

*А.Ю. Зозуля¹, С.Н. Новиков¹, И.А. Балдуева¹, Д.В. Гирдюк¹, Н.В. Емельянова¹,
Е.И. Тюряева¹, Е.А. Федосова¹, Ф.Е. Антипов¹, А.Е. Наволока¹, С.В. Канаев¹,
А.М. Беляев^{1,2}*

Изменение иммунного статуса у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей на фоне стереотаксической лучевой терапии

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,
²ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России,
Санкт-Петербург

Цель. Изучение динамики иммунного статуса у пациентов метастатическими формами солидных опухолей до и в различные сроки после стереотаксической лучевой терапии (СТЛТ) на метастатические очаги.

Материалы и методы. Произведены количественная оценка и анализ иммунологических показателей крови до облучения, через 3–4 недели и через 6–8 недель после осуществления СТЛТ у больных со злокачественными новообразованиями, имеющими олигометастазы в печени и легких. Все образцы периферической крови анализировали методом проточной цитометрии. Статистический анализ проводили с использованием критериев Фридмана и Немени.

Результаты. В динамике, преимущественно через 3–4 недели после СТЛТ, определяется статистически значимое повышение содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺); активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) и снижение В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺).

Выводы. Выявленная динамика иммунологических показателей свидетельствует об индукции Т-клеточного звена на фоне снижения активности показателей гуморального иммунитета.

Ключевые слова: метастатический опухолевый процесс; стереотаксическая лучевая терапия (СТЛТ); иммунотерапия; иммунный статус; активация Т-лимфоцитов

Лучевая терапия (ЛТ) является одним из важнейших компонентов лечения большинства онкологических больных, который традиционно рассматривается как метод локального воздействия. Согласно литературным данным около 70 % онкологических пациентов получают радиотерапию в качестве одного из этапов комплексного противоопухолевого лечения [1].

В классическом понимании облучение является цитотоксической терапией, реализующейся путем разрушения опухолевой ДНК и, в конечном итоге, приводящей к гибели опухолевых клеток посредством некроза, апоптоза и аутофагии [2, 3]. Кроме того, ЛТ является мощным иммуномодулирующим фактором. В этой связи, на протяжении последнего десятилетия появляется всё больше указаний на то, что радиотерапии, в особенности стереотаксической лучевой терапии (СТЛТ), свойственны и системные эффекты. При этом особенно пристальное внимание привлекает к себе возможное влияние лучевой терапии на механизмы противоопухолевого иммунного ответа.

Среди вышеуказанных иммунологических проявлений отдельного внимания заслуживает так называемый «абскопальный эффект». «Эффект свидетеля» (коммунальный эффект, абскопальный эффект) — это немишенный эффект радиации, заключающийся в передаче радиационных сигналов от облученных клеток необлученным [4, 5].

Было высказано несколько предположений о механизмах, с помощью которых реализуются системные эффекты ЛТ: усиленное высвобождение различных опухолево-ассоциированных антигенов и эффекторных молекул (HMGB-1), запуск молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями опухолевых клеток (DAMPs), активация протеосомных путей и молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA) I класса, экспрессия NK2GD-лигандов, связывание комплемента, продукция интерферона I типа и индукция иммуногенной смерти клеток [6–9, 18]. Кроме того, следует отметить, что облучение оказывает влияние на сосуды, строми опухоли, стволовые опухолевые клетки [2]. Вышеуказанные события приводят к активации антигенпрезентирующих клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые, в конечном итоге, могут привести к гибели опухолевых клеток как в зоне облучения, так и в необлученных очагах.

К сожалению, до настоящего времени в клинической практике иммунологические изменения, которые возникают во время и после проведения радиотерапии, в частности, СТЛТ, изучены недостаточно. Работы, посвященные изучению изменений иммунного статуса до и после проведения стереотаксической лучевой терапии немногочисленны, а в отечественной литературе публикации, посвященные этой тематике, практически не встречаются.

В связи с этим, нами проведен анализ динамики иммунологических показателей крови в различные сроки до и после осуществления СТЛТ у больных со злокачественными новообразованиями, имеющими олигометастазы в печени и легких.

Материалы и методы

В исследование включено 29 пациентов (20 женщин и 9 мужчин) с метастатическими формами солидных опухолей (средний возраст 59,1 лет [95% ДИ 54,4 — 63,7]), которые проходили лечение в отделении радиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. У всех больных производилась оценка иммунного статуса до и в различные сроки после завершения стереотаксической лучевой терапии на выявленные метастатические очаги. Критериями исключения были анамнестические сведения и данные лабораторных исследований, свидетельствующие об имеющейся гематологической патологии. У всех 29-ти пациентов диагностированы солидные опухоли различных локализаций с метастатическим поражением печени или легких (табл. 1).

Таблица 1. Распределение пациентов по первичной локализации и облучаемому метастатическому очагу

Первичная локализация	Количество	Локализация облученного очага	
		Печень	Легкие
Колоректальный рак	15	15	0
Рак молочной железы	6	5	1
Немелкоклеточный рак легкого	2	2	0
Саркомы мягких тканей	2	2	0
Рак околоушной слюной железы	2	0	2
Меланома	1	1	0
Рак пищевода	1	1	0
Всего	29	26	3

Стереотаксическая лучевая терапия выполнялась на линейном ускорителе электронов «Novalis Tx» EX=6 МэВ. При облучении метастатических очагов в легких использовали следующие режимы фракционирования дозы: 4 фракции по 13,5 Гр; 3 фракции по 20 Гр. СТЛТ метастатических очагов в печени проводилась в режимах: 3 фракции по 15 Гр, 3 фракции по 20 Гр.

Оценка иммунологических показателей производилась в 3-х контрольных точках: до начала лучевого лечения (точка 1), через 3-4 недели (точка 2) и через 6-8 недель (точка 3) после его завершения. При определении имму-

нологического статуса анализировалось содержание основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови с помощью метода проточной цитометрии на цитофлюориметре FACS Canto™ II (BD Bioscience, США). Для обработки данных использовали программное обеспечение BD FACSDiva (версия v 8.0.1). Оценивали изменения количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻); В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов с различными фенотипами (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ и CD4⁺CD25⁺); цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺); активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺); NK-клеток (CD3⁺CD16⁺56⁺); NKT-клеток (CD3⁺CD16⁺56⁺); Т-регуляторных лимфоцитов (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}); двойных положительных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺); двойных отрицательных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻CD8⁻); иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺). Для более удобной и наглядной интерпретации результатов исследования построены визуальные ряды, характеризующие динамику показателей иммунного статуса.

Систематизацию, статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью R v. 3.6.2. Для определения статистически значимых различий в динамике изменения показателей применяли критерий Фридмана [10]. В качестве апостериорного теста для множественных попарных сравнений использовали критерий Немени [11]. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

Результаты

Исследование показателей иммунного статуса у пациентов с распространенными формами солидных опухолей на фоне проведенного лучевого лечения показало статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) через 3-4 недели после облучения с последующим достоверным снижением через 6-8 недель после завершения СТЛТ (рис. 1) [χ^2 Фридмана = 13,8; p = 0,001; попарное p=0,002 и 0,01 соответственно]. Кроме того, отмечалось статистически значимое повышение субпопуляции Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) [χ^2 Фридмана = 8,2; p = 0,02; попарное p =0,02] через 3-4 недели после облучения по сравнению с исследованием до ЛТ и недостоверным постепенным снижением их концентрации к 6-8 неделе после облучения (рис. 2).

Отмечалось повышение содержания активированных Т-хелперов через 3-4 недели после завершения лучевой терапии и дальнейшее увеличение показателей данной субпопуляции через 6-8 недель после окончания СТЛТ (рис. 3) [χ^2 Фридмана = 30,1; p = 0,001; попарное p =0,001 и 0,001 соответственно].

Также нами было отмечено статистически значимое повышение активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности антиген HLA-DR⁺, через 3-4 недели после завершения радиотерапии (попарное p =0,003) и продолжающийся рост показателей данной субпопуляции через 6-8 недель после лучевого воздействия (попарное p =0,007) [χ^2 Фридмана = 13,3] (рис. 4).

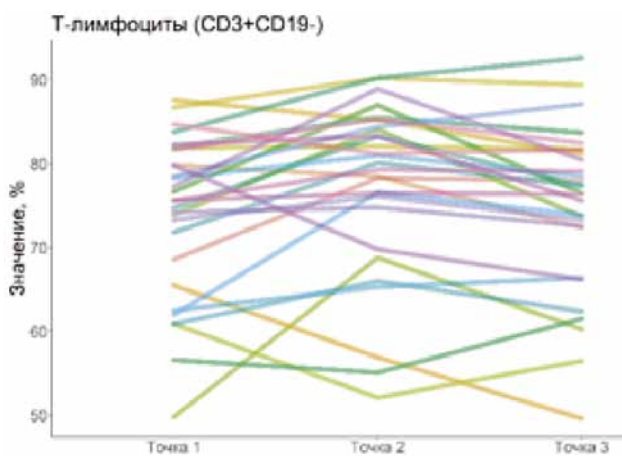


Рис. 1. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-лимфоцитов

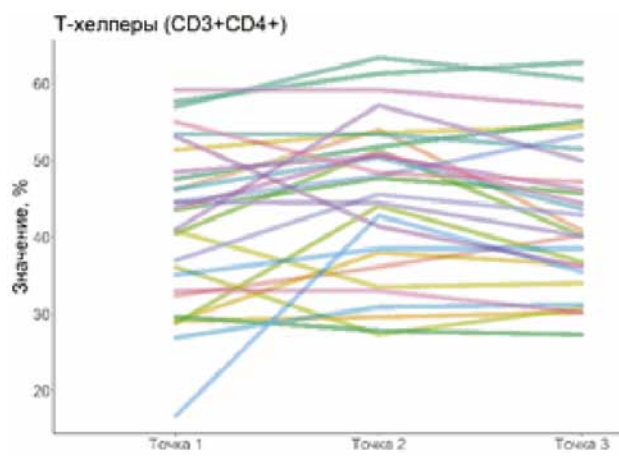


Рис. 2. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-хелперов

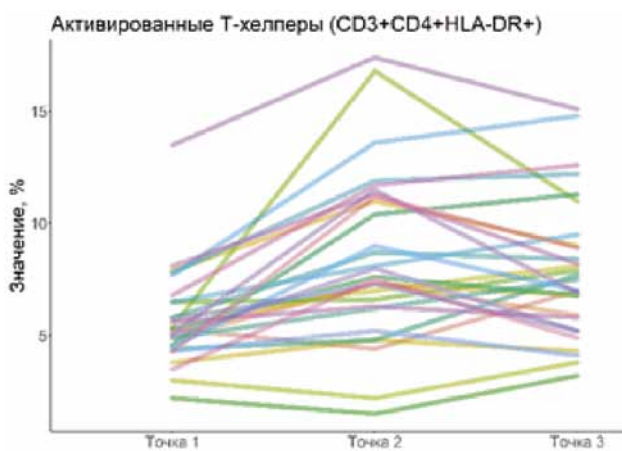


Рис. 3. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных Т-хелперов

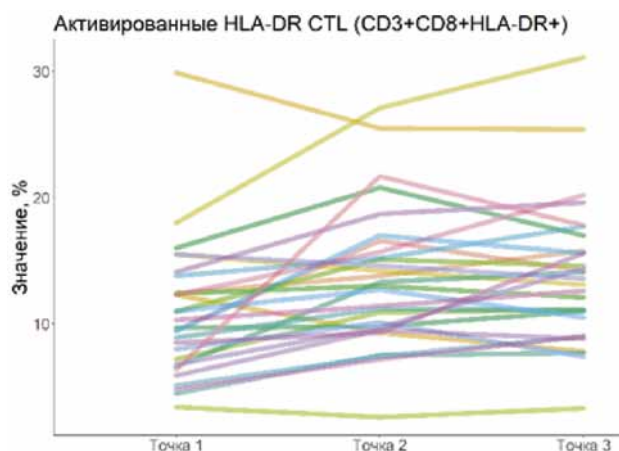


Рис.4 Динамика (визуальный ряд) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов

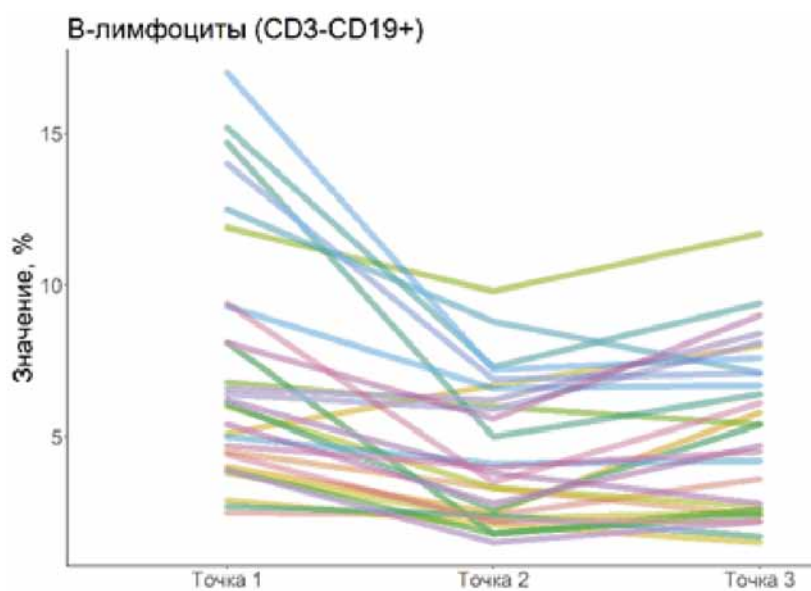


Рис. 5. Динамика (визуальный ряд) содержания В-лимфоцитов

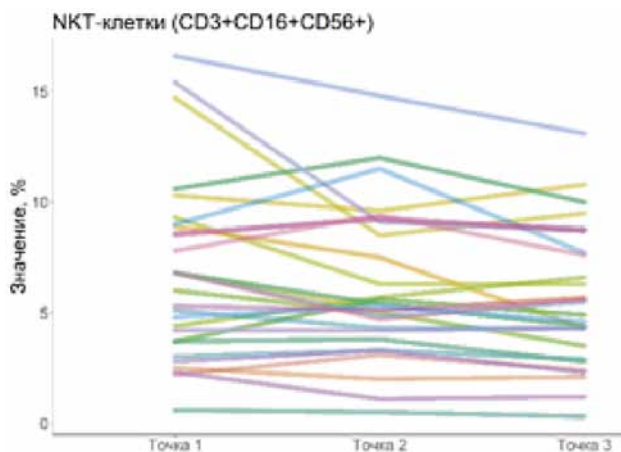


Рис. 6. Динамика (визуальный ряд) содержания NKT-клеток

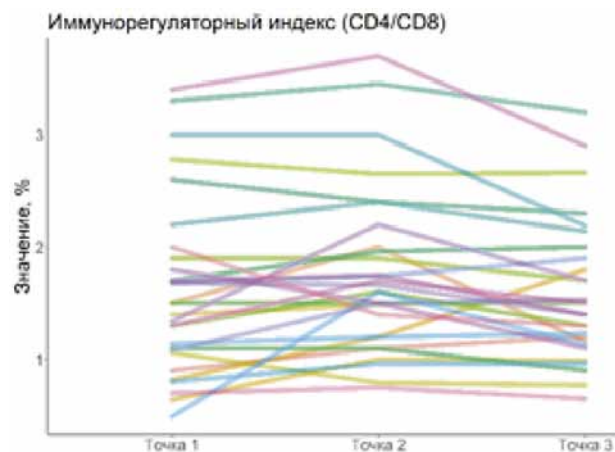


Рис. 7. Динамика (визуальный ряд) изменения иммунорегуляторного индекса

Помимо этого, наблюдалось снижение количества В-лимфоцитов ($CD3^+CD19^+$) через 3-4 недели и через 6-8 недель после СТЛТ по сравнению с иммунологическими показателями до проведения радиотерапии [χ^2 Фридмана = 31,5; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,006$ соответственно]. Однако, весьма интересен тот факт, что через 6-8 недель после радиотерапии по сравнению с показателями иммунного статуса через 3-4 недели после стереотаксической лучевой терапии мы зарегистрировали увеличение содержания клеток гуморального звена иммунитета (рис. 5) [попарное $p = 0,03$].

При анализе динамики содержания NKT-клеток определяется достоверное снижение их количества с 6-8 недель после завершения СТЛТ по сравнению со значениями, полученными до начала облучения [χ^2 Фридмана = 6,2; $p = 0,04$; попарное $p = 0,004$]. Также нами было зафиксировано статистически значимое снижение иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$) через 6-8 недель после СТЛТ по сравнению с иммунологическими показателями через 3-4 после лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 8,1; $p = 0,02$; попарное $p = 0,03$].

Статистически значимых изменений остальных показателей иммунного статуса в исследуемой группе пациентов нами не выявлено.

Обсуждение

В ходе нашего исследования были проанализированы различные показатели иммунного статуса, которые отражают изменения как Т-клеточного, так и гуморального звена иммунитета. Полученные результаты позволяют сформулировать выводы об интенсификации Т-клеточной активации преимущественно за счет увеличения Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^+$); Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$); активи-

рованных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$) на фоне снижения активности антителопродуцирующих клеток ($CD3^+CD19^+$). Причем следует отметить тот факт, что наибольшее количество статистически достоверных изменений показателей иммунного статуса были зафиксированы через 3-4 недели после проведения СТЛТ.

Первые шаги к изучению иммунологических явлений, сопровождающих процесс радиотерапии, были предприняты Demaria et al. [13], которые впервые сообщили, что «абскопальный эффект» радиотерапии является иммуноопосредованным феноменом. Так, некоторые авторы рассматривают СТЛТ в качестве противоопухолевой вакцины *in situ* [14].

Недавние исследования указывают на важность $CD8^+$ Т-клеточной инфильтрации [15,16]. Zheng et al. [17] в 2018 г. представили данные, что более высокий уровень цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток после лучевого лечения является предиктором лучшей выживаемости без прогрессирования у пациентов с немелкоклеточным раком легкого I стадии, получавших СТЛТ. Авторами работы был сделан вывод, что усиление опухолевого антигенспецифического клеточного иммунитета путем сочетания лучевой терапии и иммунотерапии может быть решающей стратегией для улучшения выживаемости у этих больных [17].

Отдельного внимания заслуживает проспективное многоцентровое рандомизированное исследование PEMBRO-RT, которое убедительно продемонстрировало у пациентов с олигометастатическим немелкоклеточным раком легкого синергизм СТЛТ (в виде 3 фракции по 8Гр на один из метастатических очагов) с иммунотерапией ингибиторами PD-L1 рецепторов. При соединении к иммунотерапевтическому лечению

СТЛТ позволило в 2 раза повысить частоту ответившего на лечение (с 18% до 36%) и увеличить медиану общей выживаемости с 7,6 до 15,9 мес. [18].

В виду вышесказанного, особого внимания в нашем исследовании заслуживает увеличение показателей именно Т-клеточного звена (Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺)). При такой ситуации мы с большей вероятностью способны достичь состояния, которое описывается как Т-клеточный «воспалительный фенотип» или «горячая» опухоль и по данным S. Turajlic et al. [19] предлагается в качестве прогностической модели ответа на иммуноонкологические препараты, что в свою очередь, может положительно влиять на прогноз заболевания.

Учитывая, что в нашем исследовании наиболее высокие показатели Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа были зарегистрированы через 3-4 недели после завершения стереотаксической лучевой терапии, можно предположить, что этот период является оптимальным для сочетания лучевой терапии с другими иммунотерапевтическими воздействиями. Причем, в данном аспекте, наиболее привлекательной видится комбинация СТЛТ с ингибиторами контрольных точек (PD-L/PD-L1; CTLA-4).

Факт возникновения противоопухолевого радиоиндуцированного иммунного ответа интересен сам по себе; тем не менее, механизмы, провоцирующие данное явление, выглядят еще более интригующими. В связи с вышесказанным, очевидно, что необходимы дальнейшие исследования роли и значения СТЛТ в формировании специфического противоопухолевого иммунитета, поиск новых иммунологических предикторов, что, в конечном итоге, сможет помочь в реализации комбинированных терапевтических подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamada Y. Cancer Rehabilitation: Principles and Practice. — New York, NY: Demos Medical Publishing, 2009.
2. Рагулин Ю.А. Сочетание иммунотерапии и лучевой терапии при немелкоклеточном раке легкого // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. — 2018. — Т. 7(5). — С. 90-96. — <http://dx.doi.org/10.17116/onkolog2018705190>.
3. Amaravadi R.K., Thompson C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment // Clin Cancer Res. — 2007. — Vol. 13. — P. 7271-7279. — <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1595>.

4. Литтл Д.Б. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47. — № 3. — С. 262-272.
5. Mothersill C. Relevance of radiation induced bystander effects for environmental risk assessment // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2002. — Т. 42. — № 6. — С. 586-587.
6. Golden E.B., Frances D., Pellicciotta I. et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death // Oncoimmunology. — 2014. — Vol. 3. — e28518. — <https://doi.org/10.4161/onci.28518>.
7. Hanna G.G., Illidge T. Radiotherapy and immunotherapy combinations in non-small cell lung cancer: a promising future? // Clin Oncol. — 2016. — Vol. 28(11). — P. 726-731. — <https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.07.014>.
8. Matsumura S., Demaria S. Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation // Radiat Res. — 2010. — Vol. 173(4). — P. 418-425. — <https://doi.org/10.1667/rr1860.1>.
9. Kwilas A.R. In the field: exploiting the untapped potential of immunogenic modulation by radiation in combination with immunotherapy for the treatment of cancer // Front Oncol. — 2012. — Vol. 2. — P. 104. — <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00104>.
10. Балдуева И.А., Зозуля А.Ю., Новиков С.Н. Стереотаксическая лучевая терапия в фокусе системных иммунологических эффектов // Злокачественные опухоли. — 2019. — Т. 9(3s1). — С. 23-25. — <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2019-9-3s1-23-25>.
11. Friedman Milton. A comparison of alternative tests of significance for the problem of m rankings // The Annals of Mathematical Statistics. 1940. — Vol. 11 (1). — P. 86-92.
12. Nemenyi P. Distribution-free Multiple Comparisons. — Ph.D. thesis, Princeton University, 1963.
13. Demaria S., Ng B., Devitt M.L. et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 2004. — Vol. 58. — P. 862-870.
14. Zhang H., Liu L., Yu D. et al. An in situ autologous tumor vaccination with combined radiation therapy and TLR9 agonist therapy // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7(5). — P. e38111.
15. Gupta A., Probst H.C., Vuong V. et al. Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8⁺ T cells via dendritic cell activation // J. Immunol. — 2012. — Vol. 189. — P. 558-566.
16. Lee Y., Auh S.L., Wang Y.G. et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8⁺ T cells: changing strategies for cancer treatment // Blood. — 2009. — Vol. 114. — P. 589-595.
17. Zheng Y., Shi A., Wang W. et al. Post-treatment immune parameters predict cancer control and pneumonitis in stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic ablative radiotherapy // Clinical Lung Cancer. — 2018. — doi: 10.1016/j.clc.2017.12.012.
18. Theelen W., Peulen H., Lalezari F. et al. Randomized phase II study of pembrolizumab after stereotactic body radiotherapy (SBRT) versus pembrolizumab alone in patients with advanced non-small cell lung cancer: the PEMBRO-RT study // J Clin Oncol. — 2018. — Vol. 36. — P. 9023.

19. Turajlic S., Litchfield K., Xu H. et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis // *Lancet Oncol.* –2017. — Vol. 18(8). — P.1009–1021.

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

*A.Yu. Zozulya¹, S.N. Novikov¹, I.A. Baldueva¹,
D.V. Girdyuk¹, N.V. Emelyanova¹, E.I. Tyuryaeva¹,
E.A. Fedosova¹, F.E. Antipov¹, A.E. Navoloka¹,
S.V. Kanaev¹, A.M. Belyaev^{1,2}*

Changes in the immune status of patients with metastatic solid tumors during stereotactic radiation therapy

¹N. N. Petrov National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg
²I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg

Purpose. To evaluate immunological status in patients with metastatic forms of solid tumors before and at different intervals after stereotactic body radiation therapy (SBRT) of metastatic lesions.

Materials and methods. A quantitative assessment and analysis of blood immunological parameters was conducted before irradiation, after 3-4 weeks and 6-8 weeks after SBRT in patients with malignant tumors with oligometastases in the liver and lungs. All peripheral blood samples were analyzed by flow cytometry. Statistical analysis was performed using Friedman and Nemenyi criteria.

Results. 3-4 weeks after the end of SBRT, we observed statistically significant increase of T-lymphocytes (CD3⁺CD19⁻); T-helpers (CD3⁺CD4⁺); activated T-helpers (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺); activated cytotoxic T-lymphocytes (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) and decrease of B-lymphocytes (CD3⁻CD19⁺). Subsequently, after 6-8 weeks after the end of irradiation we detected decrease of T-lymphocytes (CD3⁺CD19⁻) and continuing increase in activated T-helpers (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) and activated cytotoxic T-lymphocytes (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺)

Conclusion. Thus, revealed dynamics of immunological parameters indicates the induction of the T-cell link of anti-tumor immunity against decreasing of indicators of humoral immunity.

Key words: metastatic tumor process; stereotactic body radiation therapy (SBRT); immunotherapy; immune status; activation of T-lymphocytes