдения,
- Смерть больного.

Больные, исключенные из протокола, продолжают наблюдаться в течение максимально возможного периода времени.

4. ОБСЛЕДОВАНИЕ

Обследование пациента проводится в течение 7-10 дней перед включением в протокол. Больной и потенциальный донор должны быть типированы по HLA I и II классам. Типирование проводится по HLA A, B серологическими методами и по HLA DRB1 методом ДНК-типирования.

4.1 ПАЦИЕНТ

4.1.1. ПЕРВИЧНОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ

4.1.1.1. Общее исследование

- физикальный осмотр и история заболевания;
- общий анализ крови+формула;
- определение содержания белка, билирубина, мочевины, креатинина, АСТ, АЛТ, ЛДГ, гамма-ГТ, ЩФ, Na⁺, K⁺, Ca⁺, Mg в сыворотке крови;
- коагулограмма;
- общий анализ мочи,
- рентгенография органов грудной клетки и придаточных пазух;
- рентгенологическое определение костного возраста;
- ЭКГ, ЭхоКГ
- ультразвуковое исследование органов брюшной полости; забрюшинного пространства и органов малого таза.
- консультация окулиста с осмотром глазного дна;

4.1.1.2 Специфические исследования

- оценка общего статуса по шкале Карновского (приложение 1);
- оценка неврологического статуса,
- МРТ головного мозга и спинного с и без контрастного усиления в 3-х проекциях и 3-х режимах (T1, T2 и Flair). В случаях, когда МРТ не может быть выполнена, необходимо выполнение КТ без и с контрастным усилением,
- спинномозговая пункция с исследованием ликвора, ликвородинамические пробы для определения проходимости ликворных пространств,
- ПЭТ головного мозга может быть выполнена для дифференциальной диагностики с лучевым некрозом при рецидивах глиом,
- **при возможности, пункция (биопсия) опухолевого очага с иммуногистохимическим исследованием и обязательной криоконсервацией опухолевой ткани для дальнейшего протеомного анализа (порядок забора и консервации см. Приложение 2).**

4.1.1.3. Трансфузиологическое обследование (по возможности не переливать продукты крови в течение не менее 2 недель перед исследованием)

- определение группы крови, резус фактора с фенотипом, группы крови по Kell.
- типирование по HLA A, B, DRB1

4.1.1.4. Исследование на инфекции

- серология: гепатиты С, ЦМВ (IgG и IgM), герпес вирусы I и II типов, VZV, ВИЧ, RW.
- HBs антиген,
- при наличии повышенных трансаминаз - ПЦР на гепатиты B, C, G, TTV.

Таблица 3. График обследований для периода основного исследования

Процедуры	Скрининг	Исходное обследование	Фаза проведения исследования		
			(День 1	Неделя 8	Неделя 16
Письменное информированное согласие	X				
Критерии включения/исключения	X				
Анамнез	X	X			
Физикальное обследование	X	X	X	X	X
Общее состояние по KPS	X	X	X	X	X
КТ с контрастным усилением	X	X			
Оценка неврологического статуса (рубрифицировано)	X	X	X	X	X
МРТ с контрастным усилением		X	X	X	X
Лабораторные исследования	X	X	X	x X	X
Рандомизация		X			

- МРТ с контрастным усилением с кратностью не реже 1 раза в 2 мес.
- Осмотр окулиста в динамике
- Общеклинические инструментально-лабораторные исследования

Гематология – гемоглобин, гематокрит, эритроциты, лейкоциты с лейкоцитарной формулой, тромбоциты

Биохимия сыворотки крови – общий белок, билирубин, АСТ, креатинин, мочевины, щелочная фосфатаза

Коагулограмма

Общий анализ мочи

Рентгенография органов грудной клетки и придаточных пазух

ЭКГ, функциональные респираторные тесты,

УЗИ органов брюшной полости

При рандомизации больных стратифицируют по следующим признакам.

Оценка общего состояния по Карновскому (менее 70 баллов – 70 и более баллов)

Вовлечение стволово-диэнцефальных образований (Да/Нет)

Максимальный размер опухолевого узла (до 4 см - 4 см и более)

Проведенная ранее циторедуктивная операция (да – нет)

Оценку общего состояния по ВОЗ и шкале Карновского проводят при скрининге, исходном обследовании и каждый месяц в период исследования.

Перед лечением и в период последующего наблюдения регистрируют следующие оценки:

Прогрессирование заболевания

Стабилизация заболевания

Лечебный эффект

Не установлено.

4.1.2. ОБСЛЕДОВАНИЕ НА ФОНЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ

4.1.2.1 Ежемесячно:

- оценка общего статуса по шкале Карновского;
- оценка неврологического статуса,
- определение иммунного статуса больного с оценкой клеточных популяций (СД3, СД7, СД4, СД8, СД19, СД20, СД56, СД16, HLA DR, СД25, СД34, СД38),

4.1.2.2. Контрольные обследования (первое-через 2 месяца от начала иммунотерапии, последующие с интервалом в 2-3 месяца либо при появлении признаков внутрисерепной гипертензии или прогрессирования опухоли)

- МРТ головного мозга с и без контрастного усиления в 3-х проекциях и 3-х режимах (T1, T2 и Flair). В случаях, когда МРТ не может быть выполнена, необходимо выполнение КТ без и с контрастным усилением.
- оценка общего статуса по шкале Карновского;
- оценка неврологического статуса,
- определение иммунного статуса больного с оценкой клеточных популяций (СД3, СД7, СД4, СД8, СД19, СД20, СД56, СД16, HLA DR, СД25, СД34, СД38),
- спинномозговая пункция с исследованием ликвора, ликвородинамические пробы для определения проходимости ликворных пространств,

Один раз в 3 месяца к ежемесячному обследованию может быть добавлена ЭЭГ.

Проведение ПЭТ головного мозга один раз в 3 месяца является желательным в рамках данного протокола.

4.2. ДОНОР

4.2.1. Общее исследование

- физикальный осмотр;
- общий анализ крови+формула;
- анализ мочи;
- определение содержания глюкозы, билирубина, мочевины, креатинина, АСТ, АЛТ, ЛДГ, кальция в сыворотке крови;
- рентгенография органов грудной клетки;
- ЭКГ;
- УЗИ брюшной полости с обязательной оценкой размеров селезенки в 3-х проекциях и определения объема селезенки,
- Консультация терапевта

4.2.2. Трансфузиологическое обследование

- определение группы крови, резус фактора с фенотипом, группы крови по Kell.
- типирование по HLA A, B, DRB1

4.2.3. Серология

- серология: гепатиты С, ЦМВ (IgG и IgM), ВИЧ, RW.
- HBs антиген
- при наличии повышенных трансаминаз - ПЦР на гепатиты В, С, G, TTV.

5. ПОДРОБНАЯ СХЕМА ПРОТОКОЛА

5.1. Оперативное вмешательство

Цели оперативного вмешательства: 1) получить гистологический материал для морфологической верификации опухоли, 2) получить тканевой материал для приготовления дендритной вакцины и протеомного анализа.

Показания к хирургическому лечению зависят от общего статуса пациента, расположения опухоли и ее хирургической доступности. Хирургическое удаление производится для максимально возможного уменьшения размеров опухоли с целью разрешения внутричерепной гипертензии и уменьшения неврологического дефицита и получения достаточного количества морфологического материала. Одновременно получают материал для приготовления дендритной индивидуальной вакцины (порядок забора, хранения и транспортировки материала см. приложение 3). Удаление опухоли должно быть как можно более полным, но без функционального риска. Для хирургического доступа стандартом является костно-пластическая трепанация. Удаление опухоли должно производиться с использованием микрохирургической техники и интраоперационной оптики. При завершении операции производится герметическое закрытие (пластика) дефекта твердой мозговой оболочкой.

Стереотаксическая биопсия используется в затруднительных случаях дифференциального диагноза, а так же в тех случаях, когда хирургическое удаление невозможно или нецелесообразно. Основным условием в данном протоколе является получение достаточного количества опухолевого материала.

Материал для проведения протеомного анализа опухолевой ткани пациента забирается, консервируется и транспортируется в лабораторию иммунохимии ФГБУ ГНЦССП им В.П. Сербского (ответственный к.м.н. Баклайшев В.П.) согласно Приложению 2.

5.2. Иммунотерапия

5.2.1. Первый этап (общий для всех пациентов протокола)

5.2.1.1. Сбор моноклеарных клеток крови пациента, содержащих фракцию стволовых клеток.

Сбор проводится на клеточном сепараторе с использованием одноразового комплекта магистралей для сбора лейкоцитов после консультации гематолога. Задача сбора- получить 250 мл сепарата, содержащего фракцию моноклеарных клеток крови. Венозный доступ осуществляется путем пункции 2-х периферических вен или через 2-х просветный центральный катетер, установленный в подключичную или бедренную вену на время проведения сеанса.

Сепарат в количестве 80-120 мл направляется в лабораторию экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИЭТДО ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН (ответственный к.м.н.Чкадуа Г.З.) для приготовления аутологичной дендритной вакцины. Остальную часть сепарата 80-130 мл отправляем в лабораторию иммунохимии ФГБУ ГНЦССП им В.П. Сербского (ответственный к.м.н. Баклайшев В.П.) для иммуносепарации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК CD34+CD 45+) , где из них будет сделан лизат , который будет направлен на протеомное исследование в лабораторию онкопротеомики ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН (ответственный д.б.н. Шевченко В.Е.)

5.2.1.2. Мобилизация и сбор иммунокомпетентных клеток крови у аллогенного донора.

После обследования аллогенного родственного донора и консультации гематолога принимается решение о сборе аллоИК. С целью увеличения количества аллоИК в периферической крови донор получает 8 инъекций гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), подкожно с интервалом в 10-12 часов в течение 4 дней. Г-КСФ представляет собой медицинский препарат, полученный путем генной инженерии, и является абсолютным аналогом человеческого фактора. В первые три дня разовая доза препарата составляет не менее 2,5 мкг на кг, в последний день разовая доза удваивается. Общий анализ крови берется на 4 день от начала стимуляции. Обследование донора осуществляется согласно разделу 4.2 настоящего протокола. Сбор аллоИК осуществляется на 5 день от начала стимуляции Г-КСФ на сепараторе крови с использованием одноразовой системы для сепарации и стандартных растворов. Длительность процедуры 2-3 часа в зависимости от скорости процедуры, веса донора и параметров анализа крови. Венозный доступ осуществляется путем пункции 2-х периферических вен или через 2-х просветный центральный катетер, установленный в подключичную или бедренную вену на время проведения сеанса. Процедура проводится путем забора крови из одной вены (просвета катетера), обработки ее внутри сепаратора, забора определенного объема стволовых клеток и возврата остальных компонентов крови донору через другую вену (просвет катетера). Средний объем собранного материала 300-500 мл. в зависимости от веса пациента.

После окончания сеанса лейкафереза, полученный цитоконцентрат делится из расчета $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ по объему. Три четверти цитоконцентрата отправляется в банк костного мозга ФГБУ РОНЦ РАМН (ответственный к.м.н. Мхеидзе Д.М.), где криоконсервируется в пробирках объемом по 4 мл. и хранится в банке костного мозга РОНЦ РАМН. Одна четверть по объему (но содержащую не менее 100×10^6 ядросодержащих клеток) направляется в лабораторию экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИЭТДО ФГБУ РОНЦ им

Н.Н.Блохина РАМН (ответственный к.м.н.Чкадуа Г.З.) для культивации и выделения дендритных клеток.

Собранный материал оценивается по общему количеству ядерных клеток (ЯК) в сепарате, количеству CD34⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD7⁺, CD16⁺, CD56⁺, HLADR, CD20 клеток. Содержание клеточных маркеров в клеточной суспензии, полученной в ходе цитафереза, определялся методом проточной цитофлуориметрии в лаборатории иммунологии гемопозза НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН(ответственный д.м.н. профессор Тупицын Н.Н.). **Оценка проводится после проведения манипуляций по обогащению цитоконцентрата и удалению из него зрелых клеток и плазмы.**

5.2.1.3 Криоконсервация

Для интратекальных трансфузий аллоИК материал замораживается в 20 пробирках по 4 мл согласно принятой в ФГБУ РОНЦ РАМН методике (отв. Заведующий банком костного мозга к.м.н. Мхеидзе Д.М.). Доза стволовых клеток составляет не менее 0.5×10^6 CD34⁺ на одно введение, а доза лимфоцитов не менее $0,5 \times 10^9$ на одно введение.

5.2.1.4. Приготовление дендритной вакцины.

Дендритные клетки культивируют из моноцитов периферической крови человека. Источником опухолевых антигенов является опухолевая ткань (хирургический материал). В клиническое отделение доставляют вакцину уже готовую к применению. Доставку суспензии нагруженных дендритных клеток производят в стерильных крио-пробирках (объемом 2 мл).

5.2.1.5. Интратекальные/интравентрикулярные введения алло ИК и назначение дендритной вакцины.

Интратекальные/интравентрикулярные введения могут осуществляться путем пункции в L4-L5 промежутках иглой 16-18 G (приложение 4), резервуар Омайо или непосредственно через установленный в ложе опухоли катетер.

Первое интратекальное/интравентрикулярное введение аллоИК пациенту производится на следующий день после сбора аллоИК у донора (при отсутствии противопоказаний). Готовый препарат стволовых клеток для введения в спинномозговой канал имеет объем 3 мл, представляет собой стерильную бледно-розовую, опалесцирующую клеточную суспензию, взвешенную в 0,9% растворе NaCl. Терапия осуществляется путем интратекального, интравентрикулярного или прямого интратуморального введения. Введения осуществляются после разморозки и отмывки иммунокомпетентных клеток от ДМСО. Криоконсервированные стволовые клетки в пробирке по 4 мл. размораживаются в водяной бане при температуре 38⁰С в течение 10 мин. Затем дважды отмываются от криоконсерванта и ресуспензируются в растворе 0,9% NaCl.

Введения аллоИК осуществляется с интервалом в 2 недели в течение первых 2 месяцев (всего 5 введений, на дни 1, 14, 28, 42, 56).

5.2.1.6. Введение дендритной вакцины.

На фоне проведения иммунотерапии обязательно назначение мелоксикама (Мовалис) в дозе

До 30 кг 3,75 мг Мовалиса 1 раз в день

Более 30 кг 7,5 мг Мовалиса 1 раз в день,

Препарат назначается за 7 дней до начала иммунотерапии и продолжается ежедневно на протяжении всего периода иммунотерапии.

Введение дендритной вакцины осуществляется по мере ее приготовления (срок приготовления ДВ 10-14 дней). Первое введение ДВ производится на д+14 (совместно со 2-ым

введением аллоИК) от начала протокола иммунотерапии. ДВ вводится внутривенно в 4 различные точки (области плеча и передней брюшной стенки на уровне пупка). Планируется на первом этапе 3 введения с интервалом в 2 недели (дни 14, 28, 42),

5.2.1.7. После 3-х введений ДВ и развития у пациента в месте вакцинации реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у всех пациентов производится забор 100-150 мл крови с целью выделения фракции лимфоцитов и наращивания аутологических цитотоксических лимфоцитов (аутоЦТЛ). Кровь забирается в емкости с 1000 ед. гепарина и направляется в лабораторию экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИЭТДО ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН (ответственный к.м.н.Чкадуа Г.З.)

5.2.1.8. Оценка токсичности и эффективности вакцинотерапии:

Оценка токсичности вакцинотерапии будет проводиться по критериям CTC-NCIC. Оценка эффективности вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками будет осуществляться согласно стандартным критериям эффективности терапии.

5.2.1.9. Оценка эффекта первого этапа иммунотерапии.

Оценка эффективности первого этапа проводится после обследования см. пункт 4.1.2.2. После оценки эффекта пациенты переходят на второй этап терапии.

Оценка эффективности проводится согласно следующим критериям:

- 1) Полный эффект - полное исчезновение всех опухолевых очагов.
- 2) Частичный эффект- уменьшение размеров опухоли и/или метастатических очагов, если таковые имеются, не менее чем на 50%, при отсутствии появления новых очагов.
- 3) Стабилизация процесса- уменьшение размеров опухолевых очагов менее, чем на 50% при отсутствии появления новых очагов.
- 4) Прогрессия процесса – рост опухолевых очагов на фоне терапии.

При мозаичном ответе, когда часть очагов прогрессирует, а часть находится в стабильном состоянии или уменьшается- терапия продолжается, но больные анализируются отдельно, вне контекста «Ответ на терапию».

5.2.2. ВТОРОЙ ЭТАП ИММУНОТЕРАПИИ

5.2.2.1. Полный, частичный ответ или стабилизация заболевания.

Пациенты продолжают иммунотерапию ДВ и аллоИК.

ДВ- назначаются с интервалом 1 раз в месяц внутривенно в течение не менее, чем, 1 года. Введения алло ИК осуществляются 1 раз в месяц интратекально/интравентрикулярно (см. пункт 5.2.1.5) в течение не менее 1 года.

Контроль за результатами терапии осуществляется согласно пункту 4.1.2.

5.2.2.2. Прогрессирование заболевания.

При прогрессировании заболевания, подтвержденному инструментальными методами, пациенты делятся на 2 группы.

5.2.2.2.1 Группа иммунотерапии, 2-ая линия (контрольная группа)

В нее входят пациенты, получившие первую линию иммунотерапии, у которых при контрольном обследовании констатировано прогрессирование заболевания и которые не были включены в группу протеомного анализа по тем или иным причинам (отсутствие опухолевого материала, забранного при включении в данный протокол, отказ пациента и т.п.). Все

пациенты этой группы получили на первом этапе 3 ДВ и 5 введений аллоИК, у них развилась реакция ГЗТ и был осуществлен забор лимфоцитов после 3-х введений ДВ. Необходимым условием является наличие аутологичных и аллогенных цитотоксических лимфоцитов, выращенных *in vitro*. Интервал от завершения обследования после первого этапа иммунотерапии до начала второго этапа должен составлять не более 3 недель. Аллогенные и аутологичные ЦТЛ готовятся на основе аутологичных дендритных вакцин пациента.

Пациентам этой группы будет продолжено введение дендритных вакцин с интервалом 1 раз в 2 недели первые 3 месяца, затем с интервалом 1 раз в месяц. Также пациенты получают аллоЦТЛ интратекально/интравентрикулярно с интервалом 1 раз в 2 недели, первые 3 месяца, затем с интервалом 1 раз в месяц, и аутоЦТЛ внутривенно, струйно, медленно с интервалом 1 раз в 2 недели, первые 3 месяца, затем с интервалом 1 раз в месяц.

Оценка эффективности первого этапа проводится после обследования см. пункт 4.1.2.2.

5.2.2.2.2. Группа протеом-основанной иммунотерапии (основная группа)

В эту группу входят пациенты, прогрессирующие на первой линии иммунотерапии, которым был проведен протеомный анализ опухолевых и здоровых стволовых клеток, созданы протеом –модифицированные клеточные системы, показана их биологическая эффективность *in vitro* с культурой опухолевых клеток больного.

5.2.2.2.2.1. Первый этап

- Повторный сбор моноклеарных клеток крови пациента, содержащих фракцию стволовых клеток.

Сбор проводится на клеточном сепараторе с использованием одноразового комплекта магистралей для сбора лейкоцитов после консультации гематолога. Задача сбора- получить максимальное количество (1.5-2 литра) сепарата, содержащего фракцию моноклеарных клеток крови. Венозный доступ осуществляется путем пункции 2-х периферических вен или через 2-х просветный центральный катетер, установленный в подключичную или бедренную вену на время проведения сеанса.

Собраный материал оценивается по общему количеству ядерных клеток (ЯК) в сепарате, количеству CD34⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD7⁺, CD16⁺, CD56⁺, HLADR, CD20 клеток. Содержание клеточных маркеров в клеточной суспензии, полученной в ходе цитафереза, определялся методом проточной цитофлуориметрии в лаборатории иммунологии гемопозеза НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН(ответственный д.м.н. профессор Тупицын Н.Н.). Оценка проводится после проведения манипуляций по обогащению цитоконцентрата и удалению из него зрелых клеток и плазмы.

- Производство протеом-модифицированных клеточных систем: Сепарат в количестве 500 мл направляется в лабораторию экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИЭТДО ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН (ответственный к.м.н.Чкадуа Г.З.) для приготовления персонифицированной протеом-модифицированной аутологичной дендритной вакцины (пмДВ) и протеом- модифицированных цитотоксических лимфоцитов (пмЦТЛ). Остальную часть сепарата 1000 мл и более отправляем в лабораторию иммунохимии ФГБУ ГНЦССП им В.П. Сербского (ответственный к.м.н. Баклаушев В.П.) для иммуносепарации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК CD34+CD 45+) , где из них будет сделан клеточный препарат протеом-модифицированный ГСК.

После окончания производства протеом –модифицированных ГСК, полученный препарат делится из расчета $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ по объему. Три четверти препарата отправляется в клеточный банк лабораторию иммунохимии ФГБУ ГНЦССП им В.П. Сербского (ответственный к.м.н. Баклаушев В.П.), где криоконсервируется в пробирках объемом по 4 мл.

и хранится в жидком азоте при температуре -196 градусов. Одна четверть по объему (но содержащую не менее 100×10^6 ядросодержащих клеток) направляется в лабораторию экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИЭТДО ФГБУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН (ответственный к.м.н. Чкадуа Г.З.) для культивации и выделения протеом-модифицированных дендритных клеток (пмДК) и протеом-модифицированных цитотоксических лимфоцитов (пмЦТЛ).

5.2.1.3 Криоконсервация

Весь протеом модифицированный клеточный материал замораживается согласно принятой в ФГБУ РОНЦ РАМН методике (отв. Заведующий банком костного мозга к.м.н. Мхеидзе Д.М.). Доза стволовых клеток составляет не менее 0.5×10^6 CD34+ на одно введение, а доза лимфоцитов не менее $0,5 \times 10^9$ на одно введение.

5.2.1.4. Приготовление протеом-модифицированной дендритной вакцины.

Дендритные клетки культивируют из моноцитов периферической крови человека. В культуральную среду с моноцитами периферической крови добавляют наиболее функционально значимые антигены - онкоспецифичные белки, выявленные при сравнительном анализе протеомного профиля РСК(глиомасфер) и нейтральными стволовыми клетками пациента (НСК), в результате чего культивируемые клеточные системы дополнительно «нагружаются» опухолеспецифичными антигенами. Источником протеом-обоснованных опухолевых антигенов является не только опухолевая ткань (хирургический материал), но и рекомбинантные белки –антигены закупаемые по каталогам фирм производителей. В клиническое отделение доставляют вакцину уже готовую к применению. Доставку суспензии нагруженных дендритных клеток производят в стерильных крио-пробирках (объемом 2 мл).

5.2.2.2.2. Второй этап протеом-основанной иммунотерапии

5.2.1.5. Интратекральные/интравентрикулярные введения протеом-модифицированных ГСК и назначение протеом-модифицированной дендритной вакцины.

Интратекральные/интравентрикулярные введения могут осуществляться путем пункции в L4-L5 промежутках иглой 16-18 G (приложение 4), резервуар Омайо или непосредственно через установленный в ложе опухоли катетер.

Первое интратекральное/интравентрикулярное введение пмГСК пациенту производится сразу при начале проведения 2 линии терапии (при отсутствии противопоказаний). Готовый препарат протеом-модифицированных стволовых клеток для введения в спинномозговой канал имеет объем 3 мл, представляет собой стерильную бледно-розовую, опалесцирующую клеточную суспензию, взвешенную в 0,9% растворе NaCl. Терапия осуществляется путем интратекрального, интравентрикулярного или прямого интратуморального введения. Введения осуществляются после разморозки и отмывки иммунокомпетентных клеток от ДМСО. Криоконсервированные стволовые клетки в пробирке по 4 мл. размораживаются в водяной бане при температуре 38°C в течение 10 мин. Затем дважды отмываются от криоконсерванта и ресуспензируются в растворе 0,9% NaCl.

Введения пмГСК осуществляется с интервалом в 2 недели в течение первых 2 месяцев (всего 5 введений, на дни 1, 14, 28, 42, 56).

5.2.1.6. Введение протеом-модифицированной дендритной вакцины.

На фоне проведения иммунотерапии обязательно назначение мелоксикама (Мовалис) в дозе

До 30 кг 3,75 мг Мовалиса 1 раз в день

Более 30 кг – 7,5 мг Мовалиса 1 раз в день,

Препарат назначается за 7 дней до начала иммунотерапии и продолжается ежедневно на протяжении всего периода иммунотерапии.

Введение протеом-модифицированной дендритной вакцины осуществляется по мере ее приготовления (срок приготовления ДВ 10-14 дней). Первое введение пмДВ производится на д+14 от начала проведения 2-й линии терапии (совместно со 2-ым введением пмГСК) от начала протокола иммунотерапии. пмДВ вводится внутривенно в 4 различные точки (области плеча и передней брюшной стенки на уровне пупка). Планируется на первом этапе 3 введения с интервалом в 2 недели (дни 14, 28, 42 от начала проведения 2-й линии терапии) ,

5.2.1.7. Производство и применение протеом-модифицированных цитотоксических лимфоцитов.

После 3-х введений пмДВ и развития у пациента в месте вакцинаций реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у всех пациентов производится забор 100-150 мл крови с целью выделения фракции лимфоцитов и наращивания аутологических цитотоксических лимфоцитов (пм-аутоЦТЛ). Кровь забирается в емкости с 1000 ед. гепарина и направляется в лабораторию экспериментальной диагностики и терапии опухолей НИИЭТДО ФГБУ РОНЦ им Н.Н.Блохина РАМН (ответственный к.м.н.Чкадуа Г.З.) Также пациенты получают пм-аутоЦТЛ интратекально/интравентрикулярно с интервалом 1 раз в 2 недели, первые 3 месяца, затем с интервалом 1 раз в месяц.

5.2.1.8. Оценка токсичности и эффективности вакцинотерапии пмДВ:

Оценка токсичности вакцинотерапии будет проводиться по критериям CTC-NCIC. Оценка эффективности вакцинотерапии протеом-модифицированными аутологичными дендритными клетками будет осуществляться согласно стандартным критериям эффективности терапии.

5.2.1.9. Оценка эффекта второго этапа иммунотерапии.

Оценка эффективности второго этапа проводится после обследования см. пункт 4.1.2.2. После оценки эффекта пациенты переходят на третий этап терапии.

Оценка эффективности проводится согласно следующим критериям:

- 1) Полный эффект - полное исчезновение всех опухолевых очагов.
- 2) Частичный эффект- уменьшение размеров опухоли и/или метастатических очагов, если таковые имеются, не менее чем на 50%, при отсутствии появления новых очагов.
- 3) Стабилизация процесса- уменьшение размеров опухолевых очагов менее, чем на 50% при отсутствии появления новых очагов.
- 4) Прогрессия процесса – рост опухолевых очагов на фоне терапии.

При мозаичном ответе, когда часть очагов прогрессирует, а часть находится в стабильном состоянии или уменьшается- терапия продолжается, но больные анализируются отдельно, вне контекста «Ответ на терапию».

6. ПРЕПАРАТЫ И ДОЗЫ

6.1. Гранулоцитарный Колониестимулирующий Фактор

6.1.1. Филграстим (Нейпоген[®], Лейкостим[®], Грасальва[®])

Рекомбинантный человеческий негликозилированный Г-КСФ.

Хранить в холодильнике при температуре +4-+8⁰С, не замораживать, при разведении сильно не встряхивать. Раствор стабилен 7 суток при комнатной температуре. **Разводить только в 5% глюкозе.** После разведения в 5% глюкозе раствор стабилен 24 часа, если концентрация филграстима ≥ 15 мкг/мл. Если концентрация < 15мкг/мл необходимо добавить человеческий альбумин в концентрации 2 мг/мл, альбумин добавляется в раствор 5% глюкозы до введения во флакон филграстима, раствор стабилен 24 часа. Концентрация менее 5 мкг/мл не рекомендуется. Максимальная концентрация в растворе 300 мкг/мл.

Вводится внутривенно струйно или капельно (15-30 минут), в виде длительной инфузии (4-6 часов) или 24-часовой инфузии или подкожно.

Форма выпуска: флаконы с разведенным препаратом 300 мкг (1 мл), 480 мкг (1,6 мл). Шприцы, готовые к употреблению 300 мкг (1 мл).

6.1.2. Ленограстим (Граноцит[®])

Рекомбинантный человеческий гликозилированный Г-КСФ.

Хранить в холодильнике при температуре +4-+8⁰С, не замораживать. Развести в прилагаемом растворителе, затем в 5% глюкозе или 0,9% NaCl. Концентрация ленограстима в конечном растворе для инфузии не менее 3 мкг/мл. Раствор стабилен в течение 24 часов при комнатной температуре.

Вводится внутривенно струйно или капельно (15-30 минут), в виде длительной инфузии (4-6 часов) или 24-часовой инфузии, или подкожно.

Форма выпуска: флаконы с сухим веществом 105 мкг (13,4 млн. МЕ), 263 мкг (33,6 млн. МЕ).

6.2. Милоксикам (Мовалис[®])

Фармакологическое действие

НПВС. Относится к классу оксикамов, является производным еноловой кислоты. Оказывает противовоспалительное, анальгезирующее и жаропонижающее действие, обусловленное способностью Мовалиса ингибировать биосинтез простагландинов, являющихся медиаторами воспаления. Механизм действия связан с селективным ингибированием ЦОГ-2 - специфического фермента, участвующего в развитии процессов воспаления.

Побочное действие

Со стороны пищеварительной системы: >1% - диспепсия, тошнота, рвота, боли в животе, запор, метеоризм, диарея; 0.1-1% - преходящие изменения показателей функции печени (в т.ч. повышение уровня трансаминаз или билирубина), отрыжка, эзофагит, язвенные поражения ЖКТ, скрытое или макроскопически видимое желудочно-кишечное кровотечение; <0.1% - перфорация ЖКТ, колит, гастрит. *Со стороны системы кроветворения:* >1% - анемия; 0.1-1% - изменение гемограммы, в т.ч. изменение количества отдельных типов лейкоцитов, лейкопения, тромбоцитопения. *Дерматологические реакции:* >1% - зуд, сыпь; 0.1-1% - стоматит, крапивница; < 0.1% - фотосенсибилизация. *Аллергические реакции:* в отдельных случаях - буллезные реакции, мультиформная эритема, синдром Стивенса-Джонсона, токсический эпидермальный некролиз. *Со стороны дыхательной системы:* <0.1% - острые приступы бронхиальной астмы. *Со стороны нервной системы:* >1% - головная боль; 0.1-1% - головокружение, шум в ушах, сонливость; <0.1% - нарушение ориентации, изменение настроения.

Со стороны сердечно-сосудистой системы: >1% - отеки; 0.1-1% - повышение АД, сердцебиение, приливы. *Со стороны мочевыделительной системы:* 0.1-1% - изменение показателей функции почек (повышение уровня креатинина и/или мочевины в крови); менее 0.1% - острая почечная недостаточность; в отдельных случаях - интерстициальный нефрит, гломерулонефрит, почечный медуллярный некроз, нефротический синдром. *Со стороны органа зрения:* <0.1% - конъюнктивит, зрительные нарушения, в т.ч. нечеткость зрения. *Аллергические реакции:* <0.1% - ангионевротический отек, реакции гиперчувствительности немедленного типа, включая анафилактоидные и анафилактические.

Условия и сроки хранения

Препарат следует хранить в защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C. Срок хранения - 5 лет.

Состав и форма выпуска *Мовалис* таблетки: 1 таблетка содержит мелоксикама 7,5 или 15 мг

7. ОСЛОЖНЕНИЯ ТЕРАПИИ

7.1. Постпункционный синдром

Клиническая картина: головная боль, тошнота, рвота, корешковые боль в нижних конечностях, боль в спине.

Специфической терапии не существует, проводится исключительно симптоматическая терапия. Если имеется подтекание спинномозговой жидкости из места пункции требуется консультация нейрохирурга/невропатолога. Профилактика заключается в соблюдении постельного режима в течение 24 часов после спинномозговой пункции.

7.2. Гриппоподобный синдром

Клиническая картина: головная и мышечно-суставная боль, субфебрильная температура, астенический синдром.

Лечение заключается в приеме нестероидных, противовоспалительных препаратов.

Градация клинического статуса осуществляется по NCI с учетом индекса Карновского

Критерии	индекс
Норма	100
Незначительные признаки заболевания, нормальная активность	90
Нормальная активность с усилием, некоторые симптомы заболевания	80
Способность осуществлять уход за собой. Неспособность работать.	70
Потребность в эпизодической посторонней помощи. Редкое обращение за медицинской помощью	60
Потребность в частой посторонней помощи. Частое обращение за мед. Помощью	50
Инвалидность. Специализированная помощь	40
Глубокая инвалидность, госпитализация	30
Активная поддерживающая терапия в условиях стационара	20
Реанимационные мероприятия	10
Смерть	0

Градация клинического статуса осуществляется по NCI с учетом индекса Лански*

Критерии	индекс
Норма	100
Малые ограничения в нормальной активности	90
Активен, но устает более быстро	80
Значительное ограничение игровой активности и/или ограничение времени, проводимого за игрой	70
Минимальная игровая активность, предпочитает более спокойные игры	60
Одевается самостоятельно, но большую часть времени проводит в постели, нет активных игр, способен участвовать в спокойных играх.	50
В основном в кровати. Спокойные игры.	40
В постели. Требуется помощь при спокойных играх.	30
Сонливость. Игровая активность резко ограничена	20

Сопор	10
Смерть	0

*-у детей до 14 лет предпочтительно пользоваться шкалой Лански

Градация (по NCI)	0	1	2	3	4
Статус(% Лански /Карновского)	Норма (90-100)	Небольшое ограничение (70-<90)	50-<70%	30-<50%	<30%

ПОРЯДОК ЗАБОРА И ТРАНСПОРТИРОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПРОТЕОМНОГО ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Всем пациентам осуществляется стереотаксическая биопсия опухолевого узла с последующей цитологией и гистологическим исследованием биоптата в отделении патоморфологии РОНЦ РАМН им.Н.Н.Блохина. При сомнении в результатах исследования парафиновые блоки с биоптатом могут быть направлены на дообследование в НИИ нейрохирургии РАМН им.Н.Н.Бурденко. Часть полученного стереоскопического биоптата отправляется в Лабораторию иммунохимии ФГБУ ГНЦССП им.В.П.Сербского для культивирования и выделения раковых стволовых клеток (глиомасфер) из биоптата опухоли. Всем пациентам осуществляется сбор мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток и нейроэндоскопический забор обонятельной выстилки носа в ЗАО Клиника «НейроВита». Собранные гемопоэтические стволовые клетки пациента стандартизируются, сертифицируются в Банке костного мозга ФГБУ РОНЦ РАМН им.Н.Н.Блохина. Аналогичная процедура с нейральными стволовыми клетками осуществляется в ФГБУ ГНЦССП им. В.П.Сербского. Детальные протоколы этих работ имеются в соответствующих лабораториях. Выделенные раковые стволовые клетки из глиобластомы (глиомасферы) делятся на 2 части. Первая часть РСК и ЗСК направляются на протеомный анализ в ФГУ НИИ биохимической медицины РАМН им В.А.Ореховича или лабораторию онкопротеомики НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН им.Н.Н.Блохина. Туда же представляются культуры здоровых гемопоэтических CD34+ стволовых клеток. Протокол сравнительного протеомного анализа РСК и ГСК или МСК пациентов имеется в лабораториях. Вторая часть культуры глиомасфер направляется в иммунохимическую лабораторию ФГБУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П.Сербского». Туда также же представляются культуры здоровых гемопоэтических CD34+ стволовых клеток и культуры нейральных стволовых клеток данного пациента. В лабораторных условиях ФГБУ « Научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П.Сербского» осуществляется культивирование РСК или НСК, ГСК или МСК их выделение путем иммуносортинга, получается лизат который передается в лабораторию онкопротеомики НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН им.Н.Н.Блохина.

ПОРЯДОК ЗАБОРА, ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ ОПУХОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДЕНДРИТНЫХ ВАКЦИН.

Метод забора и транспортировки опухолевого материала

1. Контейнер с питательной средой (прозрачная жидкость красного цвета) до внесения в него опухолевого материала следует хранить в холодильнике.
2. Опухолевая ткань должна быть не менее 2 см³, при этом должны быть иссечены нормальная ткань и зоны некрозов.
3. Заполнить сопроводительный листок.
4. Опухолевый материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 6 часов с момента иссечения опухоли и помещения ее в контейнер.
5. В случае помутнения питательной среды в контейнере его следует выбросить.

Адрес лаборатории и контактный телефон:

Лаборатория иммунохимии ФГБУ ГНЦССП им В.П.Сербского Москва ул. Кропоткинская д.23 тел. 8- 903- 720-84- 55

Лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИДиТО ФГБУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, Москва Каширское шоссе д. 24 , тел 8 -903-171-38-62

ПОКАЗАНИЯ, ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ И МЕТОДИКА ЛЮМБАЛЬНОЙ ПУНКЦИИ

Показания:

1. получение спинномозговой жидкости (СМЖ) для исследования
2. измерения ликворного давления
3. введение в спинномозговой канал контрастных или лекарственных препаратов.
4. выведение спинномозговой жидкости

Противопоказания :

1. несообщающаяся гидроцефалия
 2. установленный объёмный процесс (опухоль, абсцесс, гематома)
 3. коагулопатия или число тромбоцитов менее 50×10^3 /мкл
 4. воспалительный процесс в области пункции
- 0

Положение пациента:

Лёжа на боку с приведёнными к грудной клетке коленями, наклонённой вперёд головой.

Техника поведения:

Под местным обезболиванием 1% раствором лидокаина, спинальной иглой для пункции с мандреном, калибра 22, 20 или 18, в промежутках L3-L4 или L4-L5, остриём среза иглы направленного вверх, под углом в 10^0 - 15^0 в сагиттальной плоскости проводится пункция спинномозгового канала.

При получении СМЖ производится измерение давления в см H₂O.

Для определения клеточного состава – 3 мл.

СМЖ набирается в пробирки:

- 1.
2. для определения содержания белка и глюкозы – 3мл
3. для определения микрофлоры и её чувствительности – 3 мл
4. для определения клеточного состава (цитология) – 3 мл
5. _____

Место пункции прикрывается стерильной салфеткой.

Контролируется состояние сознания, витальных функций, размер зрачков, и их реакция.

Возможные осложнения:

1. вкливание мозга (дислокация). Может проявиться унилатеральным расширением зрачка, изменением сознания, триадой Cushing (гипертензия, брадикардия, урежение частоты дыхания).
2. повреждение нервного корешка (острая боль, иррадирующая вниз по ноге).
3. головная боль.

Приложение 5

СОГЛАШЕНИЕ О ДОНОРСТВЕ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Иммунокомпетентные и гемопоэтические стволовые клетки крови (или клетки - предшественницы кроветворения) содержатся в костном мозге и в периферической крови. Количество иммунокомпетентных и стволовых клеток у человека во много раз превышает его физиологические потребности, и донорство части из них не оказывает влияния на дальнейшее функционирование кроветворной и иммунной систем. Существует два способа получения этих иммунокомпетентных и стволовых клеток. Несколько лет назад гемопоэтические клетки получали только из костного мозга, который содержится в плоских костях. Эта процедура проводится в условиях операционной, под общим наркозом или перидуральной анестезией. В настоящее время в практику внедрен более совершенный способ получения иммунокомпетентных и стволовых клеток у донора - из периферической крови. Подъем лейкоцитов, необходимый для начала процедуры получения иммунокомпетентных и стволовых клеток, достигается применением так называемых колониестимулирующих факторов, (гранулоцитарного или гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора) назначаемых в виде внутривенных или подкожных инъекций 2 раза в день. Применение препарата может сопровождаться гриппоподобным синдромом, болями в костях и суставах, подъемами температуры, ухудшением общего самочувствия. Прием парацетамола или других нестероидных противовоспалительных средств приносит облегчение симптомов. При отмене колониестимулирующего фактора самочувствие и состояние донора нормализуются. Серьезные побочные эффекты крайне редки, тем не менее, донор будет постоянно находиться под медицинским наблюдением в течение всего периода мобилизации и сепарации. Колониестимулирующие факторы применяются более 15 лет и на настоящее время данных за наличие отдаленных побочных эффектов не получено. Непосредственно процедура сбора иммунокомпетентных и стволовых клеток осуществляется в специально оборудованном помещении. После такой процедуры восстановление нормальных показателей кроветворения у донора происходит в течение 5-7 дней после процедуры. В случаях, когда взятие крови из вены затруднено (плохой венозный доступ, повторные сеансы, повышенная эмоциональность или отсутствие адекватного понимания значения и характера процедуры со стороны больного и т.п.) планируется постановка центрального венозного катетера в подключичную или бедренную вены и проведение сеансов сбора клеток с их использованием. Постановка катетера проходит под местной или общей анестезией. Вероятно развитие следующих осложнений: боль и дискомфорт в месте вкола, кровоизлияние в месте вкола, значительно реже встречаются повреждения легкого, и кровотечение. При их развитии донор будет госпитализирован в стационар для получения специализированной помощи.

Этим информированным согласием я выражаю свою готовность быть донором иммунокомпетентных и стволовых гемопоэтических клеток. В настоящий момент я располагаю достаточной информацией о донорстве иммунокомпетентных и стволовых гемопоэтических клеток. Я знаю, что на все мои вопросы, касающиеся донорства, которые возникнут в будущем, я получу ответы от лиц, ответственных за проведение программы лечения. Я согласен сообщить необходимую информацию о моем здоровье, которой я располагаю. Я знаю, что вся информация, касающаяся меня и моего здоровья, является конфиденциальной, к работе с данной информацией будет допущен узкий круг специалистов. Использование любой информации, касающейся меня, без моего согласия категорически запрещено. Я осознаю, что мое согласие стать потенциальным донором является первым этапом донорства иммунокомпетентных и стволовых гемопоэтических клеток. Я согласен сдавать необходимое количество крови и проходить необходимые процедуры при проведении первичного обследования. Образцы крови будут забраны в стерильных условиях с помощью пункции иглой

вены на руке. Я оставляю за собой право в любой момент в одностороннем порядке расторгнуть действие данного Соглашения.

Участие в программе донорства является добровольным. Подписывая данную форму информированного согласия, Я выражаю согласие со следующими пунктами:

1. Со мной (с моим ребенком), были обсуждены цели и побочные эффекты данной процедуры, возможный риск. Подписывая этот документ, я подтверждаю, что получил (а) исчерпывающее разъяснение и подписываю согласие добровольно,
2. Я информирован (а) о том, что во время процедуры мобилизации и сепарации или в ближайшем периоде могут возникнуть непредвиденные обстоятельства и осложнения, которые могут потребовать дополнительных вмешательств,
3. Я понимаю, что персонал отделения не может нести ответственность за осложнения, возникшие по причине и в случае невыполнения врачебных рекомендаций мной (моим ребенком),
4. На все мои вопросы я получил (а) ответы.
5. Я (мой ребенок) согласен (а) быть донором иммунокомпетентных и стволовых гемопоэтических клеток.

Подпись донора	Дата	Имя донора
----------------	------	------------

Подпись врача, получающего согласие	Дата	Имя лица, получающего согласие
-------------------------------------	------	--------------------------------

Подпись одного из родственников	Дата	Имя родителя
---------------------------------	------	--------------

ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ БОЛЬНОГО НА ПРОВЕДЕНИЕ ИНТРАТЕКАЛЬНОЙ ТРАНСФУЗИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Вашему ребенку планируется введение в спинномозговой канал иммунокомпетентных клеток, полученных ранее у родственного донора после проведения процедуры цитафереза. Клетки, хранящиеся в замороженном состоянии, будут разморожены и введены путем пункции в спинномозговой канал. Пункция осуществляется в условиях стерильности между остистыми отростками 4-5 поясничных позвонков (через резервуар Омайо, непосредственно в опухоль) под анестезией. Все манипуляции и процедуры будут проводиться сертифицированными специалистами по сертифицированной методике.

Я информирован (а) о том, что во время манипуляции или в ближайшие сутки могут осложнения, связанные с пункцией или проведением анестезии. Наиболее часто встречается тошнота, рвота, головокружение и головная боль. Реже могут наблюдаться кратковременное истечение ликвора из места пункции, подъем температуры, боли в ногах и спине. При возникновении побочных явлений моему ребенку будет проводиться соответствующая терапия.

Этим информированным согласием я выражаю свою готовность на проведение спинномозговой пункции и введение иммунокомпетентных клеток. В настоящий момент я располагаю достаточной информацией о характере процедуры и возможных осложнениях. Я знаю, что на все мои вопросы, касающиеся этой медицинской манипуляции, которые возникнут в будущем, я получу ответы от лиц, ответственных за проведение программы лечения. Я согласен (а) разрешать забор необходимого количества крови и других биологических жидкостей у моего ребенка и давать согласие на проведение необходимых исследований. Я согласен (а) на проведение лечения, необходимость которого будет определять лечащий врач.

Подписывая данную форму информированного согласия, Я выражаю согласие со следующими пунктами:

1. Со мной (с моим ребенком), были обсуждены цели и побочные эффекты данной процедуры, возможный риск, а также альтернативные методы терапии. Подписывая этот документ, я подтверждаю, что получил исчерпывающее разъяснение и подписываю согласие добровольно
2. Я информирован о том, что во время манипуляции или в ближайшем периоде могут возникнуть непредвиденные обстоятельства и осложнения, которые могут потребовать дополнительного вмешательства. Я согласен на проведение подобных вмешательств, необходимость которых будет определять лечащий врач,
3. Я понимаю, что персонал отделения не может нести ответственность за осложнения, возникшие по причине и в случае невыполнения врачебных рекомендаций мной (моим ребенком),
4. На все мои вопросы я получил (а) ответы.
5. Я (и мой ребенок) согласны на проведение спинномозговой пункции (через резервуар Омайо, непосредственно в опухоль) и введения донорских иммунокомпетентных клеток в спинномозговой канал (внутри желудочков головного мозга, непосредственно в опухоль).

Подпись больного (если применимо)	Дата	Имя больного
Подпись лица, получающего согласие	Дата	Имя лица, получающего согласие
Подпись одного из родителей	Дата	Имя родителя

Приложение 7

Информированное согласие пациента Исследований эффективности терапии с использованием аутологичных вакцин на основе дендритных клеток.

Ваш доктор сообщил Вам о Вашем заболевании и рассказал о различных методах лечения, которые могут помочь Вам.

Вам предлагается принять участие в испытании нового метода противоопухолевой терапии, научное и экспериментальное обоснование которого сделано сотрудниками Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН.

Метод основан на введении больному его собственных дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами, которые были выделены из опухоли больного или получены из библиотеки опухолей. Для этого у Вас будет произведен забор крови, из которой будут получены дендритные клетки.

Дендритные вакцины вводятся внутрикожно в 4 точки тела. Интервал введения 1 раз в 2 недели первые 3 мес. затем 1 раз в 4 недели.

После введения вакцины Вы будете проходить осмотр у Вашего доктора (физикальный осмотр и необходимые инструментальные исследования) для оценки эффективности влияния лечения на Ваше заболевание.

Для того чтобы удостовериться, что Вы можете принимать участие в исследовании, перед началом лечения Вам будут проведены: анализ крови, физикальный осмотр, оценка состояния сердечной деятельности, а также обследования, необходимые для оценки тяжести Вашего заболевания.

На месте подкожной трансплантации аутологичных дендритных клеток возможна гиперемия, гипертермия, припухлость, болезненность. Возможно повышение температуры тела. Обо всех побочных эффектах необходимо сообщить лечащему врачу. Перечисленные побочные эффекты могут причинить минимальные неудобства или быть серьезными, однако, в любом случае, Ваш лечащий врач будет внимательно наблюдать за Вами.

Эффективность применения данного метода терапии будет регулярно оцениваться. В случае отсутствия эффекта лечение может быть прекращено.

При угрозе ущерба Вашему здоровью, в случае невыполнения предписаний врача относительно лечения или появления новых данных, в соответствии с которыми Вам не рекомендуется принимать участие в исследовании, а также, если исследование будет закрыто, Ваш доктор может прекратить лечение.

Ваше участие в исследовании является полностью добровольным. Если Вы согласились, а затем изменили свое решение и желаете выйти из исследования, Вы можете сделать это в любое время без объяснения причин. При этом Вам рекомендуется информировать доктора о Вашем решении для того, чтобы он дал Вам инструкции о том, что надо сделать для оценки состояния Вашего здоровья и о дальнейшем лечении. Ваш доктор обсудит с Вами другие варианты лечения. Ваше решение не повлияет на уровень оказываемой Вам в дальнейшем медицинской помощи.

Если Вы даете согласие на участие в данном исследовании, информация о состоянии Вашего здоровья может быть представлена органам здравоохранения, контролирующим организациям. При этом данные о Вашей личности останутся строго конфиденциальными. В случае возникновения любых проблем или вопросов, касающихся самого исследования, Ваших прав как участника клинического испытания, или каких-либо научных аспектов, Вы можете обратиться к доктору _____ по телефону _____.

Согласие пациента

Я поставлен в известность относительно целей, методики проведения и длительности исследования, эффективности противоопухолевой терапии методом введения аутологичных дендритных клеток нагруженных опухолевыми антигенами *in vitro*, ожидаемых терапевтических и возможных побочных эффектах, и я добровольно даю свое согласие на участие в исследовании.

Необходимая информация об исследовании была мне предоставлена.

Мне известно, что в любой момент исследования я могу отказаться от участия в нем.

Копия данного соглашения была мне предоставлена.

Имя пациента: _____

Подпись пациента: _____ дата

Подпись исследователя: _____ дата

Оценка общего состояния

Общее состояние больных оценивает исследователь при скрининге, исходном обследовании и при каждом посещении с 4-недельным интервалом до окончания периода исследования. Количество баллов для каждого состояния определяют по 5-балльной шкале ВОЗ и 100-балльной шкале Карновского.

Таблица 4. Общее состояние по ВОЗ

Баллы	Общее состояние
0	Способность выполнять все повседневные действия без ограничений
1	Ограниченная способность выполнять тяжелую работу, амбулаторное
2	Амбулаторное лечение, способность обслуживать себя, но невозможность выполнения любой работы; ходячий режим более 50%
3	Способность выполнять ограниченные действия по уходу за собой, постельный или сидячий режим более 50% периода бодрствования
4	Полная потеря трудоспособности, неспособность выполнять любые действия по уходу за собой, полный постельный или сидячий режим

Таблица 5. Шкала клинического статуса по Карновскому

Характеристика шкалы Карновского	Шкала Карновского (%)
Нет проявлений болезни	100
Минимальные проявления болезни, продолжает нормальную активность	90
Нормальная деятельность исполняется с трудом, некоторые признаки болезни	80
Не способен продолжать нормальную активность	70
Нуждается в периодической помощи, но способен сам себя обслуживать	60
Нуждается в существенной общей и медицинской помощи	50

Выраженная степень инвалидности	30
Нуждается в активной поддерживающей терапии	20
Умирающий	10

Порядок проведения исследования и рандомизация

Больных распределяют по двум лечебным группам случайным образом для определения эффективности использования технологии

При рандомизации больных стратифицируют по ранее отмеченным признакам

Исследование проводят по открытому протоколу, поэтому слепой порядок не предусмотрен

ПЛАН АНАЛИЗА

Основные переменные исследования

- Объем опухолевого узла и перифокальной зоны
- Выраженность внутричерепной гипертензии
- Интегральная оценка состояния больного
- Качество жизни
- Суточная дозировка дексаметазона

Анализ эффективности

Анализ полной совокупности больных проводят по числу всех больных, прошедших рандомизацию, на основании исходных данных и показателей через 3 и 6,12 месяцев лечения.

Критерии оценки эффективности терапии:

стабилизация процесса,

замедление роста опухоли – продолжительность жизни превышает 50 недель с момента верификации опухоли

Улучшение общего клинического состояния – превышение 70 балльной отметки по шкале Карновского

В исследование разрешается включать больных с глиобластомами, поражающими полушария большого мозга с верификацией данными нейровизуальных исследований – КТ и МРТ с контрастным усилением, подтвержденных результатами гистологического исследования.

До включения в исследование оцениваются следующие показатели, являющиеся критериями для разделения на 4 подгруппы:

1. Оценка клинического статуса - Индекс Карновского 70;
2. Максимальный размер опухолевого узла 4 см
3. Вовлеченность (распространение, источник роста) стволово-дизэнцефальных образований
4. Проведение предшествующей циторедуктивной операции.

Формирование исследовательской группы предусматривает равноколичественную рандомизацию по критериям :

- пути введения АГСК с НК с индукторами апоптоза– внутриопухолевое или внутривенное (при врастании или исходном росте ГБ из бокового желудочка),

-пути введения АГСК с НК с индукторами апоптоза:

а) интратекральное введение в ликворную систему пациента с ГБ

б) Системное внутривенное введение в кровь пациента

До начала лечения все рандомизированные больные могут получать внутримышечно кортикостероид - дексаметазон в дозе 8 – 24 мг в сутки.

Больные проходят стратификацию в зависимости от оценки клинического статуса и объема опухолевого узла (массы).

После окончания исследования больные могут по желанию продолжать курсовое лечение с использованием данного протокола иммунотерапии.

4. ПОДГОТОВКА КЛЕТОЧНОГО БИОМАТЕРИАЛА

4.1. Описание метода получения иммунопрепарата гемопоэтических клеток-предшественников

Процедура условно разделяется на две части :

1) Мобилизация стволовых клеток в периферическую кровь:
С целью увеличения количества стволовых клеток в периферической крови донор получает 8 инъекций гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), подкожно с интервалом в 10-12 часов в течение 4 дней. Г-КСФ представляет собой медицинский препарат, полученный путем генной инженерии, и является абсолютным аналогом человеческого фактора. В первые три дня доза препарата составляет 2,5 мкг на кг, в последний день доза удваивается. Ежедневно определяется общий анализ крови и на 4-5 день делается УЗИ брюшной полости

2) Сбор стволовых клеток:

Осуществляется на 5 день от начала стимуляции Г-КСФ на сепараторе крови СОВЕ - спектра с использованием одноразовой системы для сепарации и стандартных растворов. Длительность процедуры 3-4 часа в зависимости от скорости процедуры, веса донора и параметров анализа крови. Процедура проводится путем забора крови из одной вены, обработки ее внутри сепаратора, забора определенного объема стволовых клеток и возврата остальных компонентов крови донору через другую вену. Венозный доступ осуществляется путем пункции 2-х периферических вен или через 2-х просветный центральный катетер, установленный в подключичную вену на время проведения сеанса. Средний объем собранного материала 300-400 мл. Собранный материал оценивался по двум параметрам: по общему количеству ядерных клеток (ЯК) в сепарате и по количеству CD34⁺ клеток на килограмм веса больного. ЯК в сепарате определялись путем подсчета в камере Горяева до

проведения каких-либо манипуляций. Процент CD34⁺ клеток в клеточной суспензии, полученной в ходе цитафереза, определялся методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США).

3) Определение периферических стволовых клеток

Стволовые клетки, и коммитированные клетки – предшественницы формируют, так называемый пул стволовых гемопоэтических клеток (ПСГК). Общим для всех клеток данного пула является экспрессия на мембране молекулы CD34 [1]. Именно это свойство позволило применить цитофлуориметрические методики для выявления клеток - предшественников и обеспечить точный и, что не менее важно, быстрый подсчета их количества в любом гемопоэтическом материале.

Основным источником стволовых клеток в последние годы стала периферическая кровь. Так, например, трансплантация сепарированной фракции мононуклеарных клеток периферической крови на фоне стимуляции кроветворения позволяет достичь значительного сокращения периода критической цитопении у больных, перенесших высокодозную химиотерапию [2]. Данный факт вызван тем, что под действием колониестимулирующих факторов в периферическое кровяное русло поступают стволовые клетки и клетки-предшественницы. Особенного внимания заслуживает субпопуляционный состав CD34⁺ клеток [8, 9,10], то есть определение количества клеток разных компартментов пула ПСГК:

Установление субпопуляционного состава CD34⁺ клеток проводится цитофлуориметрически, с применением метода тройной метки (одновременная окраска клеток антителами к 3 разным антигенам, нагруженными различными флуорохромными красителями).

4.2. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

Стандартное оборудование и реактивы клинико-диагностической и патоморфологической лабораторий.

Цитофлуориметр лазерный проточный.

Программное обеспечение к прибору Цитофлуориметр лазерный проточный.

Моноклональные антитела:

- к антигену CD34: НРСА-2а (8G12), изотип IgG1, меченные фикоэритрином (PE) или пиридининхлорофилом (PerCP), производство Becton Dickinson (США)
- к антигену CD45, изотип IgG1, метка флуоресцеин (FITC)

изотипические контроли: иммуноглобулины мыши G1 изотипа с соответствующей меткой (PE, FITC, PerCP).

Азид натрия (NaN₃). Готовят маточный 2,5% раствор азид натрия на физиологическом растворе. В питательные среды и забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР) добавляют азид натрия до конечной концентрации 0,25%.

Лизирующий раствор. Пропись: NH_4Cl – 8,26 г, бикарбонат калия – 1г, Na_4 ЭДТА – 0,37 г.
Растворить в 100 мл дистиллированной воды.

Забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР).

Альбумин сывороточный бычий. Регистрационный номер 65/1141

ЗФР с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (ЗФР-БСА)

4.3. ОПИСАНИЕ МЕТОДА СТАНДАРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНОГО БИОМАТЕРИАЛА КЛЕТОК ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЕМОПОЭЗА ОТ БЛИЗКОРОДСТВЕННОГО ДОНОРА

Определение количества клеток-предшественниц проводится цитофлуориметрически, в прямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

Наиболее адекватным следует считать метод двойной метки, с одновременным окрашиванием клеточного субстрата моноклональными антителами к антигену CD34- основному маркеру клеток пула ПСГК и к молекуле CD45- общелейкоцитарному антигену, определяющему все гемопоэтические клетки. Подобная методика позволяет сразу рассчитать количество CD34+ клеток на все гемопоэтические (CD45+ клетки) в материале.

Для оценки уровней неспецифического связывания часть клеток окрашивают изотипическими контролями. В качестве изотипических контролей стандартно применяются мышинные иммуноглобулины IgG1 изотипа (IgG1), меченные красителями аналогичными метке используемых моноклональных антител (PE, FITC, PerCP).

Методика подготовки проб, методика лизиса эритроцитов, счет и запись на проточном цитометре детально представлены в основной Программе объединенных научных исследований.

4.5. МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ГЛИОБЛАСТОМЫ (ГЛИОСФЕРЫ) И НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ НОСА ПАЦИЕНТА

Из глиальной опухоли пациента были аутологичные раковые нейральные стволовые клетки (РНСК), полученные из биопсийного материала самого пациента взятого при открытых операциях или стереотаксической биопсии. Методика и протокол получения этих клеток аналогичен получению нейральных стволовых клеток (НСК) описанный в работах Zhang X. et al., 2004-2006a, 2006b. Ткань глиальной опухоли мозга и обонятельной выстилки носа получают от пациентов и обрабатывают по стандартному культуральному протоколу С.Т. Marshal et al., (2005- 2006).

В исследование принимаются фрагменты опухоли размером 10x5 мм. Для получения здоровых НСК берут ткань обонятельной выстилки носа. Полученную ткань доставляют в лабораторию в охлажденном растворе Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} (HBSS), содержащем антибиотики и антимикотики (1:100; Gibco). Время доставки не превышает 2 ч. После повторной промывки в том же растворе из ткани опухоли удаляют кровеносные сосуды, после чего ткань измельчают и инкубируют в течение 40 мин. при $36,5^{\circ}\text{C}$ в растворе трипсина /ЭДТА 025%, приготовленном на 0.01 М фосфатном буфере (PBS, pH 7.4). Действие ферментов блокируют средой DMEM (Gibco), содержащей 3% сыворотки, ткань промывают в трёх сменах сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS; Hanks' balanced salt solution. Sigma) и диссоциируют повторным пипетированием в питательной среде. Состав среды: минимальная среда Игла (MEM, Sigma) 90%, эмбриональная

сыворотка телят (Fetal bovine serum, FBS, Gibco, Invitrogen), глюкоза 0.8%, глутамин 2мМ ((Gibco), добавок B27 (Sigma), HEPES 20 мМ, ростовые факторы (только для первичных культур) фактор роста фибробластов (FGF2, 1ng/ml Sigma), нейроростовой фактор (NGF 2 ng/ml, Sigma)

Полученную суспензию клеток центрифугируют (3 мин при 1200 об/мин), осадок ресуспендируют в питательной среде того же состава.

Количество и жизнеспособность диссоциируют клеток определяют в камере Горяева после окраски 0.1% раствором трипанового синего. Для последующего культивирования используют клеточные суспензии только с 85-95% жизнеспособных клеток.

Диссоциированные клетки (5×10^5 кл/мл) культивируют в 12-луночных планшетах на полилизин-ламининовом субстрате в течение 14 суток (36.5° C, 5% CO₂). Частичную смену 1/3 питательной среды производят два раза в неделю. Первичную культуру после формирования сливного монослоя снимают с помощью раствора трипсина/ЭДТА. После промывки в HBSS и центрифугирования клетки ресуспенсируют в питательной среде. Клеточную суспензию (10000-12000 кл/см²) переносят в 12-луночные планшеты или флаконы (площадь 25 см²). Таким способом культуры пассируют 4 раза до формирования сливного монослоя. Формирующиеся в клеточном монослое прикрепленные к субстрату и свободноплавающие нейросферы отбирают с помощью Пастеровских пипеток и диссоциируют описанным выше методом ферментной обработки. Выделение нейросфер позволяет отделить их от прикрепленных к субстрату обкладочных глиальных клеток, фибробластов и стромальных (опорных) клеток. Клеточную суспензию клеток нейросфер после промывки и центрифугирования ресуспендируют в питательной среде и культивируют в 12-луночных планшетах ($10000-12000$ кл/см²) и на покровных стеклах (18x18 мм) в чашках Петри до формирования сливного монослоя. Полученные культуры используют для цитологических и иммуноцитохимических исследований. Часть клеток последних пассажей замораживают в среде для криоконсервирования (90% сыворотки, 10% диметилсульфоксида) и хранят в жидком азоте.

Клеточный монослой фиксируют в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 30 мин. После промывки в PBS (3x10 мин.) клетки инкубируют 24 ч. при 4° C с первичными антителами к β -тубулину (**1:300**; Chemicon) нестину (**1:100**, Chemicon) и нейрональной специфической енолазе (**1:100**, антитела получены в нашей лаборатории). После промывки в PBS клетки последовательно обрабатывают биотинилированными антителами с авидин-биотиновым комплексом (ABC, Vector Laboratories, Inc), раствором диаминобензидина приготовленном на фосфатном буфере (DBA 0.5 мг/мл., перекись водорода 0.03%,). Препараты обезвоживают и заключают под покровные стекла в синтетическую смолу (Entellan, Merk).

Использованные в данной технологии и модифицированные нами методы получения глиомасфер из кусочка ткани глиобластомы человека изложены в списке использованной литературы

4.6 Протокол получения образцов клеточных лизатов из клеточных линий, РСК, ГСК, НСК.

Необходимые реактивы, приборы

- Фосфатный буфер /Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-ALDRICH, Catalog # D5652-10L)
- коктейль ингибитора протеаз / Protease inhibitor cocktail (Sigma-ALDRICH, Catalog # P8340-5ML)
- Пипетки и наконечники к ним

- Вортексный шейкер
 - Микроцентрифуга
 - Перчатки
1. Промывают клетки ($1 \cdot 10^8$ клеток/мл) от среды, осадок ресуспендируют в 2 мл PBS, центрифугируют при 1207 x g в течение 5 минут. Повторяют 2 раза.
 2. Удаляют надосадочную жидкость, ресуспендируют клетки в 500 мкл PBS с ингибиторами протеаз (10мкл на 1 мл раствора). Перемешивают пепитированием.
 3. Проводят пяти кратное замораживание/оттаивание в жидком азоте. Перед каждой заморозкой раствор перемешивают на вортексе.
 4. Центрифугируют при 9,000 x g в течение 10 минут.
 5. Надосадочную жидкость отбирают.
 6. Измеряют концентрацию белка в лизатах клеток (метод определения белка по Бредфорду).
 7. Клеточные лизаты должны использоваться немедленно или их аликвотируют и хранят при -70° С. Избегают подвергать образцы лизатов клеток повторным циклам замораживания/оттаивания.

4.7. ПРОТОКОЛЫ ПРОВЕДЕНИЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (АГСК, НСК И СК ИЗ ГЛИОМАСФЕР, АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ, РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ , РАКА ГРУДИ)

4.7.1. Протоколы проведения протеомных исследований методами LC-ESI-Ion-Trap

Основные технологические платформы

- LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra-Chip)
- SDS-PAGE- LC-ESI-Ion Trap (Mini-protean, Bio-Rad; Agilent XCT Ultra-Chip)
- 2D-LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra-2D)
- 3D-LC-ESI-Ion Trap (хроматограф Agilent 1100+ mRP-колонка; Agilent XCT Ultra-2D)

Протеомный анализ с использованием LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra-Chip)

- Предназначен для подтверждения чистоты белкового препарата, либо для идентификации, секвенирования очищенных белков.

Этапы:

1. Определение концентрации белка в пробе (Протокол 1)
2. Проведение гидролиза белка трипсином (Протокол 3а)
Растворить 0.1-1мкг (по белку) лиофилизированного препарата в 15 мкл 50 мМ NH_4HCO_3 , добавить 1-10 нг Трипсина (Promega), инкубировать 16 часов при 37°C

Реакцию остановить добавлением FA до 1% (к/к). Пробу высушить в испарителе.

Все работы проводить в перчатках, халате в ламинарном боксе.

3. Анализ гидролизата методом LC-ESI-Ion Trap (Протокол 4)

4. Обработка результатов с использованием SpectrumMill (Help), Mascot (Help)

Протеомный анализ с использованием SDS-PAGE LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra-Chip)

- Предназначен для идентификации белков мембранных фракций.

Этапы:

1. Определение концентрации белка в пробе (Протокол 1)
2. Разделение белков методом SDS-PAGE (Протокол 2)
3. Вырезание интересующих полос на геле, проведение гидролиза белка трипсином (Протокол 3б), экстракция пептидов (Протокол 3с)
4. Анализ гидролизата белков методом LC-ESI-Ion Trap (Протокол 4). Не менее 3-х повторов.
5. Обработка результатов с использованием SpectrumMill, Mascot

Протеомный анализ с использованием 2D-LC-ESI-Ion Trap

Предназначен для построения протеомов субклеточных фракций белков (до 800 белков в одном эксперименте)

Этапы:

1. Определение концентрации белка в пробе (Протокол 1)
2. Карбоксиметилирование Cys (Протокол 3д)
3. Проведение гидролиза белка трипсином (Протокол 3а),
4. Анализ гидролизата белков методом 2D-LC-ESI-Ion Trap (Протокол 5). Не менее 8-и повторов.
5. Обработка результатов с использованием SpectrumMill (Help), Mascot (Help)

Протеомный анализ с использованием 3D-LC-ESI-Ion Trap

- Предназначен для построения протеомов (до 1500 белков в одном эксперименте)

Этапы:

1. Определение концентрации белка в пробе (Протокол 1)
2. Карбоксиметилирование Cys, денатурация белков (Протокол 3д)
3. Разделение 0.5-1 мг белка с использованием ЖХ на колонке mRP (Agilent) на 6 фракций (Протокол 6)
4. Проведение гидролиза белков каждой из фракций трипсином (Протокол 3а),
5. Анализ гидролизата белков методом 2D-LC-ESI-Ion Trap (Протокол 5). Не менее 3-х повторов.
6. Обработка результатов с использованием SpectrumMill (Help)

ПРОТОКОЛ

измерения концентрации белка ВСА-методом

Материалы:

1) стандарт для калибровки – приготовленный раствор белка (например, BSA) с концентрацией 1 мг/мл;

- 2) Содержащие белок образцы;
- 3) Смесь ВСА-реагентов А/В (приготовление см. ниже)
- 4) Спектрофотометр, кюветы.

Метод:

1. Из исходного стандарта приготовить по 100 мкл калибровочных растворов белка с концентрациями от 0,1 мг/мл до 1 мг/мл с интервалом в 0,1 – 0,2 мг/мл (5-10 растворов). Для приготовления калибровочных растворов желательно использовать тот же буфер, в котором растворены образцы белка.
2. Приготовить смесь ВСА-реагентов, исходя из объема 2 мл смеси на 1 пробу: 50 об.ч. реагента А + 1 об.ч. реагента В (2 мл А + 40 мкл В на пробу);
3. Смешать по 100 мкл содержащих белок растворов¹ с 2 мл свежеприготовленной смеси ВСА-реагентов А/В. Также приготовить бланк-контроль (без белка) – 100 мкл буфера, в котором растворен белок, смешать с 2 мл смеси А/В;
4. Инкубировать все образцы при 37°C в течение 30 мин, затем охладить до комнатной температуры (для увеличения чувствительности можно инкубировать при 60°C, тогда концентрации калибровочных растворов следует снизить);
5. Установить спектрофотометр на «0» с помощью бланк-контроля;
6. Измерять оптическую плотность образцов при 562 нм (A_{562});
7. Используя полученные оптические плотности калибровочных растворов, построить калибровочный график, на котором по оси абсцисс располагается концентрация, по оси ординат – оптическая плотность;
8. Определить концентрацию остальных образцов по графику.

ВСА-реагент А:

1 г 4,4'-дикарбокси-2,2'-бихинолина натриевой соли (26 мМ)²

2 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,16 М)

160 мг калия-натрия тартрат тетрагидрат (7 мМ)

0,4 г NaOH (0,1 М)

0,95 г NaHCO_3 (0,11 М)

Довести до 100 мл H_2O

После перемешивания и растворения компонентов, довести рН to $11,3 \pm 0,2$ используя NaOH для увеличения рН или NaHCO_3 для уменьшения рН. Хранить при 4°C несколько месяцев.

ВСА-реагент В:

6,26 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4% CuSO_4);

Довести до 100 мл H_2O

¹ Концентрация белка в этом объеме должна находиться в пределах концентраций калибровочных растворов.

² Можно 0,1 г

Важно: буфер, в котором растворен белок, не должен содержать восстанавливающих агентов (DTT, β -меркаптоэтанол и т.п.). Подробнее – см. список интерферирующих с ВСА-методом веществ и их ПДК.

ПРОТОКОЛ **приготовления полиакриламидного геля для электрофореза по Laemmli**

Разделяющий гель (12%):

Раствор мономеров (акриламид 30%+бис-акриламид 0,8%) – 2 мл;

1,5 М Tris·HCl (pH 8,8) – 1,25 мл;

10% ДСН (SDS) – 50 мкл;

Деионизованная вода – до 5 мл;

10% персульфат аммония* (свежий раствор) - 25 мкл;

TEMED* – 2,5 мкл;

Формирующий гель (4%):

Раствор мономеров (акриламид 30%+бис-акриламид 0,8%) – 650 мкл;

0,5 М Tris·HCl (pH 6,8) – 1,25 мл;

10% ДСН (SDS) – 50 мкл;

10% персульфат аммония* (свежий раствор) - 25 мкл;

TEMED* – 5 мкл;

1. Подготовить растворы без компонентов, помеченных «*»;
2. Собрать стекла со спейсерами для заливки геля;
3. Непосредственно перед заливкой добавить компоненты «*» в раствор для разделяющего геля;
4. Залить раствор для разделяющего геля между стеклами, оставляя 15-18 мм для формирующего геля и гребенки (данные для мини-гелей);
5. Аккуратно наложить этиловый спирт поверх залитого раствора (0,5-0,8 см);
6. После полимеризации геля (при этом граница между раствором и спиртом становится резкой) удалить спирт, и налить раствор для формирующего геля до верхних краев стекол, добавив перед этим компоненты «*»;
7. Вставить гребенку, не допуская попадания пузырьков воздуха в раствор;
8. После полимеризации формирующего геля и непосредственно перед проведением электрофореза гребенка аккуратно извлекается;

Заполимеризованные гели можно хранить при 4°C не вынимая гребенки около 3 суток.

ПРОТОКОЛ **расщепления белков трипсином в растворе**

- Предварительно, перед проведением реакции, белки можно прогреть 45-60 минут при 60°C.

- Добавить в пробирку с образцом 30-60 мкл 50 мМ гидрокарбонат аммония NH_4HCO_3 pH 7,6-8,5 (в равной степени и в зависимости от преследуемых целей можно использовать 50 мМ Tris-HCL pH 7,6-8,5 с или без добавления до 3 мМ CaCl_2 , или 20 мМ NaPi , pH 7,6-8,5). Если в образце присутствует мочевины или гуанидин гидрохлорид, то добавляемый объем буфера должен быть таким, чтобы конечная концентрация денатурирующих агентов была не выше 1М; если использовался ДДС, до довести концентрацию до 0,1%. Рекомендуется добавлять ацетонитрил до 30%.
- Добавить раствор трипсина в 1мМ HCL до конечного соотношения к белковому субстрату 1/100-1/20 (по массе).
- Реакцию инкубировать при 37°C от 4 часов до суток. Рекомендуется добавить через 2 и через 4 часа после начала реакции еще трипсина в тех же массовых соотношениях к белку.
- Терминацию реакции проводят снижением pH до 4. Альтернативный способ: замораживание при температуре -30°C, преципитирование трихлоруксусной кислотой до 10% конечной концентрации, или добавление специфических ингибиторов (PMSF 15-100 мкг/мл, APMSF 10-50 мкг/мл, антипаин до 50 мкг/мл, антитромбин до 1Ед/мл, ТРСК 30-40 мкг/мл)
- Для обессоливания пептидной смеси можно использовать ZipTip, активированный 100% ацетонитрилом и уравновешенные 0,1% ТФУ. Смесь пептидов для этого необходимо также предварительно высушить и растворить в 0,1% ТФУ. Элюция проводится 70% ацетонитрилом с 0,1% ТФУ,

Степень полноты трипсинолиза во многом будет зависеть от наличия денатурирующих агентов и их ингибирующего влияния на трипсин. Различные производители предлагают различные трипсины, толерантные к тем или иным денатурантам. Также, важными факторами являются время инкубации (от 2 часов до суток) и температура инкубации (чаще 37°C, в некоторые модифицированные ферменты выдерживают 56°C, а для некоторых целей необходимо проведение особо медленных гидролитических реакций при низких температурах от 4 до 15°C). Необходимо помнить, что такой фактор, как ионная сила раствора тоже влияет на скорость реакции: добавление соли NaCl до 300 мМ в значительной степени ускоряет реакцию, свыше 300 мМ – незначительное увеличение эффекта, а 500 мМ и выше, как правило, ингибируют реакцию

Протокол трипсинолиза белков в геле и их экстракция из геля совместимый с масс-спектрометрическим анализом

1. Обесцвечивание, удаление детергента, восстановление и алкилирование.

- Вырезать интересующее пятно из геля чистым скальпелем или лезвием. Стараться вырезать по границам пятна, не затрагивая соседние области геля.
- Вырезанное пятно разрезать на кусочки небольших размеров ($\leq 1.5 \times 1.5$ мм) и перенести их в чистую пробирку 0,2 мл, которая предварительно была промыта раствором 50% ацетонитрила с 0,1% ТФУ.
- Для избавления от ДДС добавить в пробирку к кусочкам геля 100 мкл раствора 40% метанол+5%уксусной кислоты; инкубировать при комнатной температуре 15 минут.
- Убрать раствор, и промыть однократно добавлением 100 мкл деионизованной воды (5 минут). Убрать воду.
- Для удалени краски:
 1. в случае окрашивания геля методом Coomassie Brilliant Blue G(R)-250 добавить 100 мкл раствора 50 мМ гидрокарбоната аммония в 50% ацетонитриле. Инкубировать:
 - 1.1 при 56-60°C в течение 15-20 минут до полного обесцвечивания
 - 1.2 при комнатной температуре с несколькими сменами раствора по 30 минут на каждую смену.
 2. в случае окрашивания геля серебром добавить сначала один объем 100 тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, а затем добавить к нему равный объем 30 мМ феррицианида калия (красной кровяной соли), то есть в смеси конечная концентрация компонентов будет составлять 50 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и 15 мМ красной кровяной соли. Инкубировать реакцию

при 56-60°C в течение 20 минут. Иногда, для полного обесцвечивания необходимо сделать еще одну смену раствора.

- Убрать раствор и промыть 3 раза по 100 мкл деионизованной водой по 10 минут. Убрать воду.
- Для восстановления белков в геле добавить 100 мкл раствора 50-65 мМ ДТТ в 50 мМ гидрокарбонате аммония. Инкубировать при комнатной температуре 30-45 минут.
- Промыть однократно деионизованной водой. Убрать воду.
- Для проведения реакции алкилирования добавить 100 мкл 15-20 мМ раствор йодацетамида в 50-100 мМ гидрокарбонате аммония. Инкубировать при комнатной температуре 45-60 минут в недоступном для света месте.
- Промыть 3 раза по 10 минут 100 мкл деионизованной воды. Убрать воду.
- Для дегидрирования гелей добавить 10 мкл 100% ацетонитрила. Реакцию инкубировать до тех пор, пока кусочки геля не станут белого цвета.
- Промыть однократно водой. Убрать воду.
- Высушить гели при 45-60°C. Сухие гели можно хранить длительное время при -20°C

2. Проведение трипсинолиза в геле.

- Высушенные гели необходимо регидрировать добавлением 5-10 мкл 50 мМ гидрокарбонат аммония NH_4HCO_3 pH 7,6-8,5 (в равной степени и в зависимости от преследуемых целей можно использовать 50 мМ Tris-HCL pH 7,6-8,5 с или без добавления до 3 мМ CaCl_2 , или 20 мМ NaPi, pH 7,6-8,5), и трипсин в соотношении к белковому субстрату 1/50-1/100 (по массе). Оставить реакцию при 4°C на 10 минут.
- Добавить еще одну аликвоту трипсина с тем же буфером. Инкубировать реакцию от 4 часов до суток при 37°C.
- Рекомендуется добавить через 2 и через 4 часа после начала реакции еще трипсина в тех же массовых соотношениях к белку.
- Терминировать реакцию добавлением 1-3 мкл 100% муравьиной кислоты.

3. Экстракция пептидов из геля

- После ингибирования реакции высушить гели при 45-60°C.
- Добавить к гелям такой объем 0,1 ТФУ, чтобы они регидрировали и были слегка покрыты раствором. Можно инкубировать в данном растворе 15-20 минут при комнатной температуре. Рекомендуется для более эффективной экстракции поставить пробирки в ультразвуковую ванну на 10-15 минут.
- Центрифугировать при 12000 rpm 2-3 минуты. Отобрать надгелевый раствор в чистую пробирку.
- Процедуру повторить, начиная с добавления 0,1 ТФУ и с учетом того, что гели уже регидрированы. Объединить второй экстракт с первым.
- Объединенный экстракт пептидов высушить и осадок растворить в буфере и объеме, оптимальном целей и содержания дальнейшего анализа.

ПРОТОКОЛ

S-карбоксиметилирование белков

Реагенты:

- Буфер для алкилирования – 1,5M Tris HCL (pH8,5), 2,5мМ EDTA, 6M Guanidine-HCL или 8M Urea
- Буфер для восстановления – 0,2M Tris HCL (pH8,5), 2,5мМ EDTA, 6M Guanidine-HCL или 8M Urea
- ДТТ

- 2-меркаптоэтанол
- йодацетамид или йодуксусная кислота
- **Восстановление**
 1. Растворить белки в восстанавливающем, содержащем 50-65 мМ ДТТ буфере до конечной концентрации приблизительно 10 мг/мл. Проверить pH 8,0-9,0.
 2. Продуть под струёй азота 25-30 секунд
 3. Инкубировать в течение 3 часов при 37°C
- **Алкилирование**
 1. После проведение реакции восстановления необходимо охладить реакционную смесь на льду 5-10 секунд.
 2. Добавить свежеприготовленный раствор 15-55 мМ йодуксусной кислоты в алкилирующем буфере. Проверить pH 8,0-9,0.
 3. Осторожно перемешать содержимое пробирки
 4. Продуть азотом 25-30 секунд
 5. Инкубировать реакцию до 1 часа при 37°C или до 2 часов при комнатной температуре в недоступном для света месте.
 6. Заингибировать реакцию добавлением 2-меркаптоэтанола (приблизительно 7 мкл на 1 мг ДТТ)

В качестве восстанавливающего агента в равной степени можно применять 2мМ TCEP, а для алкилирования акриламид (Multiplex protein quantitation in saccharomyces cerevisia using amine-reactive isobaric tagging reagents., Philip L. Ross, Yulin N. Huang, Jason N. Marchese et al.//Mol Cell Proteomics, 3, 2004, 1154-1169; Liu J, Wu H, Hou Y., Determination of total tiopronin in human plasma by LC-ESI-MS using tris (2-carboxy-ethyl) phosphine as reducing reagent and methyl acrylate as derivatization reagent for the thiol group.// J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., Nov 21;844(1):, 2006, 53-7; Fischer WH, Rivier JE, Craig AG., In situ reduction suitable for matrix-assisted laser desorption/ionization and liquid secondary ionization using tris(2-carboxyethyl)phosphine.// Rapid Commun Mass Spectrom. Mar;7(3), 1993225-8; Thevis M, Loo RR, Loo JA., Mass spectrometric characterization of transferrins and their fragments derived by reduction of disulfide bonds.// J Am Soc Mass Spectrom. Jun;14(6):, 2003, 35-47. Click here to read)

ПРОТОКОЛ

Протеомного анализа с использованием LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra-Chip)

Реагенты:

Вода ВЖХ чистоты

Муравьиная кислота ХЧ

Ацетонитрил ВЖХ чистоты

Пробирки для инъекции Agilent N5188-2788

1.5-2.0 мкл смеси пептидов помещают в пробирку Agilent N5188-2788 и анализируют с помощью LC-MS/MS. Обратнoфазный нано-LC-MS/MS проводят, используя Agilent 1100 нано-проточную LC систему, соединенную с Agilent 1100 SL Series MSD Trap XCT Ultra (Agilent Technologies Inc.). Триптические пептиды разделяют, используя линейный градиент 5–80% ацетонитрила, содержащего 0.1% муравьиной кислоты в течение 60 мин и детектируют с помощью ионной ловушки в диапазоне от 200 до 1800 m/z. При напряжении на CAP в диапазоне 1800-2500V. Идентификацию белков по

MS/MS спектрам триптических пептидов проводят с помощью программы MASCOT (www.matrixscience.com), и все тандемные масс-спектры идентифицируют путем корреляции с последовательностью пептидов белков присутствующих в базе данных белковых последовательностей NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Задают следующие параметры поиска: таксон *Homo sapiens*, для гидролиза пептидных связей используют трипсин, толерантность масс для моноизотопных пептидов ± 1.5 Да, для MS/MS толерантность масс ± 0.5 Да, допускают одно пропущенное расщепление, возможность различных модификаций цистеинов акриламидом, окисление метионинов. Задают следующие критерии позитивной идентификации: минимальный скор 50 и как минимум три позитивные идентификации из трех независимых экспериментов.

ПРОТОКОЛ 5

Протеомный анализ с использованием 2D-LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra)

Реагенты:

Вода ВЖХ чистоты

Формиат аммония ХЧ

Муравьиная кислота ХЧ

Ацетонитрил ВЖХ чистоты

Пробирки для инъекции Agilent N5188-2788

1.5-2.0 мкл смеси пептидов помещают в пробирку Agilent N5188-2788 и анализируют с помощью LC-MS/MS. Ионообменную и обратнофазовую хроматографию проводят в режиме on-line.

Для проведения ионообменной хроматографии используют следующие растворители:

Раствор А: 0.1% FA в воде;

Раствор В: 1M формиат аммония, 0.1% FA в воде

Для разделения пептидов пептидов используют следующие градиенты*:

1. 0% раствора В – 10 мин
2. 1% раствора В – 10 мин
3. 2.5% раствора В – 10 мин
4. 5% раствора В – 10 мин
5. 10% раствора В – 10 мин
6. 20% раствора В – 10 мин
7. 50% раствора В – 10 мин
8. 100% раствора В – 10 мин
9. 100% раствора В – 10 мин совмещенная с нанесением 5 мкл 1M NaCl

После каждого из солевых градиентов следует разделение пептидов методом обращено-фазовой хроматографии, описанной ниже:

Обратнофазный нано-LC-MS/MS проводят, используя Agilent 1100 нано-проточную LC систему, соединенную с Agilent 1100 SL Series MSD Trap XCT Ultra (Agilent Technologies Inc.). Триптические пептиды разделяют, используя линейный градиент 5–80% ацетонитрила, содержащего 0.1% муравьиной кислоты в течение 60 мин и детектируют с помощью ионной ловушки в диапазоне от 200

до 1800 m/z. При напряжении на CAP в диапазоне 1800-2500V. Идентификацию белков по MS/MS спектрам триптических пептидов проводят с помощью программы MASCOT (www.matrixscience.com), и все тандемные масс-спектры идентифицируют путем корреляции с последовательностью пептидов белков присутствующих в базе данных белковых последовательностей NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Задают следующие параметры поиска: таксон *Homo sapiens*, для гидролиза пептидных связей используют трипсин, толерантность масс для моноизотопных пептидов ± 1.5 Да, для MS/MS толерантность масс ± 0.5 Да, допускают одно пропущенное расщепление, возможность различных модификаций цистеинов акриламидом, окисление метионинов. Задают следующие критерии позитивной идентификации: минимальный скор 50 и как минимум три позитивные идентификации из трех независимых экспериментов.

Градиенты и параметры работы приборов зафиксированы в файлах методов системы 2D-LC-ESI-Ion Trap (Agilent XCT Ultra).

ПРОТОКОЛ

Протеомного анализа с использованием 3D-LC-ESI-Ion Trap

Перед нанесением на HPLC анализ, необходимо растворить белки в муравьиной кислоте. Для чего, 100- μ L (500 μ г белка) аликвоты белка высушивают в центрифужном вакуумном испарителе и затем растворяют в 200 μ L of 80% муравьиной кислоты и озвучивают в течение 30 сек. Затем образцы снова высушивают и растворяют в 500 μ L 80% муравьиной кислоты и снова озвучивают в течение 30 с. Конечная концентрация образца должна быть 1 μ г/ μ L

в 80% муравьиной кислоты. Количество наносимого образца на HPLC может варьировать от 200 до 500 μ г белка.

После нанесения на колонку белки разделяют при повышенной температуре (80⁰C) используя комбинацию растворителей и их градиентов согласно таблице 1. Фракции белков собирают с интервалом 2 минуты. Эффективность разделения, содержание белка, карбоксиметилирование и трипсиновый гидролиз белков проводят согласно протоколам 2, 1, 3д, 3а, соответственно.

Протеомный анализ полученных пептидов с использованием LC-ESI-Ion Trap проводится согласно протоколу 4 или 5.

Таблица 1. Список растворителей и градиентов

Flow 0.75 mL/min.

Stoptime 70.0 min.

Posttime 30.0 min.

Column temp. 80.0 °C

Solvent A Water/0.1% TFA

Solvent B ACN/0.08% TFA

Solvent C ACN/20% Formic acid

Solvent D 2i-Propanol

Detection UV 280 nm

Pressure limit 250 bar

Gradient

Time (min)	%B	%C	%D
0	20	0	0
40	50	0	0
50	100	0	0
55	100	0	0
65	0	100	0
70	0	0	100
75	0	0	100
80	20	0	0

5. ЛЕЧЕНИЕ

5.1. ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ

3.1. 1. Технология получения дендритных вакцин

А. Методика культивирование дендритных клеток

Дендритные клетки получают культивированием моноцитов периферической крови человека. Цельную кровь, лейкомассу или лейкоконцентрат (продукт лейкофереза), разводят в 1,5 – 2 раза средой RPMI-1640, после чего проводят центрифугирование в градиенте Ficoll-Paque $\rho = 1,077$ в течение 40 мин при 300g. По окончании центрифугирования отбирают интерфазные кольца, содержащие мононуклеары периферической крови (МПК), переносят в чистую пробирку и разводят средой RPMI-1640. Для удаления примеси фиколла проводят центрифугирование при 300g в течение 20 мин. От тромбоцитов освобождаются 5-кратной отмывкой средой RPMI-1640 (5 мин при 110g). После этого клетки ресуспендируют в полной среде, число их подсчитывают в камере Горяева по стандартной методике, и плотность клеток доводят до 5 млн/мл.

Состав полной среды (ПС):

RPMI 1640,

сыворотка человека IV группы крови (2%),

L-глутамин (2 мМ),

HEPES буфер (10 мМ),

гентамицин (40 нг/мл),
β-меркаптоэтанол (50 мкМ),
смесь витаминов 1х.

Для получения ДК в чашку Петри d=100 мм вносят 10 мл полной среды, содержащей 50 млн МПК и инкубируют в термостате (5% CO₂, 37°C). Через 1,5 часа среду с неприлипшими клетками (преимущественно лимфоцитами) аккуратно отбирают, а к клеткам, адгезированным на пластике, (преимущественно моноцитам) добавляют свежую ПС, содержащую ГМ-КСФ (конечная концентрация 80 нг/мл) и ИЛ-4 (конечная концентрация 10 нг/мл). На 2 сутки культивирования добавляют 1 мл свежей ПС, содержащей 800 нг ГМ-КСФ и 100 нг ИЛ-4. На четвертые сутки культивирования для осуществления дифференцировки дендритных клеток производят полную замену среды на 10 мл свежей ПС, содержащей 200 нг ФНОα и 2500 нг ПГЕ₂. Через 48 часов свободно плавающие клетки собирают, определяют их количество и подвергают криоконсервации. ДК «нагружают» опухолевыми антигенами после замены культуральной среды, для этого к клеткам добавляют опухолевый лизат (2 лизированных опухолевых клеток на 1 дендритную клетку) и инкубируют в течение 2^х часов. После этого в культуру добавляют ФНОα и ПГЕ₂ для индукции дифференцировки дендритных клеток.

Качество дендритных клеток полученной вакцины оценивают при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого исследуют экспрессию основных поверхностных антигенов: CD83, CD80, CD86, CCR7, HLA-DR и др.

Б. Получение опухолевого лизата

Источником опухолевого лизата служит хирургический материал. Опухоль механически измельчают, тщательно отмывают от дебриса средой RPMI 1640. Затем определяют число опухолевых клеток, переносят в среду и замораживают в жидком азоте. Для получения опухолевого лизата клеточную суспензию замораживают и оттаивают 3 раза, помещая ампулу с клетками в жидкий азот или в теплую воду, соответственно. Разрушенные клетки осаждают центрифугированием (2 мин при 12 000g), супернатант собирают, стерилизуют фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и разливают по аликвотам. Аликвоты хранят при -20°C.

В. Криоконсервация дендритных клеток

По окончании культивирования, свежие дендритные клетки отмывают от культуральной среды, определяют количество клеток, осаждают центрифугированием, осадок клеток ресуспендируют в замораживающей среде (95% полиглюкина и 5% диметилсульфоксида) и разносят по криопробиркам. Плотность дендритных клеток составляет не более 10x10⁶ в 1 мл. Контейнер для замораживания с криопробирками помещают в пары жидкого азота. Скорость охлаждения материала составляет 1-2°C в минуту, время охлаждения 1-1,5 часа. Затем криопробирки из контейнера переносят в основное хранилище с жидким азотом, где они сохраняются до момента вакцинации.

3.2. Технология получения препарата противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов

5.2.1. Генерация противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов

Для генерации противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) у пациента, получающего вакцинотерапию дендритными клетками, производят забор 20 мл крови. Из цельной гепаринизированной крови выделяют обогащенную фракцию лимфоцитов, определяют количество клеток и вносят на чашку Петри (d=60 мм) 5x10⁶ лимфоцитов в 5 мл полной культуральной среды. К лимфоцитам добавляют 0,5x10⁶ ДК «нагруженных» опухолевым лизатом и проводят совместное культивирование. Через 5-7 дней проводят повторную стимуляцию лимфоцитов «нагруженными» ДК, при этом культуру лимфоцитов переносят в новую чашку Петри (d=100 мм) и доводят объем культуральной среды до 10 мл. Второй раунд стимуляции длится 2-3 дня. Затем пролиферирующие

лимфоциты переносят в культуральный флакон (75 см²) и добавляют 1,5x10⁶ «нагруженных» ДК, а также интерлейкин-2 (ИЛ-2) (конечная концентрация 100 МЕ/мл), объем среды доводят до 30 мл. Последующие рестимуляции проводят через каждые 2-3 дня, внося в культуру ЦТЛ «нагруженные» ДК и ИЛ-2, при этом пролиферирующую популяцию лимфоцитов следует разводить культуральной средой в 3 раза. Общее количество раундов рестимуляций зависит от того количества ЦТЛ, которое необходимо для проведения терапии больного. На последних этапах генерации ЦТЛ рестимуляцию можно проводить без дендритных клеток, добавляя в культуральную среду только ИЛ-2.

Качество цитотоксических Т-лимфоцитов оценивают при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого исследуют экспрессию поверхностных и внутриклеточных антигенов: CD3, CD4, CD8, CD25, HLA-DR, Perforin, Granzyme B и др.

5.2.2. Криоконсервация цитотоксических Т-лимфоцитов

По окончании культивирования, ЦТЛ отмывают от культуральной среды, определяют количество клеток, осаждают центрифугированием, осадок клеток ресуспендируют в замораживающей среде (95% полиглюкина и 5% диметилсульфоксида) и разносят по криопробиркам. Плотность ЦТЛ составляет не более 100x10⁶ в 1 мл. Контейнер для замораживания с криопробирками помещают в пары жидкого азота. Скорость охлаждения материала составляет 1-2⁰С в минуту, время охлаждения 1-1,5 часа. Затем криопробирки из контейнера переносят в основное хранилище с жидким азотом, где они сохраняются до момента использования.

3.3. Технология получения противоопухолевого препарата гемопоэтических стволовых и прогенеторных клеток с регуляторным протеомным профилем

3.3.1. Получение препарата аутологичных или аллогенных гаплоидентичных HLA-совместимых гемопоэтических стволовых и прогенеторных клеток гемопоэза

Получают препарат из лейкоконцентрата периферической крови близкородственного донора (матери, отца, брата ,сестры) после установления гаплоидентичности по комплексу HLA совместимости. Препарат СК изготавливался из периферической крови гаплоидентичного по HLA гистосовместимого родственника после мобилизации СК костного мозга колониестимулирующим фактором отправляют в Банк костного мозга ФГБУ Российского онкологического научного центра РАМН им.Н.Н.Блохина. Затем из мобилизованных стволовых клеток изготавливается препарат гемопоэтических стволовых клеток (CD34+) , путем сепарации данного типа СК сепарацией на магнитных шариках. Для увеличения количества гемопоэтических стволовых клеток донор получает 8 подкожных инъекций гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора 9G-CSF) с интервалами 10-12 часов в течение 4 дней. За первые три дня пациент получает по 2.5 мкг на кг с каждой дозой; в последний день доза удваивается (5 мкг на кг). Каждый день проводится общий анализ крови, а на 4-й день – ультразвуковое исследование печени и размера селезенки. Сбор стволовых клеток проводится на 5 день после начала стимуляции при помощи сепаратора крови с одноразовой системой для сепарации и стандартных растворов. Процедура занимает 3-4 часа в зависимости от скорости, веса донора и результатов анализа крови. Доступ к венам осуществляется пунктированием двух периферических вен либо через двухпросветный центральный подключичный катетер. Кровь донора идет по вене и обрабатывается в сепараторе. Определенное количество клеток CD 34+ сепарируется и другие компоненты крови возвращаются по другой вене. Среднее количество собранного материала составляет 300-400 мл. Собранный материал оценивается по двум параметрам: 1) общее число клеток с ядрами 2) число клеток CD 34+ . Количество ядерных клеток в сепарате определяется до любой манипуляции. Процентное соотношение клеток CD 34+ в клеточной суспензии определяется и сепарируется методом поточной цитометрии. При каждом введении пациент с ГБ ГМ получает от 6x10⁶ до 8x 10⁶ CD 34+ аллогенных ГСК . В дальнейшем при культивировании и сепарации на магнитных шариках осуществляется выделение CD 34 + стволовых клеток. Возможно получение CD34+ ГСК путем магнитосепарации на аппаратном комплексе « CLINIMAX» по стандартной технологии производителя прямо в операционной.

5.1.2. Получение препарата аутологичных регуляторных гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток с ремоделированным протеомным профилем

У пациентов с ГБ ГМ осуществляется забор ГСК и аналогичное выделение CD 34 + стволовых клеток как в п. 5.1.1. Существенных отличий в процедуре мобилизации, сбора, иммуносепарации, сертификации и криоконсервации ГСК и клеток предшественников гемопоэза нет. Сертифицированный препарат содержащий CD 34 + стволовые и прогениторные клетки собирается в стандартные пластиковые мешки для сбора клеток костного мозга в которые добавляют протеом-ремоделирующий агент (ПРА), т.е. рекомендованное специалистами лаборатории онкопротеомики ФГБУ РОНЦ РАМН определенное низкомолекулярное химическое соединение или белок и осуществляют с ПРА экспозицию CD 34 + ГСК и КП гемопоэза с ним в течение рекомендованного времени (но не более 3 часов). Затем центрифугируют клеточный препарат, удаляют надосадочную жидкость и двухкратно «отмывают» полученный клеточный препарат физиологическим раствором 0,9% NaCl, удаляют физиологический раствор, разделяют на 20 аликвот по $5-6 \times 10^6$ клеток и криоконсервируют в ДМСО в парах жидкого азота в програмном замораживателе со скоростью 1 градус в минуту.

5.1.3. Алгоритм диагностики и получения протеом-ремоделирующего агента

В целях диагностики индивидуализированного протеом-моделирующего агента для получения терапевтических аутологичных или аллогенных клеточных систем требуется диагностировать ключевые белки в протеомных профилях НСК, ГСК, МСК и раковые стволовые клетки (РСК) для дальнейшего их использования. Необходимо провести биоинформационные исследования протеомов НСК, МСК, РСК и **выявить (диагностировать) ключевые белки**, которые будут использованы для последующего ремоделирования протеома этих клеточных систем и получения специализированного клеточного фенотипа, обладающего индивидуализированным секретомом, способным осуществлять таргетное (целенаправленное) регуляторное воздействие на экспрессию генов раковых стволовых клеток (РСК) через нетрансформированные опухолевым процессом рецепторы (белки –мишени) мембран и белки внутриклеточных путей сигнальной трансдукции РСК ГБ ГМ (глиомасферы) или метастатической опухоли головного мозга.

Для этого необходимо:

1. Картированные и профилированные белки НСК (1 группа), МСК (2 группа) и ГСК (3 группа) сравнить их с белками РСК (4 группа) ГБ ГМ (МО Ги СМ), а также изучить соотношения белков ПП НСК и ПП МСК с РСК конкретной опухоли
2. Установить белки идентичные в сравниваемых группах здоровых СК и в 4 группе, а также вычислить матрицу подобия белков (МПБ) НСК с РСК(МПБ№1) и матрицу подобия МСК с РСК(МПБ №2) и МПБ ГСК и РСК (МПБ№3);
3. Исключить из матриц подобия белков (МПБ№1, МПБ№2, МПКБ №3) малофункционально значимые и онкоспецифичные белки;
4. Выявить ключевые белки в МПБ №1, МПБ №2, МПКБ №3 которые могут быть использованы в ремоделировании ПП и фенотипа ГСК, НСК и МСК;

А. Информационный биоматериал:

1. Картированный и профилированный протеом НСК, выделенной из обонятельной выстилки носа пациента;
2. Картированный и профилированный протеом мезенхимальной стволовой клетки (МСК) и гемопоэтической стволовой клетки (ГСК), выделенной из костного мозга пациента;
3. Картированный и профилированный протем РСК, выделенной из ткани опухоли.

В. Методология информационной обработки картированных протеомов СК для получение матрицы подобия белков протеомов РСК и НСК или РСК и МСК и РСК и ГСК

I. «Грубый» информационный анализ белков ПП сравниваемых групп и исключение из протеомов онкоспецифических и малофункционально значимых протеинов СК

1. Исключаем из исследуемых протеомов СК все белки, концентрация которых не выявлена в сравниваемых группах белков: группа сравнения А - НСК и РСК, группа сравнения Б - МСК и РСК, группа сравнения В –ГСК.

2. Исключаем из анализа каждой из групп сравнения все белки изменения нормализованной сигнальной интенсивности (НСИ) у которых изменились менее чем в 2 раза;

3. Путем сравнения белков протеомов группы сравнения А (НСК и РСК) удаляем из протеома МПБ №1 все известные онкоспецифичные белки

4. Путем сравнения протеомов группы сравнения Б (МСК и РСК) удаляем из протеома МПБ № 2 все известные онкоспецифичные белки

5. Путем сравнения протеомов группы сравнения В (ГСК и РСК) удаляем из протеома МПБ № 3 все известные онкоспецифичные белки

II. «Тонкий» информационный анализ белков МПБ №1, МПБ №2, МПБ №3 с использованием информационных баз данных протеомов и исключение из ПП МПБ протеины, участвующих в канцерогенезе ГБ ГМ и опухолевом метаболизме

1. Используя стандартные базы данных протеомов, удаляем из профиля МПБ№1, МПБ№2 и МПБ № 3 все известные белки, участвующие в канцерогенезе ГБ ГМ: рецепторные онкоспецифичные белки мембраны, онкоспецифичные белки, экспрессируемые мутантными генами и т.д.;

1. Исключаем из МПБ№1, МПБ№2 и МПБ № 3 митохондриальные белки и белки, ассоциированные с метаболизмом НСК и ОСК: белки, обеспечивающие быстрое воспроизводство АТФ для поддержки энергетического статуса, быстрый синтез макромолекул, белки дыхательной цепи, белки эффекта Варбурга и другие белки метаболизма.

2. Исключаем из МПБ№1, МПБ№2 и МПБ № 3 белки, ассоциированные с нарушенными путями сигнальной трансдукции характерными для ГБ ГМ или МО Г и СМ

3. Исключаем из МПБ№1, МПБ№2 и МПБ № 3 белки клеточного каркаса (белки цитоскелета, белки эндоплазматического ретикулаума);

4. Исключаем из МПБ№1 и МПБ№2 белки клеточного цикла исследуемых соматических клеток и обеспечивающих СК выполнение её эффекторных функций: митоза, ангиогенеза, пролиферации, апоптоза, миграции, метастазирования и т.д.

III. Распределение оставшихся белков МПБ№1, МПБ№2 и МПБ № 3 на функционально значимые для внутриклеточной и межклеточной регуляции протеиновые кластеры – цели

1. *Первый кластер «Рецепторные цели»:* Выделяем из оставшихся белков протеомного профиля НСК и РСК группу белков расположенных преимущественно в (на) мембранах НСК, МСК и ОСК. Составляем сводную таблицу и делаем графический профиль этих взаимоотношений..

2. *Второй кластер «Ядерные цели»:* Выделяем из оставшихся белков протеомного профиля РСК и НСК, а также РСК и МСК и РСК и ГСК группу белков содержащихся преимущественно в ядрах этих клеток. Составляем сводную таблицу и делаем графический профиль этих взаимоотношений

3. *Третий кластер «Белки сигнальной трансдукции и межклеточной регуляции»:* Выделяем белки, секретируемые НСК, а также секретируемые МСК и ГСК. Составляем сводную таблицу секретируемых белков НСК и МСК.

IV. Выявление высокофункциональных информационных взаимоотношений белков в сравниваемых группах МПБ1, МПБ2, МПБ № 3

1. С использованием современных баз данных белковых сетей сравниваем белки всех трех кластеров и выявляем информационные взаимоотношения белков этих кластеров в структуре известных сигнальных путей и доказанные (по данным литературы или экспериментов) связи между белками всех трех кластеров;

2. Табличным и графическим методами представляем локализацию выявленных белков из разных кластеров МПБ №1, МПБ№2, МПБ № 3 в единой информационной структуре физиологических сигнальных путей, не подвергшихся злокачественной трансформации;

3. Диагностируем основные сигнальные пути, не подвергшиеся злокачественной трансформации для разработки персонифицированной стратегии регуляции РСК для НСК, ГСК и МСК с индивидуализированным протеомом;

V. Этапы выделения ключевых белков в НСК, ГСК или МСК

1. Картируем и профилируем в графическом и табличном виде оставшиеся белки МПБ№1, МПБ№2, МПБ № 3 конкретных сигнальных путей не подвергшихся злокачественной трансформации с распределением по функциональным кластерам для каждого типа СК

2. Выделяем в каждой МПБ (№1, №2, №3) белки у которых имеется самая большая разница НСИ (но не более 10 белков в каждой МПБ)

3. Выделяем эти белки и даем их описание и функцию

VI. Компьютерное моделирование и проектирование протеома клеточного препарата НСК, ГСК или МСК для терапевтического воздействия на РСК

1. Моделируем терапевтическое воздействие на протеом РСК секрета НСК, ГСК или МСК: представляем и описываем функции всех белков НСК, ГСК или МСК, задействованные сигнальные пути, вовлеченные гены и их ответ в форме конкретного секрета, описываем регуляторный секрет НСК и ГСК;

2. Моделируем воздействие на РСК: какие белки рецепторов будут подвержены воздействию, какой сигнальный путь будет активирован в РСК, какие гены среагируют, что получим в результате воздействия –должны получить нестабильность генома РСК;

3. Устанавливаем протеом –ремоделирующий агент и выдаем рекомендации по персонифицированному ремоделированию протеома.

4. Устанавливаем наличие рекомендуемого протеом ремоделирующего агента и определяем по базам данным время экспозиции для проведения ремоделирования и дозу данного биохимического соединения.

5.2. ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ

А. Подготовка клеточного препарата к трансфузии и его применение. Размораживание стволовых клеток.

Размораживание производится непосредственно перед трансплантацией у постели больного в водяной бане при температуре 37 - 40 °С до момента перехода замороженного материала в жидкую фазу. В дальнейшем путем центрифугирования при 1500 об/мин. ПГСК осаждают на дно центрифужной пробирки, отсасывают надосадочную жидкость и заливают 1 мл 0,9% физиологического раствора NaCl. Процедуру повторяют дважды. Препарат аутологичных стволовых клеток в размороженном состоянии может применяться в течение 6 часов после приготовления. Если препарат за это время не использован, то он подлежит утилизации.

Б. Трансфузия размороженных аутологичных гемопоэтических клеток

Инtrateкальное введение препарата аллогенных ГСК или аутологичных ГСК с ремоделированным протеомным профилем (РПП)

Инtrateкальное введение препарата гемопоэтических ГСК с РПП должно производиться только в условиях нейрореанимационного отделения. Трансфузия аутологичных ГСК осуществляется через люмбальный прокол, выполненный в типичном месте (в L3-L4 промежутке) под местной анестезией 1% раствора лидокаина. Затем забирают 3 мл ликвора и смешивают с 100 мкл клеточного препарата (максимальный объем до 1 мл), ресуспензируют клеточный препарат в ликворе и медленно вводят в субарахноидальное пространство. Накладывают асептическую повязку. При необходимости повторяют инtrateкальные трансфузии СК через 2-3 недели. Для коррекции возможных аллергических реакций с профилактической целью делается однократное внутримышечное введение кортикостероидных препаратов (4 мг дексаметазона).

Интравентрикулярное введение препарата аллогенных ГСК и аутологичных ГСК и НСК с РПП.

По стандартной методике путем открытой нейрохирургической операции пациенту в боковые желудочки мозга устанавливается интравентрикулярный порт. Трансфузию ГСК или НСК с РПП у неврологических больных осуществляют в перевязочной нейрохирургического отделения стационара. После имплантации порта проверяется отсутствие крови в желудочках мозга путем чрезкожной пункции порта специализированными тонкими иглами. Затем забирают 1-2 мл ликвора и смешивают с 100 мкл клеточного препарата (до 1 мл), ресуспензируют клеточный препарат в ликворе и медленно вводят через порт в интравентрикулярное пространство. Для коррекции возможных аллергических реакций с профилактической целью делается однократное внутримышечное введение кортикостероидных препаратов (4 мг дексаметазона). Повторные введения препарата ГСК с РПП можно производить только после полной санации спинномозговой жидкости, подтвержденное лабораторными данными.

5-3. РАННИЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ПРЕПАРАТА

Ведение пациента осуществляется круглосуточно, в течение 7 дней после клеточной трансплантации. Реаниматолог вместе с лечащим врачом должны осуществлять контроль состояния пациента для оценки степени риска развития возможных осложнений. Кроме того, показано наблюдение нейрохирурга или невролога, которые должны работать в тесной кооперации с гематологами, трансплантологами, иммунологами и врачами-лаборантами.

Основными критериями эффективности проведенного вмешательства является улучшение неврологической симптоматики. Срок ожидаемого результата крайне индивидуален для каждого пациента и зависят от объема опухоли головного мозга, давности заболевания, степени компенсации нарушенных функций. Предполагаемая эффективность терапии от 30 дней до 12 - 16 месяцев после трансфузий ПСК с НК, и оцениваются клиническими шкалами (Шкала Карновского и шкала ВОЗ) и нейрофизиологическими методами исследования (церебральным картированием ЭЭГ, транскраниальной магнитной стимуляцией, соматосенсорными вызванными потенциалами и электонейромиографией).

6.ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Наличие возможных осложнений данного метода заставляет проводить инtrateкальные и интравентрикулярные трансфузии только в условиях нейрореанимации стационарного нейрохирургического отделения. Возможные осложнения, их профилактика, диагностика и лечение суммированы в таблице № 1. При возникновении осложнений необходимо:

1. Исключение местных воспалительных процессов.

2. Исключение внутричерепной гипертензии (глазное дно, ЭхоЭГ, нейровизуализация).
3. Исключение коагулопатий, тромбоцитопении, исключение введения гепарина за 6 часов до пункции.
4. Неблагоприятные явления и отклонения от нормы лабораторных показателей

6.1. Клинические неблагоприятные явления

Неблагоприятное явление - это любое негативное клиническое проявление, которое наблюдается у больного или участника исследования, получающего фармацевтический препарат, и не обязательно связано с применяемым лечением. Таким образом, к неблагоприятным явлениям относятся любые неблагоприятные и нежелательные признаки (в том числе отклонения от нормы лабораторных показателей), симптомы и заболевания, связанные по времени с применением лекарственного препарата, независимо от их отношения к данному лекарственному препарату. Клинические состояния, наблюдавшиеся до лечения и обострившиеся в период исследования, также регистрируют как неблагоприятные явления.

Степень выраженности неблагоприятных явлений устанавливают по четырехбалльной шкале (слабая, умеренная, тяжелая, угрожающая жизни)

- Слабая - вызывает дискомфорт, но не мешает нормальной повседневной активности
- Умеренная - дискомфорт, снижающий или отрицательно влияющий на повседневную активность
- Тяжелая - нетрудоспособность или невозможность выполнять нормальные повседневные действия
- Угрожающая жизни - представляет непосредственную угрозу, жизни.

Необходимо оценить отношение отмеченного неблагоприятного явления к лечению.

Отклонения от нормы лабораторных показателей

Отклонение от нормы лабораторного показателя как таковое не регистрируют в качестве неблагоприятного явления, если оно не связано с клинически значимым состоянием, по поводу которого больному назначено или изменено ранее назначенное сочетанное лечение, не является серьезным неблагоприятным явлением и это не повлекло отмены лечения

Учитывая специфику опытной популяции, у ряда больных можно ожидать прогрессирования основного заболевания. Возможна госпитализация по поводу прогрессирования заболевания, не связанного с лечением, госпитализация для проведения радиотерапии или хирургического вмешательства в целях предупреждения не связанного с лечением сдавления головного мозга).

Неблагоприятные явления, особенно те из них, для которых отношение к использованию клеточной иммунолипосомальной химиотерапии не определено как "связь отсутствует" прослеживают до возвращения к исходному состоянию или стабилизации. .

Беременность

Женщины, участвующие в исследовании, должны быть предупреждены о необходимости прекращения применения опытных препаратов и немедленного извещения исследователя в случае беременности. Исследователь должен проконсультировать больную относительно опасности продолжения беременности и возможных воздействиях на плод.

6.2. Критерии досрочного прекращения участия в исследовании

Больные имеют право выйти из исследования в любое время независимо от причины. Исследователь также вправе вывести больного из исследования в случае интеркуррентного заболевания, неблагоприятных явлений, неэффективности назначенного лечения, нарушения условий протокола, по административным и другим причинам. Слишком большой отсев может повлиять на результаты анализа; в связи с этим рекомендуется избегать необоснованного отсева больных. После выхода больного из исследования необходимо провести полное заключительное обследование и зарегистрировать причину отказа больного от продолжения участия в исследовании.

6.3. Особые указания и предупреждения

На момент утверждения данного протокола исследования не имеется каких-либо особых указаний или предупреждений относительно применения клеточной иммунолипосомальной радиоизотопной диагностики и химиотерапии

6.4. Дополнительная терапия

Дополнительные медицинские препараты/нелекарственная терапия будут перечислены в списке.

6.5 Критерии оценки

Общий неврологический отклик будет клинически оцениваться согласно критериев оценки эффективности и регистрироваться в ОФП.

Неврологическая оценка проводится на исходном уровне и позже в соответствии с расписанием посещений. Исследователи будут проводить оценку неврологического отклика каждый раз согласно пунктам 3.5.2. и 3.5.3 после исходной оценки.

Будет делаться обзор схем неврологических откликов. После обзора и МРТ, проводимой для оценки отклика по морфологическим изменениям, будет выражено суждение о неврологическом отклике.

Исходы по первичной эффективности следующие:

А) пропорция «объективных» реакций:

Это число будет вычисляться делением количества больных, демонстрирующих на МРТ «объективную» реакцию на имплантат на общее число пациентов в популяции. Для каждого пациента будет рассматриваться лучший результат, наблюдаемый когда-либо во время лечения исследуемым экспериментальным методом

Б) пропорция «клинических» реакций:

Это число будет вычисляться делением количества пациентов, демонстрирующих «клиническую» реакцию на общее число пациентов в популяции. Считается, что у пациентов есть клиническая реакция, если у пациента есть объективная реакция или он отвечает, по крайней мере, ОДНОМУ из следующих критериев:

А) Однозначное улучшение по ДР и РР показателям

Б) Однозначные признаки исчезновения (уменьшения) опухоли на МРТ

В) Однозначное улучшение по параклиническим критериям (ЭЭГ, иммунохимия крови и ликвора и тд.)

Интервалы доверия (двухсторонние, 95%, пределы Пирсона-Клоппера) будут рассчитываться для показателей респондентов.

Исходы вторичной эффективности следующие:

А) Общее выживание

Будет вычисляться с первого дня лечения до дня смерти от любой причины.

Б) Показатель конверсии к функциональной независимости

Будет вычисляться с первого дня лечения до дня задокументированного улучшения неврологических функций или до дня смерти по любой причине, в зависимости от того, что произойдет первым.

Будут представлены шаблоны выживания для общего выживания (шаблон Каплан-Майера) и интервал без болезни (актуарный метод).

6.6. Оценка безопасности

• Побочные явления

Оценка Безопасности основывается в основном на частотности побочных явлений, особенно тех, которые приводят к прерыванию лечения и на количестве отклонений в лабораторных показателях.

Побочные явления будут обобщены в виде общего числа и процентного соотношения пациентов с побочными явлениями организма, тип побочного явления и максимальная тяжесть согласно степени. Побочные явления ОКТ, приведшие к смерти, прерыванию исследования, либо так или иначе классифицируемые как ограничение дозировки, будут представлены отдельно.

• Лабораторные данные

Лабораторные данные будут обобщаться согласно ОКТ NCI/NIH критериям (см. Приложение 6)

• Неврологический статус/вес тела

Изменения в неврологическом статусе по сравнению с исходными данными (первое посещение) и изменения в весе будут обобщаться через определенные интервалы. Будут представлены таблицы обобщающей статистики через определенные интервалы.

• Боль

Изменения в комбинированных показателях боли и показателях интерференции боли будут вычисляться через определенные интервалы. Будут представлены таблицы обобщающей статистики через определенные интервалы.

Использование анальгезирующих препаратов

- Будут представлены таблицы сменности для обобщения изменений в использовании анальгезирующих препаратов по сравнению с исходными данными через определенные интервалы.

6.7 Выполнение лечения

Имплантат вводится во время хирургической процедуры главным исследователем либо одним из коллег. Центр должен вести индивидуальные записи для каждого пациента. Количество единиц имплантата распределенных, полученных и возвращенных должно быть записано и определено. Данные должны храниться в течение 5 лет после окончания лечения.

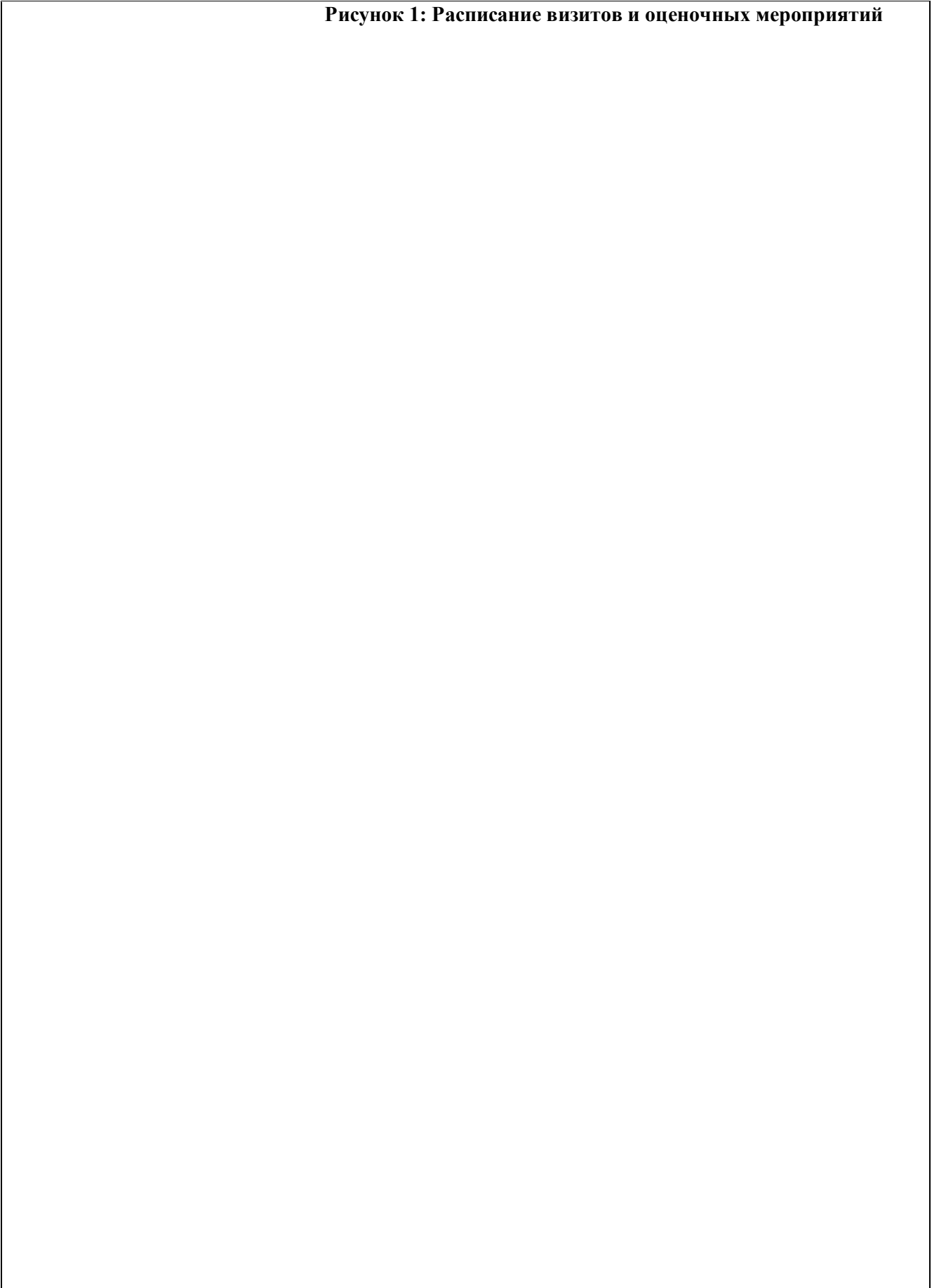
7. Расписание визитов и оценочных мероприятий

7.1. Расписание визитов

Пациенты должны наблюдаться в центре исследований в соответствии с расписанием, отображенным на Рис. 1.

Для всех групп лечения, исследование состоит из трех фаз: скрининг, имплантация препарата АСК с НР, динамическое наблюдение лечения в течение 12 недель. Оценочные мероприятия на стадии скрининга проводятся в течение 30 дней до начала фазы лечения.

Рисунок 1: Расписание визитов и оценочных мероприятий



Фаза	Скрин иг(1)	Неделя лечения																
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12(2)	16(5)	20(5)	24(5)	26
Неделя	-30/20 дней	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12(2)	16(5)	20(5)	24(5)	26
Визит /Доклад No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	15/18
Трансплантация ПСК из НК		X																
Письменное инфор.согласие	X																	
Критерии включения/исключения	X																	
Тест на беременность (если)	X	X																X
Демографические данные/ релевантная медицинская история /текущая	X																	X
Забор крови и хранение	X																	
Забор глии обонятельной выстилки и криоконсервация (3)	X																	
Сбор стволовых клеток CD34+ и криоконсервация (4)	X																	
Запись о введении (5)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Неврологический осмотр	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Осмотр глазного дна	X				X				X				X					X
Соматосенсорные и вызванные моторные потенциалы	X			X	X			X	X		X		X	X	X	X	X	X
Иммунохимия крови и ликвора	X				X			X			X			X	X	X	X	X
Электрокардиограмма	X				X			X			X			X	X	X	X	X
Эхокардиограмма	X							X						X				X
Анализ ликвора	X	X	X	X	X			X			X			X	X	X	X	X
Физический осмотр/ показатели витальных функций	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Показатели боли/ анальгезирующие показатели	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
МРТ головного и спинного мозга с параметрическим	X			X	X			X			X			X	X	X	X	X
Нейроспецифические Ag и Ab	X				X			X			X			X	X	X	X	X
Гематология	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Биохимия крови	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Серология	X				X			X			X			X	X	X	X	X
Побочные эффекты		Постоянный сбор данных																
Дополнительные препараты/ терапии	X	Постоянный сбор данных																
Комментарий	X	Постоянный сбор данных																
Завершение исследования															x(2)			x(5)

(1) скрининговые оценочные мероприятия могут проводиться за 30 дней до начала лечения. (2) Завершение лечения для групп 1 и 2; завершение нахождения в реабилитационном центре. Можно завершить в любое время, если исследование прервано (3) МРТ должно быть сделано в течение 30 дней до начала фазы лечения. Должно быть МРТ головного и спинного мозга с и без парамагнитного усиления, T₁, T₂ и спектроскопических последовательностей.

7.2 Скрининговые оценочные мероприятия

До начала каких-либо медицинских процедур от пациента должно быть получено информированное согласие.

Лабораторные скрининговые анализы, физический осмотр, включая оценку неврологического статуса по международным шкалам. Показатели витальных функций и вес, должны быть выполнены за 30 дней до начала исследования.

До сбора периферической крови для женщин репродуктивного возраста должен быть проведен анализ сыворотки на беременность.

Все результаты должны быть зафиксированы в Отчетной Форме Пациента (ОФП) (визит №1).

Исследуемый имплантат доставляется пациенту во время процедуры имплантации.

7.3. Оценка эффективности

Параметры первичной эффективности – улучшение неврологических функций

Оценка неврологического статуса

Неврологический статус оценивается при стандартном неврологическом осмотре.

Желательно, чтобы скрининговые посещения и посещения на фазе лечения проводились разными специалистами. Будет принято ослепление предыдущего клинического отчета.

Неврологический отклик будет оцениваться каждую неделю при осмотре неврологом. Неврологический отклик будет регистрироваться в соответствии с оценками по международным шкалам в динамике в течении года.

7.4. Оценка безопасности

Оценка безопасности состоит из оценки побочных явлений (ПЯ) и серьезных побочных явлений (СПЯ), лабораторных параметров, включая гематологию, биохимию, нейроспецифические антигены и антитела. Показатели витальных функций, физический и неврологический осмотры. Документирование всех дополнительных лекарственных препаратов и/или терапий. Токсичность оценивается по Общим Критериям Токсичности NCI, версия 2.0 (см. Приложение 1).

Побочные явления

Информация по всем побочным явлениям, представленная пациентом, выявленная исследователем во время опроса, выявленная во время физического осмотра, лабораторного тестирования или другими методами, регистрируется в форме отчета по побочным явлениям (ПЯ) и надлежащим образом наблюдается. Побочным явлением называется любой нежелательный признак, симптом или медицинское состояние, возникшее после начала лечения в рамках исследования, даже если явление не считается вызванным принимаемым лечением.

Медицинские заболевания/состояния, наблюдающиеся до начала лечения в рамках исследования считаются побочными явлениями только в том случае, если они ухудшаются после начала лечения. Побочные явления (но не СПЯ), наблюдаемые после начала лечения в рамках исследования, но после

подписания информированного согласия, регистрируются в Истории болезни/ Отчетной форме пациента по текущим медицинским состояниям, только если пациент получает лечение в рамках исследования. Отклонения в результатах лабораторных анализов считаются побочным явлением, только если они вызывают клинические признаки или симптомы или требуют лечения, когда они зарегистрированы в Отчетной Форме по Побочным Явлениям как признаки, симптомы или диагнозы с ними связанные.

Насколько возможно, описание каждого побочного явления также должно включать:

1. Продолжительность (даты начала и конца, либо продолжение на время окончательного осмотра)
 2. Степени тяжести 1-4 по Общим Критериям Токсичности (ОКТ) NCI/NIH (см. приложение 1)
 3. Связь с имплантатом (предполагаемая/не предполагаемая)
 4. Предпринятые действия
- Любое ПЯ, возникшее ко времени завершения исследования (в течение 12 недель после имплантации) должно быть зарегистрировано на странице ПЯ ОФП.

Серьезные побочные явления

Информация по всем серьезным побочным явлениям должна быть зарегистрирована в Отчетной Форме по Серьезным Побочным Явлениям (СПЯ). Для гарантии безопасности пациента о каждом серьезном побочном явлении необходимо доложить Главному Исследователю и ЗАО Клиника «НейроВита», в течение 24 часов, после того как стало известно о данном побочном явлении. Серьезное побочное явление, в целом определяется как неблагоприятное явление, которое:

1. Смертельно
2. Угрожает жизни
3. Требуется госпитализации или продления госпитализации
4. Привело к значительной или длительной инвалидизации или к ограничению дееспособности
5. Составляет врожденную аномалию или врожденный порок развития

НЕ являются Серьезными Побочными Явлениями те явления, которые требуют госпитализации по следующим причинам:

- Рутинное лечение или мониторинг исследуемого показателя, не связанного с каким-либо ухудшением состояния
- Факультативное или заранее запланированное лечение по поводу ранее существовавшего расстройства, не связанного с исследуемым заболеванием.
- Прием в стационар, либо другое учреждение по поводу общего состояния, не связанного с каким-либо ухудшением.
- Срочное лечение, амбулаторное по поводу явления, не подпадающего под вышеуказанное определение серьезного ПЯ и не приводящего к госпитализации.

В отличие от обычных оценок безопасности, СПЯ наблюдаются постоянно и должны отвечать особым требованиям отчетности.; см. раздел 9.1.

Любое СПЯ, возникшее после информированного согласия и в течение четырех недель после завершения исследования должно быть зарегистрировано и о них должен быть представлен отчет.

Все побочные явления должны получить соответствующее лечение. В такое лечение могут входить изменения в исследовательском лечении, в том числе возможный перерыв или прекращение, прием или отмена дополнительных медикаментов, госпитализация или любое другое медицинское вмешательство. Когда определено побочное явление, его необходимо наблюдать до его разрешения при каждом визите, или, если необходимо чаще. Любые изменения должны оцениваться по тяжести, предполагаемой связи с исследуемым препаратом, необходимым интервенциям, направленным на купирование и исходу.

Информацию об обычных побочных явлениях, уже известных об исследуемом имплантате, можно найти в брошюре исследователя. Эта информация должна прилагаться к информированному согласию пациента и ее необходимо обсуждать с пациентом во время исследования, по мере необходимости.

Беременность

Любая беременность или отцовство, происходящее во время применения препарата АСК С НК, и в течение 26 недель после процедуры имплантации, должна быть зарегистрирована в ОФП.

Если отец получил имплантацию РМ™, необходимо получить от матери информированное согласие о предоставлении информации об исходе беременности.

За детальными инструкциями по заполнению и отправке Отчетной Форме по серьезным побочным явлениям пациента и беременности пациента в ТОТАЛ РЕКОРД, обращайтесь в разделы 9.1.1/9.1.2, отчет о серьезных побочных действиях и беременности.

Лабораторные анализы.

Учреждение проведет лабораторные анализы согласно Расписанию Посещений (См. рис. 1). Спонсору необходимо предоставить копию лабораторного сертификата, и табуляцию пределов норм для каждого параметра. Кроме того, если у пациента когда-либо будут проводиться лабораторные анализы, в другой внешней лаборатории, спонсору необходимо предоставить копию сертификата и табуляцию пределов норм для той лаборатории.

В любое время в течение исследования, отклонения в лабораторных анализах, которые клинически релевантны (напр. приводят к клиническим признакам или симптомам или требуют медицинского вмешательства), независимо от наличия или отсутствия специфических требований в протоколе, должны быть учтены на соответствующей странице комментариев ОФП, помимо соответствующей страницы лабораторных исследований. Если отклонения результатов лабораторных значений или тестов составляют побочное явление (напр. вызывают клинические признаки/симптомы или требуют лечения), они должны быть отражены в ОФП Побочные Явления.

Периферическая кровь

• Гематология

Гемоглобин, гематокрит, количество эритроцитов, общее количество лейкоцитов, количество тромбоцитов. Определение лейкоцитарной формулы, включая нейтрофилы, лимфоциты (в том числе количество Т и В), моноциты, базофилы, эозинофилы.

Анализ времени кровотечения, агрегации тромбоцитов, ПВ и АЧТВ. Во время скринингового посещения необходимо определить и зафиксировать в Отчетной форме пациента группу крови и резус фактор.

Любое отклонение должно быть отражено в Отчетной форме по побочным явлениям пациента. Помимо этого, в течение 6 часов после сбора периферической крови рекомендуется проводить гематологические анализы безопасности. Эти анализы регистрируются в ОФП каждое посещение.

• Биохимия

Глюкоза, Натрий, Калий, Кальций, Железо, осмолярность, мочевины или азот мочевины крови, креатинин, общий белок, альбумин, протеина электрофорез, билирубин (общий, прямой и непрямой), щелочная фосфатаза, γ -ГТ, АСТ (сывороточная глутаминовая щавелево-уксусная трансминаза), АЛТ (сывороточная глутаминовая пировиноградная трансминаза) и ЛДГ.

Кроме того, в течение 6 часов после сбора периферической крови рекомендуется проводить биохимические анализы безопасности. Эти анализы регистрируются в ОФП каждое посещение.

- **Серология**

Нейроспецифические антигены (GFAP, NSE, MBP). Нейроспецифические антитела (Анти-GFAP, анти-NSE, анти- MBP).

Инфекционные агенты (CMV, HSV, VZV, EBV, VDRL, HIV-1-2, HTLV-1-2, Гепатит В и С, Токсоплазма, Листерия)

Реакция Вассермана, Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на инфекции, анти-HBV, анти-HCV, анти-HIV1-2 антитела.

Иммунофенотипы: CD3, CD4, CD8, CD4/CD45RO, CD3-CD16/CD56+, CD19, CD14, IgG, IgA, IgM.

Результаты серологических тестов будут сравниваться с результатами, полученными во время скрининга.

Цереброспинальная жидкость

Глюкоза, протеины, количество клеток, полимеразная цепная реакция (ПЦР) на инфекции.

Нейроспецифические антигены (GFAP, NSE, MBP)

Нейроспецифические антитела (Анти-GFAP, анти-NSE, анти- MBP).

Моча

Глюкоза, протеин, кровь, билирубин, кетоновые тела, нитриты, PH, осмолярность, посев.

Физический осмотр/показатели витальных функций

Физический осмотр, включая показатели витальных функций, проводится согласно Расписанию посещений и оценочных мероприятий. Информация о физическом осмотре и витальных показателях должна быть отражена в исходной документации на месте исследования. Значимые находки, выявленные до начала приема исследуемого препарата должны быть отражены в разделе Релевантная История Болезни/Текущие Медицинские Состояния ОФП. Значимые находки, выявленные после начала исследования, соответствующие определению побочных явлений должны быть отражены в разделе Побочные Явления ОФП. Не предполагаются записи в ОФП для отражения нормальных находок во время физического осмотра и определения витальных показателей.

Вес тела.

Измерения веса тела производятся согласно Расписанию Посещений (См. Рис. 1). Пациентам рекомендуется также регистрировать свой вес еженедельно и сообщать исследователю об изменениях в весе на 2 кг и более по сравнению с начальным показателем.

Показатели болей/анальгезирующие показатели

Боль оценивается по болевым показателям с использованием шкалы Краткого Реестра Болей (КРБ) (см. Приложение 4). КРБ выделяет три болевых показателя: тяжелейшая боль, комбинированный показатель боли, показатель интерференции боли. В данном исследовании будет использоваться комбинированный показатель боли, то есть среднее значение ответов на вопросы № 3, 4, 5 и 6 и интерференция боли, то есть среднеарифметическое семи пунктов интерференции.

Использование анальгезирующих препаратов оценивается согласно анальгезирующим показателям (Приложение zz)

Регистрация вводимых доз

Общее количество имплантируемого клеточного препарата регистрируется по весу и объему, количеству стволовых клеток и количеству СК или иммунокомпетентных клеток использованному для приготовления данного препарата.

6. Поправки к протоколу/изменения в проведении исследования

Любые изменения или добавления (за исключением административных) в данном протоколе должны быть оформлены в виде письменных поправок к протоколу. Поправки, значительно влияющие на безопасность пациента, объем исследования или научное качество исследования требуют дополнительного согласования и с Исследователями и с ЗАО Клиника «НейроВита» можно привести в пример такие поправки как:

1. значительные изменения в дизайне исследования
2. увеличение количества инвазивных процедур
3. увеличение либо сокращение процедур тестирования, требующихся для мониторинга безопасности.

Эти требования согласования ни коим образом не должны препятствовать каким-либо действиям Исследователей или ЗАО Клиника «НейроВита», в интересах безопасности всех пациентов, включенных в исследование. Если у Главного Исследователя есть необходимость в срочных изменениях в протоколе и эти изменения осуществляются, в целях безопасности, ЗАО Клиника «НейроВита» должны быть извещены об этом незамедлительно. Поправки, влияющие только на административные аспекты исследования, не требуют формальных поправок к протоколу. Примеры административных изменений, не требующих формальных поправок к протоколу включают в себя:

1. изменения в штате администрации (напр. в штате ЗАО Клиника «НейроВита».)
2. небольшие изменения в критериях включения/исключения, используемые для отбора пациентов в исследование
3. небольшие изменения в упаковке или маркировании исследуемого имплантата.

9. Обработка данных

Будет производиться представителем ЗАО Клиника «НейроВита».

9.1 Сбор данных

Исследователи должны вводить информацию, необходимую по протоколу в предоставленную ОФП. Детали неврологического отклика должны быть детально задокументированы в истории болезни пациента.

9.2. Обработка базы данных/контроль качества

Данные из ОФП вводятся в базу данных исследования с использованием ввода отдельных данных.

В дальнейшем информация, введенная в базу данных, систематически проверяется Главным Исследователем.

Дополнительные медикаменты, внесенные в базу данных, кодируются согласно справочному Списку Лекарственных препаратов ВОЗ, в котором используется Анатомическая Терапевтическая система классификации химических веществ. Сопутствующие заболевания и побочные явления будут закодированы через MedDRA.

10. Статистические методы

10.1. Статистические методы

Это открытое клиническое исследование. К данному исследованию не применим дизайн стандартного исследования фазы I/IIa, как и невозможно применять статистические правила с предопределенными коэффициентами появления ошибок для приживления/отторжения исследуемого трансплантата, основанных на предопределенных коэффициентах успеха/неудач. Более того, из-за длительного периода, требующегося на появление клинических эффектов от начала лечения, нет возможности строго модулировать включение пациентов, основываясь на наблюдаемых успехах.

Подходящие кандидатуры пациентов включаются в исследование проспективно, получают лечение и наблюдаются в соответствии с протоколом исследования, и получаемые результаты, с позиций токсичности и эффективности постоянно обновляются и контролируются.

10.1.1. Популяции

Популяция анализируемой безопасности (ПАБ) включает в себя всех пациентов, получивших хотя бы одну дозу исследуемого лечения.

Популяция, с намерением лечиться (ПНЛ) включает в себя всех пациентов, включенных в исследование, получивших лечение. Пациенты, вышедшие из исследования из-за ПЯ или токсичности до оценки ключевой реакции считаются неудачами в лечении.

Популяция анализируемой эффективности (ПАЭ) будет состоять из пациентов, которые:

- Не нарушают критерии включения/исключения
И
- Завершили фазу лечения или вышли из исследования по причине смерти
Или
- Вышли из исследования по причине токсичности (ПЯ, связанные с имплантатом) и прошли, по крайней мере, одну оценку ключевой реакции

Поскольку первичной целью исследования является оценка эффективности лечения, первичный анализ безопасности будет проводиться среди ПАБ.

Поскольку вторичной целью исследования является оценка активности лечения при восстановлении неврологических функций, первичный анализ эффективности будет проводиться среди ПАЭ и подтверждаться на ПНЛ, все вторичные анализы эффективности будут проводиться только на популяции ПНЛ.

Замена пациентов, не принадлежащих к группе ПАЭ, не предполагается. Пациенты могут быть заменены в отдельных случаях, после обсуждения между Клиникой «НейроВита» и исследователями, если предполагается, что пациент не будет предоставлять достаточное количество информации для оценки безопасности и эффективности имплантата.

10.1.2. Демографические и биографические данные

Демографические данные (возраст, пол, национальность), диагноз, история и исходные характеристики (статус деятельности) будет обобщаться для всех включенных пациентов.

Другие данные для включенных пациентов будут перечислены в списке.

10.1.3. Исследуемый клеточный препарат

Информация по дозировке будет перечислены в ОФП.

10.1.4 Виды лечения

- Интратекальные трансфузии препарата аутологичных ГСК сРПП
- внутримышечные или подкожные инъекции дендритных вакцин
- Интратекальные трансфузии препарата аллогенных гаплоидентичных ГСК
- Трансузия индивидуализированных ЦТЛ в проекции коллекторов лимфатических узлов

10.2.1. Процедуры аудита

ЗАО Клиника «НейроВита», ФГБУ РОНЦ РАМН и ФГБУ ФНКЦ СМП и МТ ФМБА России предоставят все исследуемые клеточные препараты (КП) Главному Исследователю. КП хранятся в подходящем, безопасном месте (напр. запираемый шкаф) в соответствии с условиями, описанными в протоколе исследования. Исследователи должны обеспечить точную регистрацию транспортировки и распределения исследуемого имплантата в форме по **отчетности об имплантируемом биоматериале**. Точные записи о дате и количестве имплантата, распределенного на каждого пациента, должны быть доступны для проверки каждый день. Весь имплантационный материал должен быть использован только для данного протокола, и ни для каких-либо других целей.

Исследователи не должны уничтожать какие-либо этикетки с контейнеров КП или частично использованный или неиспользованный материал. При завершении исследования и, при необходимости во время исследования, исследователи будут хранить (В ЗАМОРОЖЕННОМ ВИДЕ В ОТДЕЛЬНОМ КОНТЕЙНЕРЕ) все использованные и неиспользованные контейнеры от КП, содержащими этикетки пробирок и копию заполненной формы распределения лекарственного препарата.

10.2.6. Публикация результатов

Любая формальная презентация или публикация данных, собранных за время данного исследования, будет считаться совместной публикацией исследователя(ей) и соответствующего персонала **ЗАО Клиники «НейроВита» и АНО «Национальный институт регенеративной медицины».**

10.2.7. Разглашение и конфиденциальность

Подписав протокол, исследователь выражает согласие хранить всю информацию по исследованию в строгой секретности и требовать сходной конфиденциальности от своего персонала и ЭК. Документы исследования (протоколы, брошюры исследователя, ОФП, и другой материал).

10.2.8. Прекращение исследования

Исследование может быть прекращено по клиническим или другим причинам в любое время.

10.3. Этика и Good Clinical Practice

Данное исследование должно выполняться в полном соответствии с рекомендациями Good Clinical Practice, как описано в следующих документах:

1. ICH Гармонизированные Трехчастные Рекомендации по Good Clinical Practice 1996
2. Директива 91/507/ЕЕС, Правила контроля медицинских продуктов в европейском Сообществе.
3. 21 Кодекс Федеральных правил США о клинических исследованиях (включая части 50 и 56 об информированном согласии и IRB правила)
4. Декларация Хельсинки, о медицинских исследованиях на людях (Рекомендации Врачам по Проведению Биомедицинских Исследований с участием людей, Хельсинки 1964, исправленные: Токио 1975, Венеция 1983, Гонконг 1989, Сомерсет Вест 1996).

При подписании протокола исследователь дает согласие следовать инструкциям и процедурам, описанным в протоколе и, соответственно следовать принципам Good Clinical Practice, которым он соответствует. Копия Декларации Хельсинки прилагается в разделе 9.3.3.

10.3.1. Этический Комитет

До начала проведения исследования, протокол, предложенное информированное согласие и другая информация для пациентов должна быть одобрена Этическим Комитетом (ЭК) НИИЭДиТО ФГБУ РОНЦ РАМН и ФГБУ ФНКЦ СМП и МТ ФМБА России. До начала исследования в ЗАО Клиника «НейроВита», должно быть представлено подписанное и датированное заявление о том, что протокол и информированное согласие были одобрены ЭК. Имена и должности председателя и членов ЭК должны быть также представлены в ЗАО Клиника «НейроВита». Данный комитет должен давать разрешения на любые изменения к протоколу, кроме административных.

10.3.2 Информированное согласие

Исследователь должен объяснить каждому пациенту (или полномочному представителю) природу исследования, его цель, предполагаемые процедуры, ожидаемую продолжительность, потенциальный риск и пользу, и возможный дискомфорт. Каждый пациент должен знать, что участие в исследовании добровольно, и он/она могут выйти из исследования в любое время и изъятие согласия не повлияет на дальнейшее медицинское лечение или отношения с лечащим врачом.

Информированное согласие должно быть представлено в виде стандартного письменного заявления, написанного не техническим языком. Если письменное согласие не возможно, **устное согласие приемлемо при условии, что будут присутствовать, по крайней мере, 2 свидетелей, не участвующих в исследовании, при этом, указав причину неспособности пациента подписать согласие.** Ни один пациент не может участвовать в исследовании до подписания информированного согласия.

Информированное согласие является частью протокола, и должно подаваться исследователями вместе с протоколом на разрешение в ЭК. (Приложение 2)

10.3.3. Декларация Хельсинки

Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации: рекомендации для врачей по проведению биомедицинских исследований на людях

Принята 18-й Всемирной Медицинской Ассамблеей, Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г. и пересмотрена 29-й Всемирной Медицинской Ассамблеей, Токио, Япония, октябрь 1975 г., 35-й Всемирной Медицинской Ассамблеей, Венеция, Италия, октябрь 1983 г., 41-й Всемирной Медицинской Ассамблеей, Гонконг, сентябрь 1989 г. и 48-й Генеральной Ассамблеей, Сомерсет Уэст, ЮАР, октябрь 1996г.

Введение

Миссия врача — охрана здоровья людей. Его знания и совесть посвящены выполнению этой задачи.

Женевская Декларация Всемирной Медицинской Ассоциации закрепила обязанности врача словами: “Здоровье пациента — мой главный долг”, а в Международном Кодексе Медицинской Этики говорится: “Применяя лечение, которое может вызвать ухудшение физического или психического состояния больного, врач должен действовать исключительно в интересах больного”. Биомедицинские исследования на людях должны быть направлены на улучшение диагностики, лечения и профилактики, а также на понимание этиологии и патогенеза болезней.

В современной медицинской практике большинство диагностических, лечебных и профилактических процедур связаны с риском. Это особенно касается биомедицинских исследований.

Прогресс в медицине основан на исследованиях, которые, в конечном счете, должны отчасти опираться на эксперименты на людях.

В области биомедицинских исследований необходимо признать принципиальное различие между медицинскими исследованиями, целью которых является в первую очередь диагностика или лечение, и медицинскими исследованиями, основная цель которых чисто научная, и которые не имеют непосредственного диагностического или терапевтического значения для лиц, вовлеченных в исследование. Особые меры предосторожности должны применяться при проведении исследований, которые могут повлиять на окружающую среду. Необходимо гарантировать, что животным, используемым в испытании, не будет нанесен вред.

Поскольку для дальнейшего развития науки и для помощи страдающему человечеству необходимо, чтобы результаты лабораторных экспериментов были применимы к человеку, Всемирная Медицинская Ассоциация подготовила следующие рекомендации для всех врачей, проводящих биомедицинские исследования на людях. В будущем они могут пересматриваться. Необходимо подчеркнуть, что разработанные в этом документе нормы для врачей всего мира являются не более чем общими положениями для проведения испытаний. Врачи не освобождаются от уголовной, гражданской и этической ответственности в соответствии с законами их стран.

I. Основные принципы

1. Биомедицинские исследования на людях должны подчиняться общепринятым научным принципам и основываться на правильно выполненных лабораторных опытах и экспериментах на животных, а также на полном знании научной литературы. План и выполнение каждой экспериментальной процедуры на людях должны быть ясно сформулированы в протоколе, который должен быть передан для рассмотрения, комментирования и рекомендаций в специально назначенный комитет, независимый от исследователя и спонсора и действующий в соответствии с законами и правилами страны, в которой проводится исследование.

2. Биомедицинское исследование на людях должно проводиться исключительно квалифицированным научным персоналом и под наблюдением компетентного врача. Ответственность за испытуемого должна всегда лежать на враче, и ни в коем случае не может быть возложена на испытуемого, даже если испытуемый дал свое согласие. Биомедицинское исследование на людях не может считаться оправданным, если значимость цели не соразмерна неизбежному риску для испытуемого.

3. Каждому биомедицинскому исследованию на людях должно предшествовать тщательное сопоставление возможного риска с ожидаемыми выгодами для испытуемого или для прочих лиц. Забота об интересах испытуемого должна всегда превалировать над интересами науки и общества. Право испытуемого на охрану своего здоровья должно всегда соблюдаться. Должны быть приняты все меры предосторожности для сохранения личной тайны испытуемого и для сведения к минимуму влияния исследования на его физическое и психическое здоровье, а также на его личность.

4. Врачи должны воздерживаться от проведения исследований на людях, если они не убеждены в том, что риск, связанный с исследованием, может быть определен заранее. Врачи обязаны прекратить любое исследование, если окажется, что риск перевешивает потенциальные выгоды.

5. При публикации результатов исследования врач обязан обеспечить точность отчета. Статьи об исследованиях, проведенных не в соответствии с принципами, изложенными в настоящей Декларации, не должны приниматься для опубликования. В любом исследовании на людях каждый потенциальный испытуемый должен быть достаточно информирован о целях, методах, ожидаемых выгодах и

потенциальном риске исследования, а также о неудобствах, которые оно может повлечь за собой. Испытуемый должен быть информирован о своем праве воздержаться от участия в исследовании или в любой момент отозвать свое согласие. Врач должен получить у испытуемого добровольное согласие на основе полной информации, предпочтительно в письменном виде.

6. При получении согласия на участие в исследовании врач должен быть особенно осторожен, если субъект находится в зависимом положении от него и/или может дать согласие под давлением. В этом случае согласие должно быть получено врачом, не участвующим в исследовании и полностью независимым от этих официальных отношений. В случае юридической неспособности, согласие на основе полной информации должно быть получено от законного опекуна в соответствии с национальным законодательством. Если физическая или психическая неспособность делает невозможным получение согласия или если больной не достиг совершеннолетия, разрешение отвечающего за него родственника заменяет согласие испытуемого в соответствии с национальным законодательством. Если несовершеннолетний фактически в состоянии дать свое согласие, оно должно быть получено в дополнение к согласию опекуна.

7. Протокол исследования должен всегда содержать указание на принятые во внимание этические соображения, а также подтверждение того, что принципы, сформулированные в настоящей Декларации, выполнены.

II. Медицинские исследования, связанные с оказанием медицинской помощи (клинические исследования)

1. При лечении больного врач должен иметь право применять новые диагностические и терапевтические воздействия, если, по его мнению, они дают надежду на спасение жизни, восстановление здоровья или могут облегчить страдания.

2. Потенциальные выгоды, риск и неудобства нового метода должны быть оценены по отношению к лучшим из существующих диагностических и терапевтических методов. В любом медицинском исследовании каждому пациенту, включая пациентов контрольной группы, должно быть гарантировано применение лучших из проверенных диагностических и лечебных методов. Это не исключает использование неактивного плацебо в исследованиях, когда проверенного диагностического или лечебного метода не существует.

3. Отказ больного от участия в исследовании никогда не должен влиять на его отношения с врачом. Если врач считает, что для проведения испытания важно не получать от больного согласия на основе полной информации, то конкретные основания для этого должны быть изложены в протоколе исследования, который передается независимому комитету.

4. Врач может сочетать оказание помощи больному с медицинским исследованием ради получения новых медицинских знаний только в том случае, когда это медицинское исследование оправдано с точки зрения потенциального диагностического или лечебного значения для больного.

III. Медицинские исследования, не связанные с оказанием медицинской помощи (не клинические биомедицинские исследования)

1. При проведении чисто научных исследований на людях врач обязан оставаться защитником их жизни и здоровья. Испытуемые должны быть добровольцами: либо здоровыми людьми, либо пациентами с заболеванием, отличным от изучаемого.

2. Исследователь или исследовательская группа должны прекратить исследование, если, по его/ее мнению, при продолжении оно может принести вред испытуемому.

3. В исследовании на людях интересы науки и общества никогда не должны ставиться выше соображений, связанных с благополучием испытуемого.

10. 3.4. Процедуры и инструкции

Процедуры, связанные с безопасностью

10.3.5 Отчетность по серьезным побочным явлениям

Необходимо сообщать о любых серьезных побочных явлениях, включая серьезные отклонения в лабораторных анализах, появившиеся у пациента после информированного согласия и до 6 недель после трансплантации АГСК с НК содержащими индукторы апоптоза. Период после трансплантации может быть увеличен, если исследователь предполагает наличие причинно-следственной связи с имплантацией. Все серьезные побочные явления также должны регистрироваться за период, когда протокол исследования присоединяется к стандартному лечению. Повторяющиеся эпизоды, осложнения или прогрессирование начальных СПЯ должны регистрироваться как последующее наблюдение после первоначального эпизода в течение 24 часов после получения исследователем информации о наблюдении. СПЯ. Произошедшее в другой временной интервал либо считающееся несвязанным с предыдущим, должно регистрироваться отдельно как новое побочное явление.

Информация по всем СПЯ должна быть собрана и зарегистрирована в Форме Отчета по Серьезным Побочным Явлениям. Исследователь должен оценить связь с исследуемым имплантантом, заполнить Отчетную Форму по СПЯ на английском и отправить заполненную и подписанную форму по факсу Главному Исследователю в течение 24 часов после известия о явлении, даже если оно не связано с лечением. Номер контактного телефона и телефакса предоставляется. Оригинал Отчетной Формы и подтверждение, присланное по факсу, должно храниться вместе с документацией истории болезни на месте исследования.

Информация по наблюдению направляется тому же Исследователю, которому опрашивался оригинал Отчетной Формы по СПЯ с указанием, что это последующее наблюдение уже зарегистрированного СПЯ и его даты. Каждый рецидив, осложнение или прогрессирование первоначального явления должны быть зарегистрированы как дальнейшее наблюдение этого явления, независимо от того, когда оно происходит. В информации по наблюдению должно быть указано было ли купировано побочное явление или продолжается. Как оно лечится, находится ли пациент по-прежнему в исследовании, либо выведен из участия в исследовании.

Специфические вопросы, касающиеся непосредственно пациента и серьезного побочного явления должны направляться главному исследователю. Вопросы, касающиеся передачи формы по Серьезным Побочным Явлениям, направляются Главному исследователю.

10.3.6 Отчетность по беременности

Помимо прочего в ОФП регистрируется также любая беременность или отцовство ребенка через 6 месяцев после имплантации АГСК с НК, содержащими индукторы апоптоза.

Чтобы гарантировать безопасность пациента о каждой беременности у пациента, находящегося в исследовании, необходимо докладывать Главному исследователю в течение 24 часов после поступления известия. Беременность должна наблюдаться для определения исхода, включая спонтанное или произвольное прерывание, детали рождения и наличие/отсутствие дефектов при рождении, наследственных отклонений, осложнений у матери и/или новорожденного.

Беременность должна быть записана в ОФП, и о ней должно быть доложено исследователям. Наблюдение беременности должно быть зарегистрировано в той же форме, и должно содержать оценку возможной связи исхода беременности с исследуемым имплантантом. Любое СПЯ, зафиксированное во время беременности должно быть зарегистрировано в Отчетной Форме СПЯ.

Если отец получал трансплантации исследуемого имплантата, необходимо получить информированное согласие от матери на предоставление информации об исходах беременности.

10.3.7. Заполнение формы по Серьезным Побочным Исследованиям.

Каждое побочное явление должно быть зарегистрировано в Отчетной Форме по Побочным Явлениям. Насколько возможно, каждое побочное явление должно быть описано по:

1. Продолжительности (даты возникновения и окончания)
2. Тяжести (степени 1-4)
3. Связи с исследуемым имплантатом (предполагается/не предполагается)
4. Предпринятые действия

Определение степени тяжести побочного явления обеспечивает качественную оценку интенсивности побочного явления, в соответствии с определением исследователя или отчетом пациента. Степень тяжести не отражает клиническую значимость побочного явления, только степень или интенсивность (напр. сильная тошнота, небольшие судороги) и не отражает связь с исследуемым препаратом.

Степени тяжести для явлений, не перечисленных в ОКТ NSI/NIH

1= 1 степень	I- легкие
2=2 степень	II-средней тяжести
3=3 степень	III-тяжелые
4=4 степень	IV-угрожающие жизни

Связь между применением исследуемого имплантата и возникновением побочного явления описывается через принадлежность к одной из категорий, как предполагаемая исследователем и не предполагаемая (отсутствующая).

Отношение к исследуемому к иммунотерапии.

0=не предполагаемое	Временные отношения клинического явления и применения исследуемого к иммунотерапии делают причинно-следственную связь маловероятной , либо другие препараты, терапевтические вмешательства или скрытые состояния являются достаточным объяснением наблюдаемого явления.
1=предполагаемое	Временные отношения клинического явления и применения исследуемого имплантата делают причинно-следственную связь вероятной и другие препараты, терапевтические вмешательства или скрытые состояния не являются достаточным объяснением наблюдаемого явления.

Действия, направленные на купирование побочного явления, описываются по численной шкале с 1 по 6 пункты, охватывая разные варианты. Из указанных вариантов можно выбрать один или более.

Действия, направленные на купирование побочного явления

- 0=Никаких действий
- 1=прием дополнительного препарата
- 2=Назначенная немедикаментозная терапия
- 3=Госпитализация/продление госпитализации

10.4. Администрирование

10.4.1. Изменения в протоколе

Любые изменения или добавления к протоколу требуют письменной поправки к протоколу, одобренной ЗАО Клиника «НейроВита» и Главным Исследователем до применения. Исправления, значительно влияющие на безопасность пациентов, объем исследования или научное качество, требуют дополнительного согласования с Этическим Комитетом (ЭК) и, если необходимо, с другими организациями. Копия письменного разрешения от ЭК, которая становится частью протокола, должна быть передана Главному Исследователю. Примеры исправлений, нуждающихся в разрешении, включают в себя:

1. Изменения в обращении с имплантатом
2. Значительные изменения в дизайне исследования (напр. добавление или удаление контрольной группы)
3. Увеличения числа инвазивных процедур, которым подвергаются пациенты.
4. Добавление или удаление процедуры тестирования для мониторинга безопасности.

Эти требования к получению разрешения ни в коем случае не должны препятствовать немедленным действиям, предпринимаемым исследователем или ЗАО Клиника «НейроВита», в интересах соблюдения безопасности всех пациентов, включенных в исследование. Если Главный Исследователь считает необходимым произвести изменения незамедлительно, и осуществляет их в целях безопасности, необходимо известить ЗАО Клиника «НейроВита», и в течение 10 дней – Этический Комитет.

Исправления, влияющие только на административную сторону исследования, не требуют формальных изменений в протоколе или разрешения ЭК. Примеры административных изменений, не требующих формальных изменений в протоколе или разрешения ЭК, которые могут считаться административными исправлениями, включают в себя:

1. Изменения в штате, проводящем мониторинг испытаний (напр. штат ЗАО Клиника «НейроВита».)
2. Небольшие изменения в упаковке или обозначении исследуемого препарата.

10.4.2. Процедуры мониторинга

Во время проведения исследования контролер от ЗАО Клиника «НейроВита», будет регулярно посещать место проведения исследования, проверять заполненность отчетных форм, точность введения в ОФП, следование протоколу и стандартам Good Clinical Practice, включение в исследование и контролировать хранение, учет и распределение исследуемого имплантата в соответствии со спецификациями. На время визита должны предоставляться исследователи и персонал, играющий ключевую роль в исследовании.

Исследователь должен предоставить контролеру доступ к соответствующим записям для подтверждения их соответствия ОФП. Никакая личная информация по пациентам не выйдет за пределы центра.

Копия ОФП сохраняется у Главного Исследователя, который должен гарантировать её хранение с другими документами исследования, такими как протокол, брошюра исследователя и любые изменения в протоколе в безопасном месте.

10.4.3. Регистрация данных/хранение документов.

Общие инструкции по введению данных в ОФП перечислены в ОФП.

Данные по пациентам собранные по ОФП за время исследования будут задокументированы анонимно, и пациент будет определяться только через идентификационный номер, дату рождения и, если требуется, по инициалам. Если, в качестве исключения, для безопасности или разрешительных процедур необходимо идентифицировать пациента и ЗАО Клиника «НейроВита» и исследователи обязаны сохранить конфиденциальность этой информации.

Необходимо предоставлять всю информацию, требуемую протоколом, и любые опущения должны быть объяснены. Все ОФП должны быть заполнены и предоставлены для сбора не позднее, чем

через 7 дней после посещения пациента, так, чтобы контролер мог проверить полноту введения данных, точность и читаемость.

Все данные должны быть введены разборчиво, синей шариковой ручкой, для обеспечения читаемости фотокопий. Исправления делаются путем горизонтального перечеркивания одной чертой неверных данных и помещения исправленных данных рядом. Исправление должно быть помечено инициалами и датировано членом исследовательского коллектива, полномочного осуществлять ввод данных. Нельзя пользоваться корректурной жидкостью.

Исследователь должен вести исходные документы для каждого пациента в исследовании. Вся информация ОФП должна быть прослеживаема в исходных документах, которые в основном прикладываются к истории болезни. Исходные документы должны содержать всю демографическую и медицинскую информацию, включая лабораторные данные, электрокардиограммы, и так далее, также копию формы информированного согласия, где должен быть обозначен номер исследования и название испытания.

Исследователь, как перечислено ниже, должен хранить значимые документы столько, сколько требуется по государственным и международным стандартам (как правило, 10 лет после прекращения клинической разработки).

К значимым документам относятся:

1. Разрешения ЭК на протокол исследования и все исправления.
2. Все исходные документы и лабораторные записи
3. Копии ОФП
4. Информированные согласия пациентов
5. Любые другие документы, относящиеся к исследованию

Приложение2

Информированное согласие

на участие в ограниченных клинических испытаниях

Я, (Ф.И.О. пациента) _____, «___» _____ 19 ____ года рождения добровольно и собственноручно (при невозможности самостоятельной подписи подписывает представитель пациента) подписываю данное информированное согласие на участие в проведении ограниченных клинических испытаний, проводимых ЗАО «Клиника «НейроВита» и ФГБУ РОНЦ РАМН им.Н.Н.Блохина и ФГБУ ФНКЦ СМП и МТ ФМБА России по Протоколу у №1 GBM/2012 ограниченные клинические исследования фазы I/IIa «Протеом-персонализированная иммунотерапия глиобластом головного мозга»

Мне (или полномочному представителю) было подробно и понятно врачами клиники объяснено природа исследования, его цель, предполагаемые процедуры, ожидаемую продолжительность, потенциальный риск и пользу, и возможный дискомфорт. Я (или полномочный представитель) информирован, что участие в исследовании добровольно, и я / (он, она) могут выйти из исследования в любое время и изъятие согласия не повлияет на дальнейшее медицинское лечение или отношения с лечащим врачом.

Я информирован, что мне предложен новый способ лечения моего заболевания с применением иммунотерапии клеточным препаратом изготовленным из гемопоэтических прогенеторных клеток (ГПК) или нейральных предшественников (НП) у моего близкого родственника

(брата, сестры, матери, отца) или гистосовместимого донора. Целью лечения является регуляция и восстановление определенных функциональных противоопухолевых свойств клеток моей иммунной системы. Мне понятно, что целью предложенного мне исследования является оценка эффективности и безопасности нового клеточного препарата и всего комплекса проводимой противоопухолевой иммунотерапии.

Мне объяснена сущность предложенного иммунотерапевтического лечения, которая заключается в том, что иммунный клеточный препарат трансплантируются мне различными способами (под кожу, внутримышечно, в боковые желудочки мозга, в спинномозговую жидкость или в кровь). Мне рассказали , что по градиенту концентрации воспалительных хемокинов компоненты иммунного клеточного препарата мигрируют в патологическую зону опухоли или зону перитуморозного отека и равномерно распределяются по патологическому очагу. Между клетками используемого препарата и опухолевыми клетками пациента возникает острая иммунная реакция «Трансплантат против опухоли» , которая и запускает регуляторные механизмы дифференцировки или апоптоза.

Мне сообщили, что изготовление клеточного препарата для иммунотерапии опухолей ЦНС осуществляется путем мобилизации клеток –предшественников гемопоэза из крови гистосовместимого донора с использованием гранулоцитарного- колонистимулирующего фактора (Г-КСФ) и последующего сбора этих клеток , их сепарации и иммунохимическом выделении специализированных клеток по определенным маркерам клеточной поверхности. Данный препарата проходит HLA-типирование (в группе больных с донорским алогенным препаратом) на определение тканевой совместимости только при наличии доказанной тканевой совместимости препарат используется для иммунотерапии. Препарат нейральных клеток- предшественников получается путем забора обонятельной выстилки носа у донора и последующего специализированного культивирования этих клеточных систем .

Я предупрежден(а), что клеточный препарат, полученный указанным способом, расширяет арсенал средств для лечения опухолей, заболеваний и повреждений структур центральной и периферической нервной системы, но не может гарантировать мне полного выздоровления , так как его клинические эффекты еще находятся в стадии изучения. Претензий к персоналу клиники в случае осложнений не имею.

Информированное согласие подписано мною в присутствии одного свидетеля и лечащего врача (Если письменное согласие не возможно, **устное согласие приемлемо при условии, что будут присутствовать, по крайней мере, 2 свидетелей, не участвующих в исследовании, при этом, указав причину неспособности пациента подписать согласие**)

Пациент.

Подпись _____ Дата _____

Свидетель

Подпись _____ Дата _____

Врач _____

Подпись _____ Дата _____

Список использованной литературы:

1. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях- М.:ЗАО Клиника «Нейровита», 2003.-400с.
2. Брюховецкий А.С., В.П. Чехонин, Г.Л.Менткевич А.Ю. Стволовые клетки в нейроонкологии: здоровые и раковыестволовые клетки , их возможная роль и место в канцерогенезе и современных высокотехнологичных сценариях лечения опухолей мозга // Материалы науч-практ-конференции «Высокие технологии в терапии и реабилитации заболеваний нервной системы».-М.,2008.- С.43-44
3. Введение в молекулярную медицину / под ред. А.А.Пальцева/ .- М.,Медицина.-2006 .- 370с.
4. Гродинз Ф. Теория регулирования и биологические системы .-М.,1966.- 254 с.
5. Фокин С.В., Беркинблит М.Б. Математические проблемы в биологии.-М.,1973.-199 с.
6. Неймарк Ю.И., Коган Р.Я., Савельев В.П. Динамические модели теории управления М.: Наука ,1985
7. Цымбалюк В.И.Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки : Монография-К., Изд-во «Коваль», 2005.- 596 с.
8. Чехонин В.П. Дмитриева Т.Б. Гурина О.И.
9. Kobayashi N., Navarro-Alvares N.,Soto-Guetierrez A., Kavamoto Hironobu. et al. Cancer Stem Cells Research: Currently
10. Situation and Problems//Cell Transplantation.-2008, Vol.17 .- P.19-25
11. Marshall C.T., Guo Z., Lu C. et al. // Brain Res. – 2005 – Vol. 1045 – P. 45-56.
12. Marshall C.T., Lu C., Winstead W. et al. // Histol. Histopatol. – 2006 – Vol. 21 – P. 633-643.
13. Murrell W., Feron F., Wetzig A. et al. // Dev. Dyn. – 2005 – Vol.233 – P. 343-350
14. Neimark Ju.I Mathematical models in Natural Science and Engineering,2003
15. Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L. et al. // Brain Res. – 2001 – Vol. 890 – P. 11-22.
16. Zhang X., Klueber K. M., Guo Z. // Experimental Neurology. – 2004 – Vol. 186 – P. 112-123.
17. Zhang X., Cai J., Klueber K.M. et al. // Stem Cells – 2005 – Vol. 23 – P. 442-53.
18. Zhang X., Cai J., Klueber K. M. at al. // Stem Cells. – 2006a – Vol. 24 – P. 434-442.
19. Zhang X., Klueber K.M., Guo Z. et al. // Brain Res. – 2006b – Vol.1073-1074 – P. 10940-119.
20. Zigova T.,E.Snyder, Sanberg P. Neural Stem Cells for Brain and Spinal Cord Repair,2003.-350 p.
21. Uzzaman M.,Keller G.,Germano I.M. In vivo Gene Delivery by embryonic stem cell-derived astrocytes for malignant gliomas// Neuro Oncol Advance Publication, published on August 1, 2008 as DOI: 10/1215/15228517-2008-056