

*А.Ю. Зозуля, И.А. Балдуева, С.Н. Новиков, Д.В. Гирдюк, Н.В. Емельянова,
Е.И. Тюряева, Е.А. Федосова, Ф.Е. Антипов, А.И. Арсеньев, И.А. Коробова,
М.М. Гиришович, С.В. Канаев, А.М. Беляев*

Характер изменения иммунного статуса у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей, подвергшихся стереотаксической лучевой терапии: зависимость от дозы и количества облученных очагов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» 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 в зависимости от дозы и количества облученных очагов.

Материалы и методы. Произведена количественная оценка и сравнительный анализ иммунологических показателей крови до облучения, через 3–4 нед и через 6–8 нед после осуществления СТЛТ у больных со злокачественными новообразованиями, имеющими олигометастазы в печени и/или легких, в группах с суммарной очаговой дозой (СОД) менее 46 Гр и СОД > 45 Гр, а также при облучении одного очага или двух и более. Все образцы периферической крови анализировали методом проточной цитометрии. Статистический анализ проводили с использованием критериев Фридмана и Немени.

Результаты. В динамике, преимущественно через 3–4 нед после СТЛТ, при использовании более высоких доз (СОД > 45 Гр) 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⁺). Снижение В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) наблюдалось в обеих дозовых группах (СОД < 46 Гр и СОД > 45 Гр). Также мы отмечали активацию Т-клеточного звена иммунитета как в группе с облучением одного очага, так и в группе, где облучению были подвержены 2 и более метастазов.

Выводы. Использование более высоких доз СТЛТ ассоциировано с более выраженным противоопухолевым Т-клеточным иммунным ответом, в то время как анализ групп пациентов с различным количеством облученных очагов на настоящий момент требует дальнейшего исследования.

Ключевые слова: метастатический опухолевый процесс, стереотаксическая лучевая терапия (СТЛТ), суммарная очаговая доза (СОД), количество облученных метастазов, иммунный статус, активация Т-лимфоцитов

В настоящее время имеются объективные данные, указывающие на то, что стереотаксическая лучевая терапия (СТЛТ) вызывает не только локальные эффекты в области опухолевой ткани, но и индуцирует системный противоопухолевой ответ, вероятно, опосредованный иммунными механизмами [1, 2]. Исследование, выполненное нами ранее [3], показало, что проведение СТЛТ у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей ассоциировано с активацией Т-клеточного иммунного ответа, которая проявляется увеличением Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) на фоне снижения активности антителопродуцирующих клеток (CD3⁺CD19⁺). Интересно, что наиболее выраженные, статистически значимые изменения показателей иммунного статуса отмечались через 3–4 нед после завершения СТЛТ [3].

Вместе с тем, вопрос о взаимосвязи между изменениями иммунного статуса, объемом облучения, величиной суммарной очаговой дозы и режимом фракционирования остается малоизученным. В связи с этим, мы изучили динамику иммунного статуса больных в зависимости от режима подведения дозы и количества метастатических очагов, облученных с помощью СТЛТ.

Материалы и методы

В исследование включено 30 пациентов (20 женщин и 10 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 СТЛТ на метастатические очаги, локализованные в печени или в легком. Критериями исключения были анамнестические сведения и данные лабораторных исследований, свидетельствующие об имеющейся гематологической патологии. В анализ включены результаты, полученные у 30 пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций с метастатическим поражением печени или легких: колоректальным раком (n=15), раком молочной железы (n=6), немелкоклеточным раком легкого (n=2), саркомой мягких тканей (n=2), раком околоушной слюной железы (n=2), меланомой (n=1), раком пищевода (n=1), раком простаты (n=1).

Стереотаксическая лучевая терапия выполнялась на линейном ускорителе электронов «Novalis Tx» (EX=6 МэВ). Облучение метастатических очагов в легких проводили в режимах: 4 фракции по 13,5 Гр или 3 фракции по 20 Гр. СТЛТ метастатических очагов в печени проводилась за 3 фракции по 15 Гр или 3 фракции по 20 Гр. У каждого больного СТЛТ использовалась для облучения от одного до трех метастатических очагов.

В зависимости от дозы облучения нами были выделены группы пациентов с использованием суммарной очаговой дозы (СОД) 46 Гр и менее (n=15) и СОД >45 Гр (n=15).

В зависимости от количества облученных очагов проанализированы показатели иммунного статуса в группе с облучением одного метастатического очага (n=18) в сравнении с группой с облучением 2 и более метастатических очагов (n=12).

Оценка иммунологических показателей производилась в 3 контрольных точках: до начала лучевого лечения (точка 1), через 3–4 нед (точка 2) и через 6–8 нед (точка 3) после его завершения. При определении иммунологического 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 исследо-

вания построены визуальные ряды, которые характеризуют 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 [4]. В качестве апостериорного теста для множественных попарных сравнений использовали критерий Немени [5]. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

Результаты

При исследовании Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) у пациентов с распространенными формами солидных опухолей с использованием дозы более 45 Гр выявлено статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) через 3–4 нед после облучения [χ^2 Фридмана = 8,4; p = 0,015; попарное p = 0,022]. При этом, весьма интересен тот факт, что при использовании СОД < 46 Гр, статистически значимых изменений в содержании Т-лимфоцитов не наблюдалось (рис. 1). Схожая картина была обнаружена и при исследовании Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺). Так, при использовании СОД > 45 Гр наблюдалась тенденция к увеличению общего количества клеток этой субпопуляции [χ^2 Фридмана = 6,2; p = 0,046, попарное p = 0,058] через 3–4 нед после облучения в сравнении с исследованием, выполненным до проведения СТЛТ. В случае применения доз ≤ 45 Гр, статистически значимых изменений в содержании Т-хелперов обнаружено не было (рис. 2).

Отмечалось статистически значимое повышение содержания активированных Т-хелперов через 3–4 нед после завершения лучевой терапии и дальнейшее увеличение показателей данной субпопуляции через 6–8 нед после окончания СТЛТ как в группе с СОД > 45 Гр [χ^2 Фридмана = 12,1; p = 0,002; попарное p = 0,005 и 0,001 соответственно], так и в группе с СОД < 46 Гр (рис. 3) [χ^2 Фридмана = 19,7; p = 0,001; попарное p = 0,001 и 0,001 соответственно].

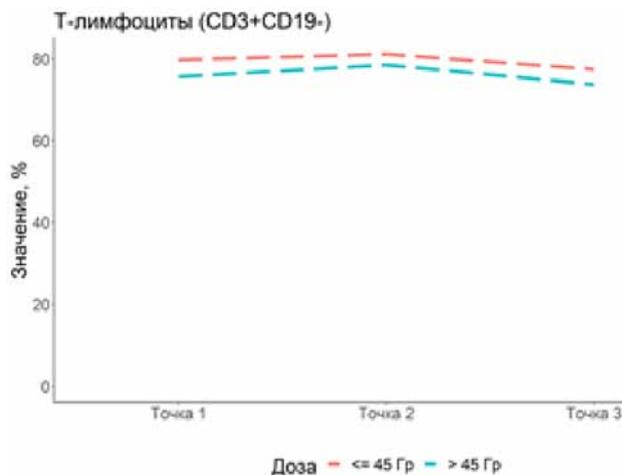


Рис. 1. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-лимфоцитов при различных СОД (медианы значений)

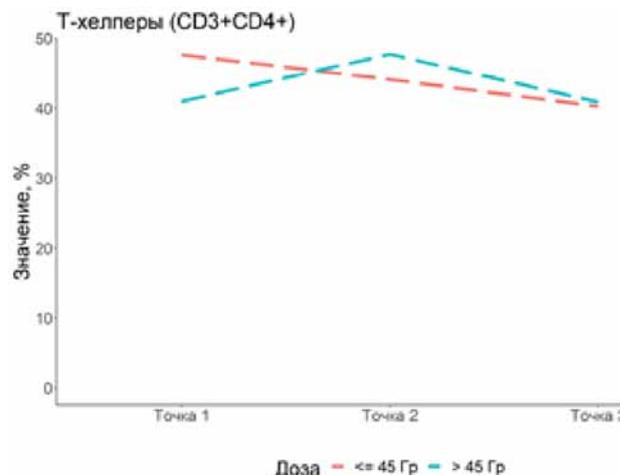


Рис. 2. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-хелперов при различных СОД (медианы значений)

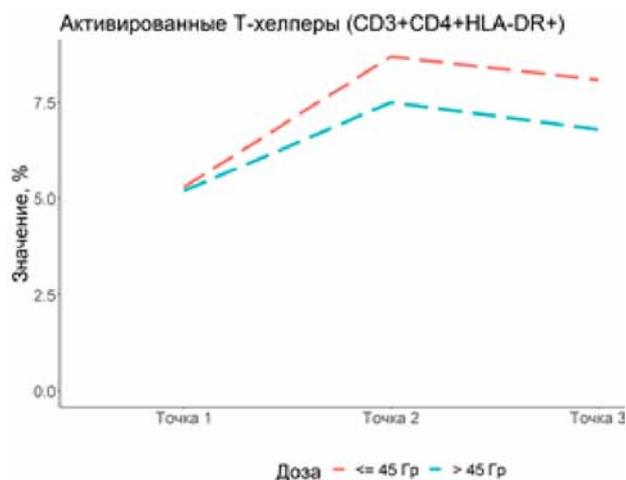


Рис. 3. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных Т-хелперов при различных СОД (медианы значений)

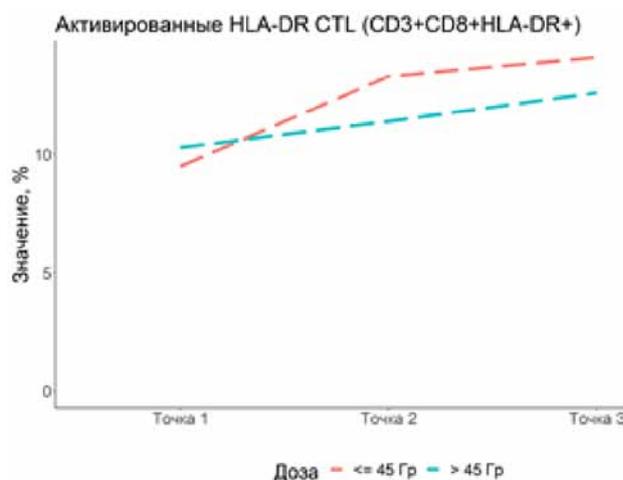


Рис. 4. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов при различных СОД (медианы значений)

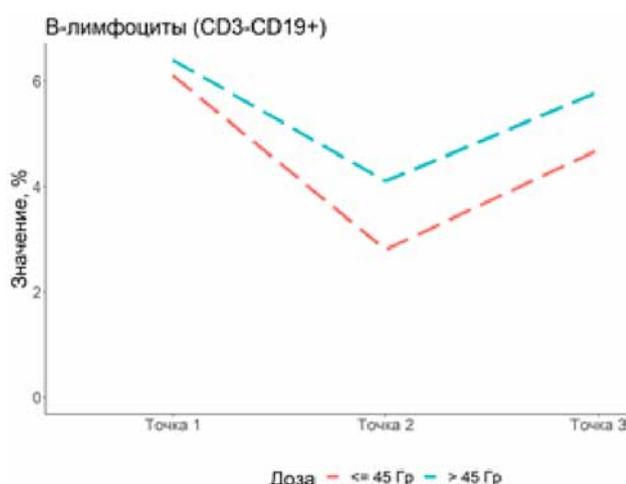


Рис. 5. Динамика (визуальный ряд) содержания В-лимфоцитов при различных СОД (медианы значений)

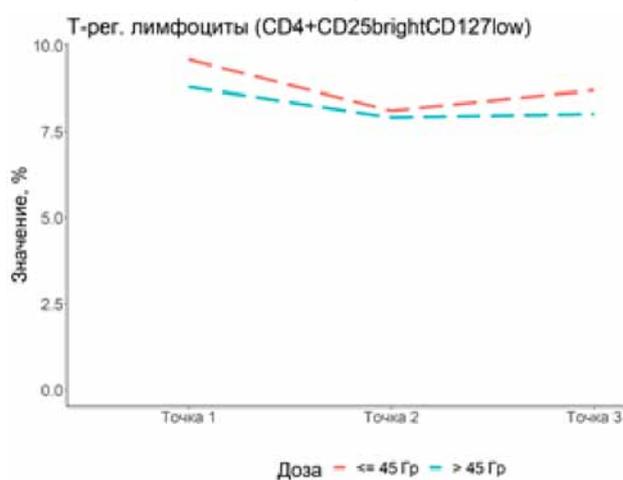


Рис. 6. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-регуляторных лимфоцитов при различных СОД (медианы значений)

Достаточно интересна картина динамики активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺). При использовании СОД < 46 Гр нами было отмечено статистически значимое повышение клеток данной субпопуляции как через 3–4 нед после СТЛТ, так и через 6–8 нед после лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 10; $p = 0,007$; попарное $p = 0,002$ и $0,002$ соответственно]. При этом, статистически значимых изменений в клетках с фенотипом CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ при СОД > 45 Гр не было зафиксировано (рис. 4).

Помимо этого, наблюдалось снижение количества В-лимфоцитов (CD3-CD19⁺) через 3–4 нед и через 6–8 нед после СТЛТ по сравнению с иммунологическими показателями до проведения радиотерапии в группе СОД < 46 Гр [χ^2 Фридмана = 16,3; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,02$ соответственно]. В случае использования более высоких доз (>45 Гр), мы наблюдали статистически значимое снижение В-лимфоцитов только через 3–4 нед после лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 16,1; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$] (рис. 5). Весьма привлекательными в свете противоопухолевого иммунного ответа видятся графики,

полученные при исследовании Т-регуляторных лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией. Хотя нами и не получено статистически значимых изменений в данной субпопуляции, тенденция к снижению очевидна (рис. 6).

Статистически значимых изменений остальных показателей иммунного статуса у пациентов в группах (СОД < 46 Гр и СОД > 45 Гр) нами не выявлено.

При анализе показателей иммунного статуса в зависимости от количества облученных очагов мы обнаружили статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) через 3–4 нед после радиотерапии как в группе, где был облучен один очаг (группа А) [χ^2 Фридмана = 7,4; $p = 0,024$; попарное $p = 0,021$], так и в группе, где радиотерапии подверглись 2 и более метастаза (группа Б) [χ^2 Фридмана = 6,4; $p = 0,04$; попарное $p = 0,05$] (рис. 7). Интересно, что в те же временные сроки после СТЛТ в группе А мы наблюдали и увеличение количества Т-хелперов [χ^2 Фридмана = 7,2; $p = 0,02$; попарное $p = 0,03$], чего не происходило в группе с облучением 2 и более очагов (рис. 8).

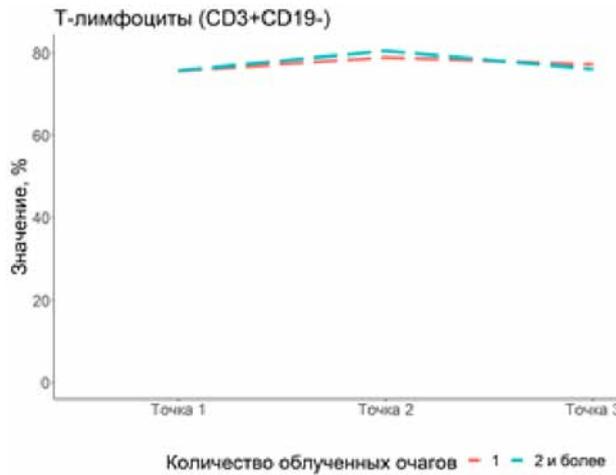


Рис. 7. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

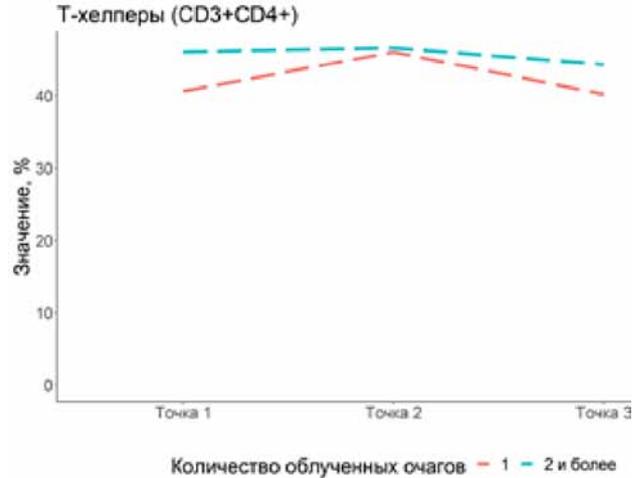


Рис.8. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-хелперов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

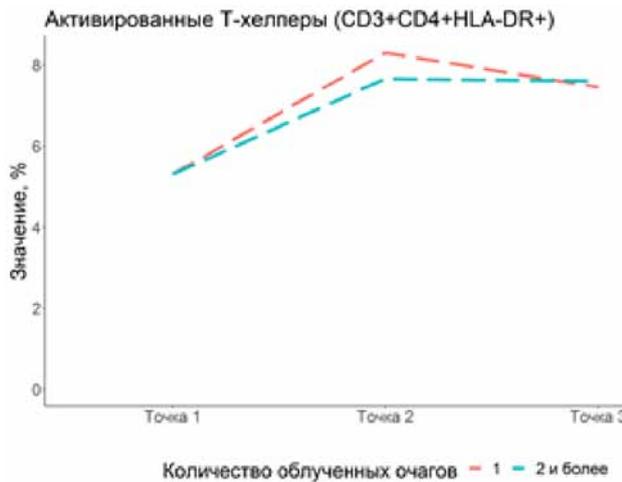


Рис. 9. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных Т-хелперов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

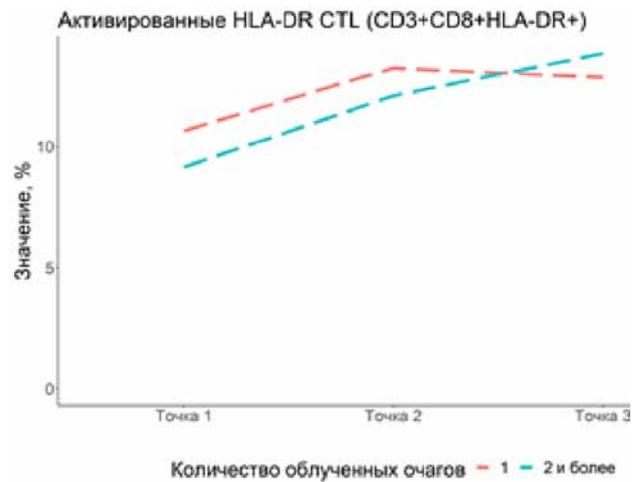


Рис. 10. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

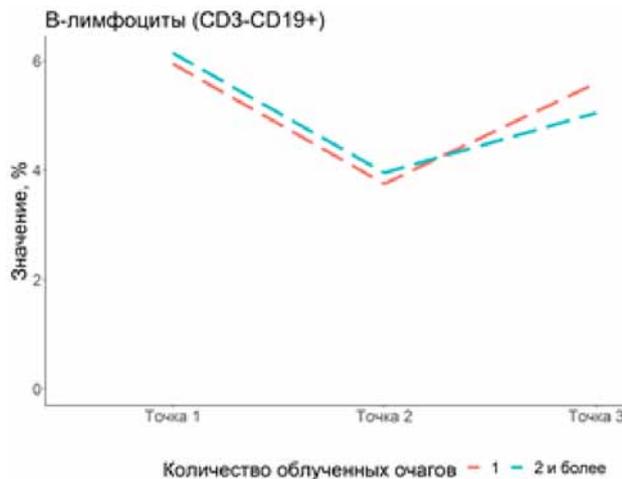


Рис. 11. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных В-лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

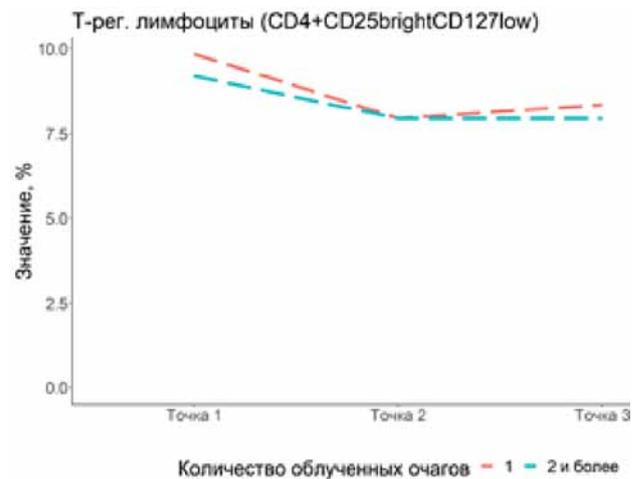


Рис. 12. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-регуляторных лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

Также нами было зафиксировано увеличение содержания активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) в обеих группах через 3–4 нед и через 6–8 нед после облучения в сравнении со значениями, полученными до начала СТЛТ (рис. 9) [группа А - χ^2 Фридмана = 22,3; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,001$ соответственно; группа Б - χ^2 Фридмана = 10,5; $p = 0,005$; попарное $p = 0,04$ и $0,006$ соответственно]. Помимо этого, статистически значимые изменения наблюдали в содержании активированных цитотоксических Т-лимфоцитов. Так, при облучении одного метастатического очага через 3–4 нед после СТЛТ по сравнению с исследованием до радиотерапии отмечалось статистически значимое увеличение показателей данной субпопуляции [χ^2 Фридмана = 8,7; $p = 0,012$; попарное $p = 0,013$] с их постепенным недостоверным снижением к 6–8 нед. Напротив, при облучении двух и более очагов отмечена тенденция к постепенному росту лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ к 3–4 нед и статистически значимое увеличение активированных цитотоксических Т-лимфоцитов через 6–8 нед после завершения СТЛТ (рис. 10) [χ^2 Фридмана = 6,5; $p = 0,038$; попарное $p = 0,038$].

Кроме того, мы наблюдали статистически значимое снижение В-лимфоцитов в группе А (с облучением 1 очага) как через 3–4 нед, так и через 6–8 нед после СТЛТ в сравнении с показателями до облучения [χ^2 Фридмана = 17,01; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,04$ соответственно]. В группе Б (облучены два и более очага) было зафиксировано статистически значимое снижение клеток гуморального иммунитета только через 3–4 нед после радиотерапии [χ^2 Фридмана = 15,2; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$] (рис. 11). По аналогии с дозозависимыми группами, при облучении одного или нескольких метастатических очагов мы также наблюдали тенденцию (статистически незначимую) к снижению Т-регуляторных лимфоцитов.

Обсуждение

Как известно из данных литературы, противоопухолевый иммунный ответ реализуется в основном за счет следующих механизмов: усиленного высвобождения различных опухолево-ассоциированных антигенов и эффекторных молекул (HMGB-1), появления молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями опухолевых клеток (DAMPs), активации молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA) I класса, продукции интерферона I типа и индукции иммуногенной смерти клеток [6]. Кроме того, следует отметить, что облучение оказывает влияние на сосуды, строму опухоли,

стволовые опухолевые клетки [7]. Вышеуказанные события приводят к активации антигенпрезентирующих клеток и различных субпопуляций Т-лимфоцитов, которые, в конечном итоге, могут привести к гибели опухолевых клеток как в зоне облучения, так и в необлученных очагах [8].

На сегодняшний день происходит активная дискуссия в отношении влияния дозы СТЛТ на выраженность системных иммунологических эффектов радиотерапии. Клинические данные, позволяющие напрямую сравнивать разные дозы и фракции, отсутствуют. Однако, использование режимов гипофракционирования с разовой очаговой дозой от 8 Гр и более ассоциируется с увеличением частоты возникновения абскопальных эффектов [2]. В частности, результаты мета-анализа Marconi R, Strolin S. и соавт. [9] указывают на достоверное увеличение частоты возникновения абскопальных эффектов при увеличении суммарной очаговой дозы, поглощенной опухолью. В нашей работе мы использовали более высокие дозы, поскольку достижение локального контроля было приоритетом комплексного противоопухолевого лечения.

В результате нашего исследования мы обнаружили, что при использовании более высоких доз (СОД >45 Гр) происходит более активный иммунный ответ преимущественно за счет увеличения Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺). Показатели гуморального иммунитета снижались на фоне СТЛТ в обеих дозовых группах (СОД < 46 Гр и СОД > 45 Гр), однако, при использовании СОД > 45 Гр наблюдалось более активное восстановление антителопродуцирующих клеток (CD3⁺CD19⁺).

В то же время, некоторыми авторами высказывается мнение о том, что при облучении большего количества очагов наблюдается более выраженный иммунный ответ. Так, Brooks и Chang [10] предполагают, что облучение более чем одного опухолевого очага увеличивает шанс успешного запуска противоопухолевого иммунного ответа по нескольким причинам: более массивное высвобождение и захватывание опухолевоассоциированных антигенов; стимуляция сосудистой сети опухоли; оптимизированный доступ иммунных клеток ко всей опухолевой массе; разрушение устойчивых к системному лечению субклональных популяций опухоли.

При этом, согласно данным нашего исследования, анализ показателей иммунного статуса в зависимости от количества облученных очагов не привел к столь однозначным выводам. Мы наблюдали активацию Т-клеточного звена иммунитета как в группе с облучением одного очага,

так и в группе, где облучению были подвержены 2 и более метастазов. При анализе полученных данных создается впечатление о более поздней активации Т-клеток при облучении нескольких метастазов по сравнению с радиотерапией одного очага. Возможно, такая неоднозначная картина связана с небольшим количеством наблюдений, разнородной локализацией первичной опухоли у исследуемых пациентов.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что использование более высоких доз СТЛТ ассоциировано с более выраженным противоопухолевым иммунным ответом, в то время как анализ групп пациентов с различным количеством облученных очагов на настоящий момент не позволяет представить однозначного заключения о развитии радиоиндуцированных иммунологических изменений. Безусловно, полученные данные, должны стать промежуточным этапом в дальнейших научных изысканиях по представленной тематике.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Xing D, Siva S, Hanna GG. The abscopal effect of stereotactic radiotherapy and immunotherapy: fool's gold or el dorado? Clin Oncol (R Coll Radiol). 2019;31(7):432–443. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.04.006>.
- Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD et al. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. Nat Rev Cancer 2018;18(5):313–322. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.6>.
- Зозуля А.Ю., Новиков С.Н., Балдуева И.А. и др. Изменение иммунного статуса у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей на фоне стереотаксической лучевой терапии // Вопросы онкологии. 2020;66(3):277–282.
- Friedman, Milton (March 1940). «A comparison of alternative tests of significance for the problem of m rankings». The Annals of Mathematical Statistics. 11(1):86–92.
- Nemenyi P. (1963) Distribution-free Multiple Comparisons. Ph.D. thesis, Princeton University.
- Golden EB, Frances D, Pellicciotta I. et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. Oncoimmunology. 2014;3:e28518. <https://doi.org/10.4161/onci.28518>.
- Gerber SA, Sedlacek AL, Cron KR, et al. IFN-gamma mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. Am J Pathol 2013; 182:2345–2354. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.041>.
- Зозуля А.Ю., Балдуева И.А., Новиков С.Н. Иммунологические эффекты стереотаксической лучевой терапии при злокачественных новообразованиях различных локализаций: обзор литературы // Сибирский онкологический журнал. 2020;19(5):108–113.
- Marconi R, Strolin S, Bossi G, Strigari L. A meta-analysis of the abscopal effect in preclinical models: Is the biologically effective dose a relevant physical trigger? PLoS ONE 2017;12(2):1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171559>.
- Brooks ED, Chang JY. Time to abandon single-site irradiation for inducing abscopal effects. Nat Rev Clin Oncol., 2019;16:123e–135.

Поступила в редакцию 11.01.2021

*A.Yu. Zozulya, I.A. Baldueva, S.N. Novikov,
D.V. Girdyuk, N.V. Emelyanova, E.I. Tyuryaeva,
E.A. Fedosova, F.E Antipov, A.I. Arseniev,
I.A. Korobova, M.M. Girshovich, S.V. Kanaev,
A.M. Belyaev*

Changes in the immune status of patients with metastatic solid tumors during stereotactic radiation therapy: dependence on dose and amount of irradiated metastasis

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology Ministry of health of Russian Federation, St. 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 depending on the dose and the number of irradiated metastasis.

Materials and methods. A quantitative assessment and analysis of blood immunological parameters was conducted before irradiation, via 3–4 weeks and via 6–8 weeks after SBRT in patients with malignant tumors with oligometastases in the liver and lungs, in groups with a total focal dose (TFD < 46 Gy) and TFD > 45 Gy, and also in groups with irradiation of one metastases and two or more. 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, when using higher doses (TFD > 45 Gy), 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⁺). Decreasing of B-lymphocytes (CD3⁺CD19⁺) was observed in both dose groups (TFD < 46 Gy and TFD > 45 Gy). We also noted the activation of the T-cell link of immunity both in the group with irradiation of one metastatic lesion, and in the group where 2 or more metastases were exposed to irradiation.

Conclusion. Using of higher doses of SBRT is associated with a more activated antitumor T-cell immune response, while the analysis of groups of patients with different amount of irradiated metastasis currently requires further research.

Key words: metastatic tumor process; stereotactic body radiation therapy (SBRT); total focal dose (TFD); amount of irradiated metastases; immune status; activation of T-lymphocytes