

Czynnik martwicy nowotworów (TNF-alfa) jest cytokiną, odgrywającą bardzo ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Udowodniono, że TNF-alfa wykazuje działanie przeciwnowotworowe, zarówno w warunkach hodowli komórkowych, jak i na zwierzętach laboratoryjnych z nowotworami złośliwymi. Dlatego próbowano zastosować tę cytokinę u ludzi chorych na choroby nowotworowe. Przeprowadzono wiele badań klinicznych, których celem było ustalenie optymalnych dawek oraz wskazań do leczenia. Wieloletnie doświadczenia wskazują na fakt, że TNF-alfa znajduje miejsce w leczeniu metodą izolowanej perfuzji z hipertermią narządów, głównie w przypadkach czerniaka i mięsaka zlokalizowanych na kończynach. Skuteczność tej metody leczniczej jest określana na ponad 40 proc., w przypadku mięsaków i ponad 90 proc. objętych odpowiedzi podczas leczenia czerniaków. Jednak konieczne są dalsze badania, głównie fazy III. Dodatkowo pozostaje do rozwiązania wiele szczegółów technicznych dotyczących technik izolowanej perfuzji narządowej. Pozostałe sposoby podawania TNF-alfa, czyli ogólnoustrojowe wlewy, wstrzyknięcia doguzowe, podania dootrzewnowe i do jamy opłucnej nie zostały zaakceptowane z powodu dużej toksyczności samego TNF-alfa i małej skuteczności.

Słowa kluczowe: TNF-alfa, rak, leczenie.

# Leczenie chorób nowotworowych czynnikiem martwicy nowotworów – alfa (TNF-alfa)

## *The role of tumor necrosis factor (TNF-alpha) in therapy of malignant diseases*

Gabriel Wcisło, Jan Korniluk, Katarzyna Szarlej-Wcisło, Wojciech Z. Pawlak, Paweł Nurzyński, Renata Duchnowska

Klinika Onkologii Centralny Szpital Kliniczny WAM, Warszawa

Czynnik martwicy nowotworów został odkryty przez Lloyda w roku 1975 [1]. Autor ten stwierdził aktywność surowicy odpowiedzialną za pojawienie się martwicy krwotocznej guzów nowotworowych, które były indukowane chemicznie metylocholantrenem A u myszy. Natomiast w wieku XIX nowojorski chirurg W. Coley przypadkowo odkrył zależność pomiędzy infekcją bakteryjną (różą) a regresją zmian nowotworowych. Coley zaczął pierwszy stosować wyciągi bakteryjne, tzw. toksyny Coleya, we wstrzyknięciach doguzowych. Znane są 2 rodzaje czynników martwicy nowotworowej, tj. TNF-alfa i TNF-beta. Dokładnie przebadany został TNF-alfa i to on został zastosowany w badaniach klinicznych. TNF-alfa i TNF-beta są polipeptydami kodowanymi przez 2 niezależne geny, które znajdują się na chromosomie 6.

TNF-alfa jest polipeptydem złożonym z 233 aminokwasów i zawierającym sekwencję hydrofobową. TNF-alfa, a także TNF-beta, wykazują działanie na komórki efektorowe poprzez te same białka receptorowe, tj. p55 i p75. TNF-alfa występuje jako trimer. Cząsteczka łączy się z odpowiednim receptorem błonowym,

rozpoczynając kaskadę reakcji, których efektem jest działanie biologiczne. Receptor p55 jest odpowiedzialny za cytotoksyczność czynników martwicy nowotworów wobec komórek nowotworowych. Natomiast p75 jest odpowiedzialny za efekty ostrej fazy oraz za stymulację limfocytów T. TNF-alfa jest substancją wykazującą wiele efektów biologicznych – wpływa na uwalnianie prostaglandyn, leukotrienów, czynników aktywujących płytki, tlenek azotu oraz reaktywne formy tlenu. Ta cytokina jest także bardzo silnym regulatorem ekspresji wielu genów, np. z grupy transkrypcyjnych czynników jądrowych, jak c-jun, c-fos. Ponadto wpływa na zwiększoną syntezę molekuł powierzchniowych, jak receptor-alfa IL-2, klasa I i II układu zgodności tkankowej, a także białek sekrecyjnych IL-1, IL-6, IL-8, interferon-beta, GM-CSF i inne. Bezpośrednie działanie cytotoksyczne TNF-alfa wobec wrażliwych komórek nowotworowych jest związane z kaskadą ceramidową. Ceramidy powstałe pod wpływem obojętnej sfingomielinazy są odpowiedzialne za programowaną genetycznie śmierć komórki nowotworowej, czyli apoptozę. Więcej informacji o biologii i mechanizmach działania TNF-alfa można znaleźć

*Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a pleiotropic and proinflammatory cytokine with anticancer cytotoxic activity. Although enthusiasm has gone mostly upon the systemic and locoregional therapy with the exception of isolated perfusion. Clinical trials showed that TNF-alpha had high grade toxicity profile with very narrow therapeutic window. The toxicity profile is expressed by: hypotension – 92%, hepatotoxicity – 42%, fever and chills – 17%. The summary of clinical trials with TNF-alpha systemic therapy shows that the response rate extent is between 2 to 4%. Moreover, additional clinical trials with TNF-alpha injected to tumors or infused intrapleurally, intra-abdominally, and intravesically have been disappointing because of low response rate. Most studies have been focused on the toxicity profile and safety of such therapy. Unfortunately, responses have been noted incidentally. Another chance, and by the way, challenge appears with isolated perfusion. Primary results have been encouraging with high response rate in patient with in-transit melanoma and sarcoma. In case of in-transit melanoma the response rate reached 90% objective responses, and in patients with sarcoma 75%. Presented data suggest that more achievement is necessary to define a role of TNF-alpha in the therapy of limb tumors. Just novel indication, appears, namely hepatic isolation perfusion. The regimen, consisting of TNF-alpha and melphalan given as isolated perfusion, appears to be effective in patients with metastases confined to the liver. Although, the mortality rate have rather been high up to 33%, the latest results are very encouraging. This regimen is responsible for 75% overall response rate in such patients. The technological progress allowed to bring this procedure safer and not to brink on the edge of life and death, as it was in the beginning of the trials. For sure, the isolated perfusion is not easy to work with. This review is about to shed light on the role of TNF-alpha in the therapy of cancer patients.*

*Key words: TNF-alpha, cancer, therapy.*

w artykułach przeglądowych [2–5]. Celem artykułu jest przedstawienie wyników leczenia TNF-alfa chorych na choroby nowotworowe.

## **LECZENIE OGÓLNUSTROJOWE TNF-ALFA NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH**

Przed rozpoczęciem badań nad przydatnością TNF-alfa w onkologii klinicznej, należało ustalić dawkę i parametry farmakokinetyczne tej cytokiny oraz określić toksyczność. Dlatego przeprowadzono wiele badań fazy I na chorych nowotworowych, u których wyczerpano możliwości innych metod.

Po wstrzyknięciu bolusowym TNF-alfa 100 mcg/m<sup>2</sup> oceniono stężenie tej cytokiny w surowicy krwi, które wynosiło od nieoznaczonego do 8 ng/ml, czas półtrwania 10–17 min. Po zastosowaniu dawek powyżej 150 mcg/m<sup>2</sup> czas półtrwania wynosił odpowiednio 27–80 min. Po wstrzyknięciach domięśniowych TNF-alfa w dawkach powyżej 150 mcg/m<sup>2</sup> największe wartości stężenia tej cytokiny w surowicy krwi zanotowano między 8. a 12. godz. Parametry farmakokinetyczne odnotowane po zastosowaniu wlewów TNF-alfa są porównywalne z tymi, które zaobserwowano podczas wstrzyknięć bolusowych. Badania fazy I wykazały znaczną toksyczność stosowanego TNF-alfa we wstrzyknięciach lub wlewach dożylnych. Najczęściej u chorych po takim leczeniu odnotowano: hipotensję – 92 proc., hepatotoksyczność – 42 proc., osłabienie i ból mięśniowy – 17 proc., trombocytopenię – 8 proc., nudności – 8 proc., dreszcze i gorączkę – 17 proc. [6–10].

Po ustaleniu sposobu dawkowania oraz ocenie toksyczności rozpoczęto leczenie chorych na różne nowotwory. W tab. 1. zostały zgromadzone wyniki 7 badań, których celem było określenie odsetka obiektywnych odpowiedzi u pacjen-

tów z poszczególnymi nowotworami leczonych wyłącznie wlewami TNF-alfa. Prezentowane wyniki są bardzo rozczarowujące. Niestety, obserwowano tylko pojedyncze przypadki chorobowe z obiektywnymi odpowiedziami. Ocenia się, że skuteczność monoterapii TNF-alfa wynosi tylko 2–4 proc. Dodatkowo 17 proc. chorych musiało zakończyć leczenie przedwcześnie z powodu poważnych powikłań systemowych, w tym zaburzenia krzepnięcia u chorego na raka trzustki [11–17]. Z powyższych powodów TNF-alfa nigdy nie był poddany badaniom klinicznym fazy III.

## **LOKOREGIONALNE PODAWANIE TNF-ALFA W LECZENIU CHOROÓB NOWOTWOROWYCH**

Leczenie lokoregionalne cytostatykami wynika z hipotezy, że zwiększenie stężenia leku w obrębie guza nowotworowego pozwoli na uzyskanie lepszych wyników leczenia. W przypadku cytostatyków, podając je bezpośrednio poprzez układ naczyniowy, można uzyskać 10–15-krotne zwiększenie stężenia substancji aktywnej wobec nowotworu i takie samo wydłużenie czasu ekspozycji. Dodatkowo podanie lokoregionalne leku ogranicza jego toksyczność systemową, a także zwiększa się działanie synergistyczne zestawów substancji leczniczych. Taki sposób walki z nowotworami można realizować poprzez wstrzyknięcia dotętnicze, doguzowe, dojamowe, tj. do otrzewnowe, doopłucnowe i do pęcherza moczowego [18].

W tab. 2. zestawiono informacje o 8 badaniach i ich wynikach ze stosowania TNF-alfa w postaci wstrzyknięć doguzowych, do otrzewnowych oraz wlewów do pęcherza moczowego. Prezentowane badania mają charakter wstępnych doniesień, które były prowadzone na małych liczebnych grupach chorych, bez oceny wpływu stosowa-

Tab. 1. Wyniki leczenia dożylnymi wlewami TNF-alfa. Badanie fazy II

Autor	Rozpoznanie	Dawkowanie TNF-alfa	Liczba chorych	Odpowiedź liczba pacjentów			
				CR	PR	SD	PD
Kemeny i wsp. [11]	rak jelita grubego	100–150 mcg/m <sup>2</sup> razy 5 dni	14	–	–	3	11
Whitehead i wsp. [12]	rak jelita grubego	150 mcg/m <sup>2</sup> razy 5 dni	20	–	–	2	18
Schaadt i wsp. [13]	rak jelita grubego	217–652 mcg/m <sup>2</sup>	15	–	–	1	14
Budd i wsp. [14]	rak sutka	150 mcg/m <sup>2</sup> razy 5 dni	19	–	–	–	19
Skilling i wsp. [15]	rak nerki	150 mcg/m <sup>2</sup> razy 5 dni	22	1	1	–	20
Feldman i wsp. [16]	czerniak	150 mcg/m <sup>2</sup> razy 5 dni	21	–	–	1	20
Brown i wsp. [17]	rak trzustki	150 mcg/m <sup>2</sup> razy 5 dni	22	–	–	–	22

CR - całkowita odpowiedź, PR - częściowa odpowiedź, SD - stabilizacja choroby, PD - progresja choroby

nego leczenia na całkowity czas przeżycia. Leczenie doguzowe nie jest postępowaniem skutecznym, gdyż nie zaobserwowano reakcji guzów nowotworowych o charakterze odpowiedzi obiektywnej [19, 20]. W przypadku leczenia TNF-alfa mięsaka Kaposiego zanotowano 50 proc. obiektywnych odpowiedzi [21]. Tada i wsp. [22] nie oceniali skuteczności takiego leczenia, skupiając się na parametrach funkcji układu odpornościo-

wego. Roth i wsp. [24] odnotowali 100-procentową skuteczność walki z *ascites*, natomiast w doniesieniu Markman i wsp. [23] zwrócili uwagę głównie na ocenę toksyczności podawanego dootrzewnowo TNF-alfa oraz ustalenia optymalnej dawki. Brak jest natomiast oceny skuteczności takiego leczenia z uwzględnieniem czasu trwania odpowiedzi. Dwa doniesienia Serretta i wsp. [25] oraz Sternberg i wsp. [26] wskazują na możliwość zwięk-

szania dawki od 60 do 1 800 mcg/m<sup>2</sup> podawanego TNF-alfa do pęcherza moczowego.

Izolowane perfuzje narządów zajętych przez nowotwór złośliwy z użyciem TNF-alfa w skojarzeniu z interferonem-gamma (IFN-gamma) i melfalanem stwarzają szansę na skuteczniejsze postępowanie. Izolowana perfuzja (IP) to zabieg leczniczy, którego celem jest anatomiczna izolacja chorego narządu,

Tab. 2. Wyniki leczenia lokoregionalnego: doguzowego, dootrzewnowego i dopęcherzowego z zastosowaniem TNF-alfa

Autor	Rozpoznanie	Dawkowanie mcg TNF-alfa		Liczba pacjentów	Odpowiedzi obiektywne (proc.)
<b>leczenie doguzowe</b>					
Ijzermans i wsp. [19]	różne nowotwory przerzuty do wątroby	mcg	mcg/m <sup>2</sup>	15	0
Wcislo i wsp. [20]	różne nowotwory; przerzuty do wątroby	100–350		18	0
Kahn i wsp. [21]	mięsak Kaposiego		5–100	28	50
Tada i wsp. [22]	glejaki	0,004–0,033	6	nie podano	
<b>leczenie dootrzewnowe</b>					
Markman i wsp. [23]	różne nowotwory		10–50	11	nie podano
Rath i wsp. [24]	różne nowotwory		80	32	100 proc.
<b>leczenie dopęcherzowe</b>					
Serretta i wsp. [25]	rak pęcherza moczowego		60–600	24	23
Sternberg i wsp. [26]	rak pęcherza moczowego	400–1 800		20	22

**Tab. 3. Wyniki leczenia izolowaną perfuzją z TNF-alfa czerniaka złośliwego, mięsaków i przerzutów do wątroby**

Autor	Schemat i dawkowanie	Liczba pacjentów	Odpowiedzi obiektywne			Śmiertelność
			CR	PR	OR	
<b>czerniak:</b>						
Kienard i wsp. [28]	TNF-alfa 3–4 mg IFN-alfa 0,2 mg podskórnie przed perfuzją Melfalan 10–13 mg/L	53	90 proc.	10 proc.	100 proc.	–
Gutman i wsp. [29]	TNF-alfa 3–4 mg Melfalan 10–13 mg/L	43	60 proc.	26 proc.	86 proc.	–
Lejeune i wsp. [30]	Melfalan 10–13 mg/L	103	52 proc.	25 proc.	96 proc.	–
<b>mięśaki:</b>						
Eggermont i wsp. [31]	TNF-alfa 0,5–3,3 mg +IFN alfa 0,2 mg podskórnie przed perfuzją + Melfalan 10–13 mg/L	55	36 proc.	51 proc.	82 proc.	–
Eggermont i wsp. [32]	TNF alfa 0,5–3,3 mg + Melfalan 10–13 mg/L	85	28 proc.	53 proc.	81 proc.	–
Lejeune i wsp. [33]	TNF-alfa 0,5–3,3 mg + doksorubicyna 0,7–1,4 mg	23	49 proc.	51 proc.	78 proc.	–
<b>przerzuty do wątroby</b>						
de Vries i wsp. [34]	Melfalan 1 mg/kg m.c. TNF 0,4 mg	8	0 proc.	62,5 proc.	62,5 proc.	33 proc.
Oldhafer i wsp. [35]	Melfalan 60–140 mg TNF 200–300 mcg	6	16,7 proc.	33,3 proc.	50 proc.	0 proc.
Alexandre i wsp. [36]	Melfalan 1,5 mg/kg m.c. TNF 1 mg	34	2 proc.	73 proc.	75 proc.	4 proc.

głównie kończyn, wątroby i jamy otrzewnej, w celu podania wysokiej dawki zestawu leków z koniecznością użycia oprzyrządowania sztucznego płuco-serca tak, aby substancje przeciwnowotworowe krążyły w chorym narządzie.

Z przeprowadzonych badań doświadczalnych *in vitro* oraz *in vivo* stwierdzono synergizm pomiędzy TNF-alfa i IFN-gamma, a także pomiędzy melfalanem i TNF-alfa stosowanymi razem z hipertermią (38°C).

W jednym z pierwszych doniesień wstępnych wykazano wysoki odsetek odpowiedzi obiektywnych u chorych na czerniaka i mięsaka tkanek miękkich, zlokalizowanych na kończynach. W przypadku czerniaka autorzy odnotowali 90 proc. całkowitych odpowiedzi, a u chorych na mięsaka 75 proc. także odpowiedzi całkowitych [27].

Te wstępne wyniki zachęciły cytowaną grupę badawczą do kontynuacji i udoskonalania tej metody leczenia. W tab. 3. zgromadzono dane o charakterze i wynikach prób klinicznych leczenia skojarzonego TNF-alfa z IFN-gamma i melfalanem razem z hipertermią u chorych na czerniaka i mięsaki zlokalizowane na kończynach, a także u osób z przerzutami nowotworowymi do wątroby. Badania dotyczące leczenia izolowaną perfuzją wskazują na wysoki odsetek odpowiedzi obiektywnych, w tym całkowitych odpowiedzi, po zastosowaniu trójlekowego schematu postępowania [28–33].

Ogromnym problemem w praktyce klinicznej są przerzuty nowotworowe do wątroby. Stosowane metody leczenia paliatywnego nie przynoszą oczekiwanych wyników. Dlatego podjęto próbę leczenia przerzutowej choroby nowotworo-

wej w wątrobie z zastosowaniem izolowanej perfuzji zastosowaniem TNF-alfa i melfalanu. Wyniki 3 prób klinicznych przedstawiono w tab. 3. [34–36]. Technika perfuzji wątroby przebiega podobnie, jak opisano powyżej. Wczesne wyniki, przeprowadzone na zwierzętach i badanie fazy I na ludziach, prezentowane przez de Vries i wsp. [34] pokazują wysoki odsetek odpowiedzi – 62 proc. obiektywnych odpowiedzi – ale także wysoką śmiertelność. Poprawienie wyników technicznych tej procedury pozwoliło Oldhaferowi i wsp. [35] uzyskać 50 proc. obiektywnych odpowiedzi i uniknąć zgonów. Najpełniejsze doniesienie dotyczące IP wątroby zaprezentował Alexander i wsp. [36]. W badaniu wzięło udział 34 chorych na raka jelita grubego, czerniaka gałki ocznej oraz inne nowotwory. W badanej grupie śmiertelność wynosiła 4 proc. i uzyskano



75 proc. obiektywnych odpowiedzi na leczenie.

## WNIOSKI

Czynnik martwicy nowotworów alfa jest bardzo ważną biologicznie cytokiną. Próba ustalenia wskazań do stosowania TNF-alfa w wielu przypadkach zawiodła. Największe nadzieje wiąże się z podawaniem tej cytokiny metodą izolowanej perfuzji. Jednak nadal jest to leczenie eksperymentalne i dostępne w niewielu ośrodkach, głównie w Szwajcarii, Holandii oraz USA. Dynamicznie rozwijającą się badania nad stosowaniem przeciwciał przeciw TNF-alfa u chorych z chorobami z autoagresji, w tym GVHD (przeszczep przeciw gospodarzowi), co ma istotne znaczenie w leczeniu chemicznym wysoką dawką z następowym allogenicznym przeszczepieniem szpiku.

## PIŚMIENICTWO

1. Carswell EA, Old L, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3666-70.
2. Vassali P. *The pathophysiology of tumor necrosis factor.* Annu Rev Immunol 1992; 10: 411-52.
3. Scheringa M, Marquet RL. *TNF: A brief review with emphasis on its antitumor activity.* Biotherapy 1990; 2: 275-81.
4. Bodmer JL, Schmeider P, Tschopp J. *The molecular architecture of the TNF superfamily.* Trends Biochem Sci 2002; 27: 19-26.
5. Sugarman BJ, Aggarwal B, Hass PE, Figari I, Palladino MA, Shepard HM. *Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro.* Science 1985; 230: 943-45.
6. Blicke M, Sherwin SA, Rosenblum M, Gutterman J. *Phase I study of recombinant TNF in cancer patients.* Cancer Res 1987; 47: 2986-9.
7. Jakubowski AA, Casper ES, Gabrilove JL, Templeton MA, Shervin S, Oettgen HF. *Phase I trial of intramuscularly administered TNF in patients with advanced cancer.* J Clin Oncol 1988; 7: 298-303.
8. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei III E, Kufe DW. *Recombinant TNF administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: Phase I toxicity and effects on lipid metabolism.* J Clin Oncol 1988; 6: 344-50.
9. Feinberg B, Kurzrock R, Talpaz M, Blich M, Saks S, Gutterman J. *A phase I of intravenous administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients.* J Clin Oncol 1988; 6: 1328-34.
10. Creagan ET, Koroch JS, Moertel CG, Frytak S, Kuols LK. *A phase I clinical trial of recombinant Tumor Necrosis Factor.* Cancer 1988; 62: 2467-71.
11. Kemeny N, Childs B, Lardnin W, Rosado K, Kelsen D. *A phase II trial of recombinant TNF in patients with advanced colorectal carcinoma.* Cancer 1990; 66: 659-63.
12. Whitehead RP, Fleming T, Macdonald JS, et al. *A phase II trial of recombinant TNF in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma, a Southwest Oncology Group Study.* J Biol Response Med 1990; 9: 588-91.
13. Shaadt M, Pfreundschuh M, Lorscheidt G, Peters KM, Steinmedtz T, Diehl V. *Phase II study of recombinant TNF in colorectal carcinoma.* J Biol Response Med 1990; 9: 247-50.
14. Budd GT, Green S, Baker LH, Hersh EP, Weick JK, Osborne CK. *A southwest oncology group phase II trial of recombinant TNF in metastatic breast cancer.* Cancer 1991; 68: 1694-5.
15. Skillings J, Wierzbicki R, Eisenhauer E, Venuer P, Letendre F, Stewart D, Weinerman B. *A phase II study of recombinant TNF in renal cell carcinoma: a study of the National Cancer Institute of Canada clinical trials group.* J Immunother 1992; 11: 67-70.
16. Feldman ER, Creagan ET, Schaid DJ, Ahmann DL. *Phase II trial of recombinant TNF in disseminated malignant melanoma.* Am J Clin Oncol 1992; 15: 256-9.
17. Brown TD, Goodman P, Fleming T, Macdonald JS, Hersh EM, Braun TJ. *A phase II trial of recombinant TNF in patients with adenocarcinoma of the pancreas: a Southwest oncology group study.* J Immunother 1991; 10: 376-8.
18. Szczylik C, Korniluk J, Wcisło G. *Chemioterapia lokoregionalna nowotworów.* W: red. Krzakowski M. *Onkologia kliniczna*, wyd. Borgis, Warszawa 2001; 186-201.
19. Ijzerman JNM, van der Schelling GP, Scheringe M, Splinter RAW, Marquet RL, Jeekel J. *Local treatment of liver metastases with recombinant TNF: a phase one study.* Neth J Surg 1991; 432: 121-5.
20. Wcisło G, Korniluk J, Nurzyński P, Szarlej-Wcisło K, Szczylik C. *Percutaneous rTNF-alpha injection into liver metastases and tumors.* EFIS 2000 – 14<sup>th</sup> European Meeting, Poznań, Poland, September 23-27, 2000; Monduzzi Editore pp. 829-837.
21. Kahn JO, Kaplan LD, Volberding PA, et al. *Intralesional rTNF-alpha for AIDS-associated Kaposi Sarcoma: a randomized, double-blind trial.* J Acquir Immune Defic Syndr 1989; 2: 217-23.
22. Tada M, Sawamura Y, Sakyma S, et al. *Cellular and cytokine response of the human central nervous system to intracranial administration of TNF-alpha for the treatment of malignant gliomas.* Cancer Immunol Immunother 1993; 36: 251-59.
23. Markman M, Reichman B, Ianotti N, et al. *Phase I trial of recombinant TNF administered by the intraperitoneal route.* Reg Cancer Treat 1989; 2: 174-77.
24. Rath V, Kaufmann M, Schmid M, et al. *Effect of intraperitoneal recombinant TNF-alpha on malignant ascites.* Eur J Cancer 1991; 27: 121-25.
25. Serretta V, Corselli G, Piazza B, et al. *Intravesical therapy of superficial bladder transitional cell carcinoma with TNF-alpha: preliminary report of a phase I-II study.* Eur Urol 1992; 22: 112-14.
26. Steruberg CN, Arena MG, Pansadoro V, Calabresi F, et al. *Recombinant TNF for superficial bladder tumors.* Ann Oncol 1992; 3: 741-45.
27. Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, Renerd N, Lejeune FJ. *High-dose recombinant TNF-alpha in combination with INF-gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma.* J Clin Oncol 1992; 10: 52-60.
28. Lienard D, Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Kroon BB, Rosenkrimer F, Antier P, Lejeune FJ. *Isolate perfusion of the limb with high-dose TNF-alpha, INF-gamma and melphalan for melanoma stage III. Results of a multi-centre pilot study.* Melanoma Res 1994; 1: 21-6.
29. Gutman M, Lev-Chelouche D, Abu-Abeid S, Imbar M, Klausner JM. *Isolated limb perfusion (ILP) with TNF and melphalan for locally advanced malignant melanoma.* Eur J Surg Oncol 1998; 24: 213.
30. Lejeune FJ, Lienard D, Schraffordt Koops H, Kroon B, Eggermont AM.

- Treatment of in-transit melanoma metastases with TNF-alpha and chemotherapy administered in isolated limb perfusion.* Melanoma Res 1997; 7: S 48.
31. Eggermont AM, Schraffard Koops H, Lienard D, Kroon BB, van Geel AN, Hoekstra HJ, Lejune FJ. *Isolated limb perfusion with high-dose TNF-alpha in combination with IFN-gamma and melphalan for unresectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial.* J Clin Oncol 1996; 14: 245-2665.
32. Eggermont AM, Schraffard Koops H, Klausner JM, et al. *Isolated limb perfusion with TNF-alpha and malphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas.* Ann Surg 1996; 224: 756-64.
33. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. *Clinical applications of TNF-alpha in cancer.* Curr Opin Immunol 1998; 10: 573-80.
34. de Vries MR, Rinkles IH, van de Velde CJ, et al. *Isolated hepatic perfusion with TNF-alpha and melphalan: experimental studies in pigs and phase I data from humans.* Recent Results Cancer Res 1998; 147: 107-19.
35. Oldhafer KJ, Lang H, Frerker M, et al. *First experience and technical aspects of isolated liver perfusion for extensive liver metastasis.* Surgery 1998; 123: 622-31.
36. Alexander HR, Bartlett DL, Libutti SK, Fraker DL, Moser T, Rosemberg SA. *Isolated hepatic perfusion with TNF-alpha and melphalan for unresectable cancers confined to the liver.* J Clin Oncol 1998; 16: 1479-89.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**dr med. **Gabriel Wcisło**

Klinika Onkologii

CSK WAM

ul. Szaserów 128

00-909 Warszawa

tel. (022) 681 84 37, 681 72 40