

А.К. Носов, И.А. Балдуева, Е.Е. Самарцева, С.Б. Петров, А.Б. Данилова

Изменение иммунного статуса у пациентов с почечно-клеточной карциномой при радиочастотной абляции

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Произведена количественная оценка абсолютного содержания иммунокомпетентных клеток в периферической крови 29 больных почечно-клеточным раком (ПКР) в процессе лечения: при этом 20 пациентам выполнялась лапароскопическая радиочастотная абляция (РЧА), 9 — лапароскопическая резекция почки. У больных, которым произведена РЧА, наблюдается достоверное повышение содержания активированных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов ($p < 0,05$) в течение месяца после проведения процедуры, в то время как у пациентов, которым выполнялась резекция почки, подобные изменения отсутствуют. Выявленная динамика иммунологических показателей может свидетельствовать об активации клеточного иммунитета под воздействием РЧА, сходной с наблюдаемой в процессе активной специфической иммунотерапии.

Ключевые слова: рак почки, радиочастотная абляция, опухолевые антигены, активация Т-лимфоцитов, иммунотерапия

Почечно-клеточные карциномы (ПКР) составляют примерно 3% от всех онкологических заболеваний у взрослых. Совершенствование диагностических методик (ультразвуковое исследование (УЗИ), компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ)) привели к тому, что все чаще выявляются опухоли почек на стадии T1a (менее 4 см в диаметре). При этом резекция почки стала наиболее частым оперативным вмешательством. В то же время, увеличение частоты выявления ПКР на ранних стадиях привело к значительному повышению интереса к малоинвазивным методикам, таким как радиочастотная абляция (РЧА), криоабляция, микроволновая абляция и др. Среди последних одной из наиболее эффективных и перспективных методик считается РЧА, которая может быть использована как альтернатива резекции почки при опухолях, не превышающих в диаметре 4 см, особенно для пациентов с единственной почкой, при наличии билатеральных опухолей или серьезных противопоказаний к выполнению оперативных вмешательств. Важно отметить, что РЧА относится к относительно

безопасным методикам с редкими, обычно не-тяжелыми осложнениями [4, 6, 7, 15, 19].

В основе метода лежит введение иглообразного или зонтичного электрода в опухолевую ткань с последующим формированием зоны термического некроза за счет электрического тока частотой 400-500 кГц. Точное расположение электрода достигается путем использования навигационных систем (УЗИ или КТ) и/или лапароскопически. Температура вокруг зонда превышает 100°C. При температуре 42-44°C происходит тромбоз сосудов микроциркуляторного русла, при 50°C разрушаются клеточные мембраны, начинается денатурация белка и индуцируется коагуляционный некроз [6, 9, 19].

Большинство публикаций по эффективности РЧА ограничивается оценкой зоны некроза по данным КТ или МРТ. Однако, следует отметить, что в последнее время стали появляться сведения, согласно которым РЧА, помимо непосредственного термического воздействия на опухолевые клетки, может служить спусковым механизмом («триггером») формирования протективного иммунного ответа. Так, например, М. Matuszewski с коллегами продемонстрировал значительные изменения в соотношении количества клеток иммунной системы в периферической крови больных почечно-клеточной карциномой после РЧА [5]. Кроме того, в биоптатах печени, полученных после термоабляции, были обнаружены скопления макрофагов, дендритных клеток (ДК) и Т-лимфоцитов [16]. Таким образом, вероятно, локальное разрушение опухолевой ткани приводит к существенному выбросу антигенов, которые становятся доступными для антиген-презентирующих клеток иммунной системы, таких как макрофаги и ДК. Можно предполагать, что локально повышенная температура способствует усилению процесса презентации антигенов, что создает условия для более успешной активации Т-лимфоцитов периферической крови, то есть приводит к формированию специфической противоопухолевой активности, напоминающей эффект адъювантной иммунотерапии [1-3, 8, 9, 13, 16-18].

Роль клеточного иммунитета в ответ на де-струкцию опухолевой ткани хорошо известна. У пациентов с метастатическим раком почки,

гепатоцеллюлярной карциномой и метастазами колоректального рака в печень показано, что термальная коагуляция вызывает индукцию воспалительных реакций с лимфоцитарной инфильтрацией, которая регистрируется как гиперваскуляризированный периферический край очага при выполнении УЗИ или КТ [3, 12]. Тем не менее, поиск и детализация механизмов, вызывающих иммунный ответ, продолжаются. Участие РЧА в индукции специфического противоопухолевого ответа у пациентов с опухолью печени в настоящее время далеко от полного понимания, а для пациентов с ПКР в литературе вообще практически отсутствуют какие-либо данные на этот счет. Изучение иммунного противоопухолевого ответа у больных ПКР после РЧА может привести к лучшему пониманию эффектов термоабляции и повысить ее эффективность. Кроме того, обнаружение новых механизмов активации иммунной системы может привести к возможности использовать РЧА вместе с иммунотерапией в качестве нового комбинированного лечения при ПКР.

В настоящем исследовании представлены данные по оценке влияния лапароскопической РЧА на субпопуляционный состав иммуннокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с ПКР в процессе лечения в сравнении с результатами, полученными при выполнении лапароскопической резекции почки.

Материалы и методы

В исследование включено 29 больных ПКР (16 мужчин и 13 женщин), средний возраст $60,4 \pm 8,5$ лет, которые проходили лечение в отделении урологии «ФБГУ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. У всех пациентов производили оценку изменений иммунного статуса после РЧА и резекции почки, выполненных лапароскопическим доступом. Критериями исключения были анамнестические сведения и данные лабораторных исследований, свидетельствующие об имеющейся гематологической патологии. Все больные имели опухоль стадии T1aN0M0 со средним размером $2,0 \pm 0,9$ см. Диагностика во всех случаях производилась методом КТ с в/в-контрастированием и УЗИ. Первую группу составили 20 пациентов, которым была выполнена лапароскопическая РЧА. У пятерых из них опухоль имела полностью интрааренальное расположение, что требовало интраоперационного УЗИ-наведения. У четырех больных образование располагалось в единственной почке. Во вторую группу вошли 9 пациентов, которым выполнялась лапароскопическая резекция почки. Средний размер опухоли у пациентов второй группы составил $3 \pm 0,7$ см. Операция проводилась чрезбрюшинным доступом под общей анестезией в положении больного на здоровом боку. После мобилизации почки и визуализации опухоли выполняли трепан-биопсию последней; у пациентов с интрааренальным расположением образования биопсия производилась под контролем УЗИ. Непосредственно после биопсии выполняли процедуру РЧА с помощью аппарата RITA 1500x (AngioDynamics, США) с зонтичным зондом серии «starburst», который раскрывается внутри опухоли после позиционирования электрода. Регулировали степень раскры-

тия «зонтика» внутри ткани в диапазоне от 1 до 5 см. Температурный контроль обеспечивался термодатчиками, встроенными в иглы зонда. В процессе выполнения процедуры средняя температура во время абляции составляла $105 \pm 4^\circ\text{C}$. При этом в ходе РЧА учитывали формирование внутритканевых изменений, которые влияли на визуализацию опухоли под УЗИ при интрааренальном ее расположении. Среднее время процедуры РЧА составило 25 ± 6 мин (каждый сеанс РЧА по 10 мин, в среднем проводилось по 2-3 сеанса в зависимости от размеров опухоли), среднее время операции — 105 ± 14 мин. Длительность госпитализации составила 6 ± 1 дней. В послеоперационном периоде всем пациентам проводилась УЗИ и КТ-диагностика с целью оценки зоны абляции и выявления послеоперационных осложнений. При этом ни у одного из больных не было выявлено осложнений, превышающих grade I по шкале осложнений Clavien-Dindo. В настоящее время все пациенты находятся под тщательным наблюдением с целью выявления рецидивов.

Выполнение резекции почки осуществлялось также лапароскопическим чрезбрюшинным доступом и не отличалось от стандартной техники выполнения данной операции.

Оценка иммунологических показателей: у всех больных за 1 сутки до операции, а также на 1, 7 и 30 сутки после оперативного вмешательства выполняли анализ абсолютного содержания основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови методом многоцветной проточной цитофлуорометрии на приборе BD FACS Calibur (США). Оценивали изменения количества Т-лимфоцитов CD3+CD19-, В-лимфоцитов CD3-CD19+, Т-хелперов CD3+CD4+, активированных Т-хелперов CD3+CD4+HLADR+, CD3+CD4+CD25+, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) CD3+CD8+, активированных ЦТЛ CD3+CD8+HLADR+, NK-клеток CD3-CD16+CD56+, перуляторных Т-лимфоцитов CD4+CD25brightCD127low.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием систем статистической обработки IBM SPSS Statistics v. 21. Для анализа использованы методы описательной статистики.

Результаты и обсуждение

Исследование показателей иммунного статуса у пациентов с ПКР, произведенное за 1 сутки до РЧА, не выявило значимых отклонений от референсных значений. В послеоперационном периоде в периферической крови больных наблюдали достоверное увеличение абсолютного содержания Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), количество которых к 30 суткам наблюдения возросло от $1,18 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ до $1,9 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$) (табл.1). При этом значительно повысилась доля Т-хелперов (CD3+CD4+) с $0,8 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ до $1,5 \pm 0,2 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$) и активированных Т-хелперов (CD3+CD4+HLA-DR+) с $0,4 \pm 0,1 \times 10^9/\text{л}$ до $0,7 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$). Абсолютное содержание ЦТЛ (CD3+CD8+) имело тенденцию к увеличению, при этом достоверно возросло количество ЦТЛ, несущих на своей поверхности антиген HLA-DR, что указывает на активацию этих клеток. Подобная динамика нашла свое отражение в изменении иммунорегуляторного индекса, показатели которого значительно увеличились с $1,66 \pm 0,6$ до $2,95 \pm 0,15$ на 30

сутки после РЧА. Содержание В-лимфоцитов (CD3-CD19+) и NK-клеток (CD3-CD16+56+) достоверно не изменилось в процессе лечения и наблюдения за пациентами. После РЧА абсолютное содержание Т-регуляторных лимфоцитов (CD4+CD25brightCD127low) имело тенденцию к уменьшению, затем к 30 сут. наблюдения вернулось к исходному значению, но не превысило референсные показатели.

Анализ параметров иммунного статуса, зарегистрированных у пациентов второй группы, подвергнутых резекции почки, не выявил каких-либо достоверно значимых изменений как по сравнению с исходными значениями, так и с нормальными показателями за весь период наблюдения.

В последние годы РЧА стала популярным методом лечения опухолей. Чаще всего она используется при лечении неоперабельных первичных и метастатических опухолей печени, однако, все шире применяется и в онкоурологии для лечения локализованных форм рака почки небольшого размера. Большинство исследований по изучению термоабляции в онкологии сфокусировано на оценке деструкции тканей и оптимизации физических механизмов процесса, в то время как потенциальные механизмы иммунного ответа при РЧА еще далеки от понимания [3, 4, 6, 7, 9, 12, 15].

Первые шаги к изучению иммунологических реакций, сопровождающих процесс РЧА, были предприняты А. Zerbini и соавт. в 2006 г, которые протестировали группу пациентов с неоперабельной первичной опухолью печени после этой процедуры. Они установили, что у пациентов, подвергнутых РЧА, Т-лимфоциты периферической крови демонстрировали повышенную активность после контакта с лизатом аутологичных опухолевых клеток (у 7 пациентов из 20

до РЧА и у 16 из 20 через 4 нед. после РЧА). Кроме того, было показано, что у некоторых больных иммунный ответ в большей степени обусловлен активацией клеток CD4⁺ (Т-хелперов) и CD8⁺ (цитотоксических Т-лимфоцитов). С другой стороны, единственным достоверно значимым показателем было увеличение NK-клеток, в то время как другие субпопуляции лимфоцитов остались количественно неизменными. То есть, для некоторых пациентов РЧА, возможно, служит «стартовым механизмом» формирования специфической «иммунной памяти», которая, в свою очередь, формирует эффект, аналогичный эффекту при адъювантной иммунотерапии. В то же время, авторы не выявили корреляцию между активацией клеточного иммунитета и отсутствием рецидивов [18].

J. Hansler и соавт. в 2006 г представили аналогичное исследование, в которое, наряду с пациентами с первичной гепатоцеллюлярной карциномой, были также включены пациенты с метастазами в печень колоректального рака. В обеих группах было выявлено увеличение в 5 раз CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [3]. М. Matuszewski с коллегами в 2011 г. опубликовали работу, в которой оценивали состав иммунокомпетентных клеток у 6 пациентов с ПКР до РЧА и в разные периоды времени после нее [5]. Согласно представленным данным, наиболее выраженные изменения имели место через 2 нед. после РЧА. У одного пациента наблюдалось увеличение как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов. У 5 из 6 пациентов в течение всего периода наблюдения увеличивалось количество активированных (HLA-DR⁺) клеток, причем, максимальная концентрация этих клеток была достигнута на второй неделе наблюдения. Популяция CD56⁺CD16⁺ клеток была снижена в большинстве случаев.

Таблица 1
Изменения субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток у пациентов (n=20), которым выполнялась РЧА

Исследуемый показатель	До операции	1 сутки	7 суток	1 месяц	норма (x10 ⁹ /L)
CD3+CD19- (Т-лимфоциты)	1,18±0,3	1,03±0,01	1,35±0,1	1,9±0,3*	0,9-2,10
CD3-CD19+ (В-лимфоциты)	0,22±0,2	0,15±0,03	0,19±0,02	0,2±0,05	0,04-0,40
CD3+CD4+ (Т-хелперы)	0,8±0,3	0,65±0,2	0,88±0,3	1,5±0,2*	0,57-1,40
CD3+CD4+HLA-DR+ (активированные Т-хелперы)	0,4±0,1	0,4±0,1	0,5±0,08	0,7±0,06*	0,011-0,055
CD3+CD8+ (цитотоксические Т-лимф.)	0,46±0,05	0,38±0,04	0,43±0,1	0,6±0,1	0,37-1,00
CD3+CD8+HLA-DR+ (активир. цитотоксические Т-лимфоциты)	0,08±0,02	0,04±0,01	0,06±0,02	0,16±0,02*	0,006-0,110
CD3-CD16+56+ (NK-клетки)	0,34±0,09	0,19±0,04	0,29±0,1	0,33±0,09	0,12-0,37
CD4+CD25brightCD127low (Т-регуляторные лимф.)	0,06±0,02	0,04±0,01	0,07±0,02	0,06±0,01	0,024-0,010
CD4+/CD8+ (иммунорегуляторный индекс)	1,66±0,6	2,31±0,5	2,42±0,8	2,95±0,15*	1,5-2,6#

* p<0,05 против состояния до операции

В ходе нашей работы были исследованы различные показатели иммунного статуса, отражающие изменения как Т-клеточного, так и В-клеточного звена иммунитета до операции и в различные сроки наблюдения после операции. Было установлено, что среднее содержание Т-лимфоцитов к первому месяцу после РЧА увеличилось практически вдвое, главным образом за счет увеличения Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺), что, в конечном итоге, нашло отражение в увеличении иммунорегуляторного индекса через 1 месяц после операции.

Факт индукции иммунного ответа интересен сам по себе, однако, механизмы, ведущие к возникновению этого ответа, выглядят еще более интригующими. В целом, анализ данных литературы дает основание полагать, что во время термоабляции происходит значительное высвобождение опухолевых антигенов. Термически поврежденные и денатурированные антигены захватываются макрофагами, ДК и презентуются CD4⁺ Т-лимфоцитам. Это, возможно, приводит к преодолению феномена «ускользания» опухолевых клеток от надзора иммунной системы, активации CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов и формированию специфического противоопухолевого иммунного ответа [3, 13, 16-18]. Скорее всего, белки теплового шока (HSP, Heat shock proteins) играют важную роль в индукции иммунного ответа у пациентов после РЧА. Физиологически HSP участвуют в регуляции трансмембранного транспорта различных белков и их хранении внутри клеток. Некоторые авторы продемонстрировали увеличение концентрации HSP70 и HSP90 в тех областях печени, которые были подвергнуты радиочастотной абляции [11, 14]. Также было показано, что HSP активируют ДК, цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки [10].

Целью нашего исследования было оценить воздействие РЧА на динамику абсолютного содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови. Как оказалось, помимо непосредственного термического воздействия на опухолевые клетки, РЧА может служить триггером формирования протективного иммунного ответа. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования роли и значения РЧА в формировании специфического противоопухолевого иммунитета, поскольку уже появляются интересные данные, позволяющие начать разработку сочетанного применения РЧА и ДК-вакцинотерапии, базирующегося на феномене активации миелидных ДК на фоне повышенного уровня TNF α и IL-1 β в сыворотке крови больных, отмеченного после применения РЧА [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali M.Y., Grimm C.F., Ritter M. et al. Activation of dendritic cells by local ablation of hepatocellular carcinoma // *J Hepatol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 817–822.
2. den Brok M.H., Suttmuller R.P., van der Voort R. et al. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity // *Cancer Res.* — 2004. — Vol. 64. — P. 4024–4029.
3. Hansler J., Wissniowski T.T., Schuppan D. et al. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases // *World J Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12. — P. 3716–3721.
4. Mahnken A.H., Rohde D., Brkovic D. et al. Percutaneous radiofrequency ablation of renal cell carcinoma: Preliminary results // *Acta Radiol.* — 2005. — Vol. 46. — P. 208–214.
5. Matuszewski M., Michajowski J., Michajowski I. et al. Impact of radiofrequency ablation on PBMC subpopulation in patients with renal cell carcinoma // *Urol Oncol.* — 2011. — Vol. 29. — P. 724–730.
6. McGovern F.J., Wood B.J., Goldberg S.N. et al. Radio frequency ablation of renal cell carcinoma via image guided needle electrodes // *J. Urol.* — 1999. — Vol. 161. — P. 599–600.
7. Mouraviev V., Joniau S., Van Poppel H. et al. Current status of minimally invasive ablative techniques in the treatment of small renal tumours // *Eur. Urol.* — 2007. — Vol. 51. — P. 328–336.
8. Napoletano C., Taurino F., Biffoni M. et al. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune response in metastatic liver patients // *Int. J. Oncol.* — 2008. — Vol. 32. — P. 481–490.
9. Nikfarjam M., Muralidharan V., Christophi C. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors // *J Surg Res.* — 2005. — Vol. 127. — P. 208–223.
10. Pilla L., Squarcina P., Coppa J. et al. Natural killer and NK-Like T-cell activation in colorectal carcinoma patients treated with autologous tumor-derived heat shock protein 96 // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 3942–3949.
11. Rai R., Richardson C., Flecknell P. et al. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA) // *J. Surg. Res.* — 2005. — Vol. 129. — P. 147–151.
12. de Reijke T.M., Bellmunt J., van Poppel H. et al. EORTC-GU group expert opinion on metastatic renal cancer // *Eur. J. Cancer.* — 2009. — Vol. 45. — P. 765–773.
13. Rughetti A., Rahimi H., Rossi P. et al. Modulation of blood circulating immune cells by radiofrequency tumor ablation // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* — 2003. — Vol. 22. — P. 247–250.
14. Schueller G., Kettenbach J., Sedivy R. et al. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo // *Int. J. Oncol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 609–613.
15. Veltri A., Calvo A., Tosetti I. et al. Experiences in US-guided percutaneous radiofrequency ablation of 44 renal tumors in 31 patients: Analysis of predictors for complications and technical success // *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* — 2006. — Vol. 29. — P. 811–818.
16. Wissniowski T.T., Hansler J., Neureiter D. et al. Activation of tumorspecific T lymphocytes by radio-frequency abla-

- tion of the VX2 hepatoma in rabbits // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 496–500.
17. Yu H.C., Moon J.I., Jin Z.W. et al. Effect of radiofrequency ablation of the liver on cell mediated immunity in rats // *World J. Surg.* — 2005. — Vol. 29. — P. 739–743.
 18. Zerbini A., Pilli M., Penna A. et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66. — P. 1139–1146.
 19. Zlotta A.R., Wildschutz T., Raviv G. et al. Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: Ex vivo and in vivo experience // *J. Endourol.* — 1997. — Vol. 11. — P. 251–258.

Поступила в редакцию 29.07. 2014 г.

*A.K.Nosov, I.A.Baldueva, E.E.Samartseva,
S.B.Petrov, A.B.Danilova*

Changes of the immune status of patients with renal cell carcinoma in radiofrequency ablation

N.N.Petrov Research Institute of Oncology
St. Petersburg

The quantitative assessment of absolute number of immunocompetent cells was conducted in peripheral blood in 29 patients with renal cell carcinoma (RCC) during treatment process: while 20 patients underwent laparoscopic radiofrequency ablation (RFA), 9 – laparoscopic resection of the kidney (LRK). In patients who underwent RFA during the month after the procedure there was observed a significant increase of activated T-helper cells and cytotoxic T-lymphocytes ($p < 0,05$) while in patients who underwent LRK such changes were absent. Revealed dynamics of immunological parameters might indicate the activation of cellular immunity under the influence of RFA similar to observed during the process of active specific immunotherapy.

Key words: renal cell cancer, radiofrequency ablation, tumor antigens, activation of T- lymphocytes, immunotherapy