

На правах рукописи

**ЗОЗУЛЯ
Антон Юрьевич**

**ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ
С МЕТАСТАТИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент **Балдуева Ирина Александровна**

доктор медицинских наук, доцент **Новиков Сергей Николаевич**

Официальные оппоненты:

Ткачев Сергей Иванович - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник отделения радиотерапии

Титов Константин Сергеевич - доктор медицинских наук, доцент, государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента Здравоохранения города Москвы», заведующий онкохирургическим отделением опухолей кожи и мягких тканей

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Ростов-на-Дону)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, на сайте: <https://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Лучевая терапия (ЛТ) является одним из важнейших компонентов лечения большинства онкологических больных, который традиционно рассматривается как метод локорегионарного воздействия. Согласно литературным данным около 70 % онкологических пациентов получают радиотерапию в качестве одного из этапов комплексного противоопухолевого лечения [Yamada Y., 2009; Барсуков Ю.А., Ткачев С.И. и соавт., 2015].

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 [Рагулин Ю.А., 2018; Amaravdi R.K. et al., 2007]. 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 явлений отдельного внимания заслуживает так называемый «абскопальный эффект». «Абскопальный эффект» (коммунальный эффект, эффект свидетеля) — немишеный эффект радиации, заключающийся в передаче радиационных сигналов от облученных клеток необлученным [Литтл Д.Б., 2007].

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 [Golden E.B. et al., 2014; Hanna G.G. et al., 2016; Matsumura S. et al., 2010]. Кроме того, следует отметить, что облучение оказывает влияние на сосуды, строму опухоли, стволовые опухолевые клетки [Рагулин Ю.А., 2018]. 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.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день, как показывает клиническая практика, самостоятельно лучевая терапия в большинстве случаев не способна индуцировать иммунный ответ достаточный для эрадикации опухоли. Предполагается, что основным препятствием на этом пути являются ингибирующие иммунологические эффекты, которые замедляют элиминацию опухолевых клеток. В связи с этим, ингибиторы контрольных точек (PD-1, CTLA-4), которые нивелируют эти тормозные сигналы, могут существенно увеличить возможности иммуноопосредованного уничтожения опухоли (Зозуля А.Ю. и соавт., 2020).

Однако использование ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в качестве монотерапии показало свою эффективность только при лечении злокачественных

новообразований, имеющих высокий процент экспрессии CTLA4 и/или PD-1-рецепторов, а также, опухолей с богатой инфильтрацией дендритными клетками и CD8⁺ Т-лимфоцитами. Подобное состояние описывается как Т-клеточный «воспалительный фенотип» или «горячая» опухоль [Trujillo J.A. et al., 2018]. К сожалению, так называемые «холодные» опухоли (злокачественные новообразования со скудной инфильтрацией Т-лимфоцитами) представляют собой наиболее частый фенотип среди солидных опухолей, что является одной из причин невысокой эффективности ингибиторов контрольных точек в режиме монотерапии.

В литературе имеются указания на то, что лучевая терапия может превратить «холодную» опухоль в «горячую» [Xing D. et al., 2019]. Учитывая вышесказанное, сочетание ЛТ и иммунотерапии видится одним из наиболее прогрессивных подходов в лечении онкологических пациентов с точки зрения достижения абскопального эффекта и иммунологического контроля над опухолевым процессом.

Накопленный клинический опыт показывает многочисленные случаи возникновения абскопальных эффектов у больных, которые получали комбинированную лучевую и иммунотерапию по поводу немелкоклеточного рака легкого [Golden E.B. et al., 2013], меланомы [Tsui J.M. et.al., 2018], колоректального рака [Sato H. et.al., 2017], почечно-клеточного рака [Van deWalle M. et.al., 2017], рака молочной железы [Deipolyi A.R. et.al., 2018], рака шейки матки [Sharabi A. et.al., 2017].

В настоящее время достаточно хорошо изучены основные иммунологические изменения, возникающие на фоне классической лучевой терапии. При этом, изменения иммунного статуса, которые возникают на фоне высокодозных режимов радиотерапии (в частности, СТЛТ) и могут быть связаны с абскопальными эффектами, изучены недостаточно и ограничиваются небольшим числом наблюдений.

Цель исследования

Изучение влияния стереотаксической лучевой терапии на функциональное состояние иммунной системы у больных с метастатическими формами солидных опухолей.

Задачи исследования

1. Изучить иммунологические показатели пациентов с метастатическими опухолями после проведения стереотаксической лучевой терапии.
2. Оценить взаимосвязь между характером изменений в иммунном статусе и режимом подведения дозы при стереотаксической лучевой терапии.
3. Определить взаимосвязь между количеством облученных очагов и динамикой изменений в иммунном статусе после стереотаксической лучевой терапии.
4. Сравнить степень выраженности иммунологических изменений, возникающих после проведения облучения метастазов в печени и легких.
5. Изучить влияние статуса PD-L1 на динамику иммунологических изменений после проведения СТЛТ у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей.

Научная новизна

- Изучена динамика иммунологических изменений, возникающих после проведения стереотаксической лучевой терапии метастатических очагов в печени или легких.
- Проведена оценка дозозависимого эффекта СТЛТ: характер изменения показателей иммунного статуса и величины суммарной эквивалентной дозы, подводимой к опухолевому очагу.
- Установлено, что СТЛТ метастазов в печень приводит к более выраженным изменениям иммунного статуса по сравнению с радиотерапией очагов в легких.

- Изучена взаимосвязь между количеством облученных очагов и динамикой изменений в иммунном статусе после стереотаксической лучевой терапии.
- Проанализировано влияние статуса PD-L1 на динамику иммунологических изменений после проведения СТЛТ у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей.

Научная и практическая значимость

СТЛТ вызывает выраженные позитивные иммунологические изменения у больных с метастатическими формами солидных опухолей, что позволяет применять ее в комбинации с иммунотерапевтическими препаратами (в особенности, у пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого, диссеминированной меланомой кожи). Эффект СТЛТ выражается в высоких показателях локального контроля, а комбинация высокодозной радиотерапии и иммунотерапии способствует усилению противоопухолевого эффекта, который может выражаться в увеличении показателей безрецидивной и общей выживаемости онкологических пациентов. Принимая во внимание то, что наиболее выраженные иммунологические изменения наблюдаются через 3-4 нед. после лучевого воздействия, представляется оправданной комбинация СТЛТ с иммуноонкологическими препаратами именно в эти сроки. У больных с негативной экспрессией PD-L1 стереотаксическая лучевая терапия вызывает достоверную активацию иммунного ответа и может использоваться как в качестве самостоятельного фактора, индуцирующего иммунный ответ, так и в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

Методология и методы исследования

Настоящее исследование основано на проспективном сравнительном анализе иммунологических показателей 46 пациентов (30 женщин и 16 мужчин) с метастатическими формами солидных опухолей (средний возраст 55,9 лет [95% ДИ 52,4 - 59,4]) после стереотаксической лучевой терапии.

У всех больных производилась оценка иммунного статуса до и в различные сроки после завершения стереотаксической лучевой терапии на метастатические очаги, локализованные в печени или в легком. Критериями исключения были анамнестические сведения и данные лабораторных исследований, свидетельствующие об имеющейся гематологической патологии. У всех 46-ти пациентов диагностированы солидные опухоли различных локализаций с метастатическим поражением печени или легких.

Стереотаксическая лучевая терапия выполнялась на линейном ускорителе электронов «Novalis Tx» ЕХ=6 МэВ, облучению подвергались метастазы в печени или легких в различных дозовых режимах.

Морфологическое исследование проводилось в патологоанатомическом отделении НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Для определения PD-L1 экспрессии был использован морфологический материал (первичная опухоль или метастаз), полученный до проведения СТЛТ. Определение экспрессии PD-L1 выполнялось по стандартной методике с использованием набора 22С3 (платформа Dako, Inc).

Для оценки иммунологических показателей использовали образцы периферической крови пациентов (иммунологические исследования у больных проводились впервые, с помощью метода проточной цитофлуориметрии).

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 [Friedman, 1940]. В качестве апостериорного теста для множественных попарных сравнений использовали критерий Немени [P. Nemenyi, 1963].

Основные положения, выносимые на защиту

1. Стереотаксическая лучевая терапия метастазов в легкие или печень приводит к активации Т-клеточного противоопухолевого иммунитета.
2. При СТЛТ метастазов в печени или легких использование суммарной эквивалентной дозы (EQD2) 93,75 Гр – 105,75 Гр приводит к более выраженной активации Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа, чем облучение в более высоких дозах (EQD2=150 Гр).
3. При облучении одного метастаза наблюдается более активный рост показателей Т-клеточного звена иммунитета по сравнению с больными, которым облучению подвергаются 2 и более метастатических очага.
4. Более выраженное увеличение показателей Т-клеточного звена иммунитета определяется после СТЛТ метастатических очагов в печени по сравнению с облучением метастазов в легких.
5. У пациентов с негативной экспрессией PD-L1 (CPS<1) после СТЛТ отмечается более активный иммунный ответ по сравнению с пациентами с позитивным статусом PD-L1 (CPS≥1).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов работы подтверждается достаточным объемом выборки, сопоставимым с существующими международными исследованиями [Tang S. et al., 2018], использованием современных иммунологических методов диагностики, а также обработкой полученных данных с применением методов статистического анализа, которые можно корректно использовать для множественных попарных сравнений (критерий Фридмана и критерий Немени).

Основные результаты диссертационной работы представлены на следующих научно-практических мероприятиях: Конкурс молодых ученых в рамках XXIII Российского онкологического конгресса (г. Москва, 2019 г.); V конференция молодых учёных, посвященная памяти академика А.Ф. Цыба «Перспективные направления в онкологии, радиобиологии и радиологии» (г. Обнинск, 2019 г.); Конкурс научно-исследовательских проектов в области онкологии некоммерческой организации «Фонд поддержки научных исследований в онкологии» (г. Москва, 2020 г.); VI Петербургский онкологический Форум «Белые ночи – 2020» (г. Санкт-Петербург, 2020 г.); Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (г. Томск, 2020 г.); Иммуноонкологический конгресс Европейского общества медицинских онкологов (ESMO), постерная сессия (Швейцария, г. Женева, 2020 г.); Конкурс молодых ученых в рамках VI Петербургского онкологического Форума «Белые ночи – 2020» (г. Санкт-Петербург, 2020 г.); конкурс молодых ученых в рамках Невского радиологического форума (г. Санкт-Петербург, 2021 г.); VII Петербургский международный онкологический Форум «Белые ночи – 2021» (г. Санкт-Петербург, 2021 г.); V Всероссийский конгресс РАТРО «От простого к сложному к вершинам науки» (г. Москва, 2021 г.).

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 5 работ.

Внедрение результатов

Результаты исследования внедрены в научно-практическую деятельность научного отдела онкоиммунологии, научного отделения радиационной онкологии и ядерной медицины федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 11.10.2021).

Личный вклад автора

Автор непосредственно принимал участие на всех этапах проведения исследования: скрининг пациентов для проведения стереотаксической лучевой терапии, создание лучевого плана и непосредственно проведение радиотерапевтического лечения больных; забор биоматериала и выполнение иммунологических исследований. Автор самостоятельно выполнил сбор данных, статистический анализ результатов, сформулировал выводы и практические рекомендации по материалам исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения настоящей диссертационной работы соответствует паспорту специальности «3.1.6 – онкология, лучевая терапия» («медицинские науки») по пунктам 2, 5.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3-х глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, включающего 115 источников (4 отечественных и 111 зарубежных). Работа содержит 10 таблиц, иллюстрирована 32 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Настоящее исследование основано на проспективном сравнительном анализе иммунологических показателей 46 пациентов (30 женщин и 16 мужчин) с метастатическими формами солидных опухолей (средний возраст 55,9 лет [95% ДИ 52,4 - 59,4]) после стереотаксической лучевой терапии в условиях отделения радиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с октября 2018 г. по декабрь 2020 г. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 13 от 29 октября 2018 г.).

Критерии включения в исследование: морфологически подтвержденный диагноз метастатической солидной опухоли; анатомическая локализация метастаза в печени или легких, позволяющая подвести радикальную дозу СТЛТ; размер метастаза в печени или легких менее 5 см; количество метастазов в печени или легких, планируемых для проведения СТЛТ, не более 3; ожидаемая продолжительность жизни > 2 месяцев; абсолютное содержание нейтрофилов $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$; тромбоциты $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$; уровень гемоглобина ≥ 90 г/л на момент начала лечения; возраст ≥ 18 лет; сердечная функция (\leq XCH II ФК класс по NYHA), компенсированная гипертоническая болезнь \leq II стадии или артериальная гипертензия \leq 2 степени; ECOG 0 – 2; повышения трансаминаз и билирубина ≤ 1 ст.; у пациентов с метастатическим поражением печени повышения трансаминаз и билирубина ≤ 2 ст. (NCI CTCAE v5.0); наличие добровольно подписанного информированного согласия пациентом или его законным представителем на проведение стереотаксической лучевой терапии.

Критерии исключения из исследования: неконтролируемое инфекционное заболевание; тяжелое сопутствующее заболевание; ECOG 3 и более; вторичный приобретенный иммунодефицит; наличие гепатитов В и С в острой фазе; беременность и лактация.

У всех больных производилась оценка иммунного статуса до лучевого лечения, через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после завершения стереотаксической лучевой терапии на метастатические очаги, локализованные в печени или в легком. Характеристика пациентов, включенных в исследование, приведена в таблице 1.

Таблица 1

Распределение пациентов по первичной локализации и облучаемому метастатическому очагу

Первичная локализация	Количество	Локализация облученного очага	
		Печень	Легкие
Колоректальный рак	20	17	3
Рак молочной железы	6	5	1
Немелкоклеточный рак легкого	5	2	3
Саркомы мягких тканей	4	2	2
Остеогенные саркомы	2	0	2
Рак околоушной слюной железы	3	0	3
Меланома	2	2	0
Рак пищевода	1	1	0
Рак предстательной железы	1	0	1
Гепатоцеллюлярный рак	1	0	1
Рак почки	1	0	1
Всего	46	29	17

Стереотаксическая лучевая терапия проводилась в качестве одного из компонентов комплексного противоопухолевого лечения. Все больные ранее получали системную лекарственную терапию (от 1 до 4-х линий различных режимов химиотерапии / гормонотерапии / таргетной терапии в зависимости от первичной локализации в соответствии с действующими клиническими рекомендациями). СТЛТ применялась у исследуемых больных на этапе стабилизации после проведенного лекарственного лечения для усиления эффекта системной терапии или при локальном характере прогрессирования (ЛТ проводилась на прогрессирующий метастаз). После завершения радиотерапии с результатами запланированного контрольного обследования пациенты были направлены к химиотерапевту для решения вопроса о необходимости системной терапии.

Стереотаксическая лучевая терапия выполнялась на линейном ускорителе электронов «Novalis Tx» ЕХ=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. У каждого больного стереотаксическая лучевая терапия использовалась для облучения от одного до трех метастатических очагов.

В соответствии с величиной эквивалентной суммарной очаговой дозы, при облучении метастатических очагов в легких и печени больные были разделены на 2 группы: EQD2: EQD2<106 Гр (23 пациентов) и EQD2>106 Гр (23 пациента).

Кроме того, проанализированы различия в динамике показателей иммунного статуса у больных с облучением одного метастатического очага (32 пациента) и у пациентов с облучением 2-х и более метастатических очагов (14 больных).

В зависимости от локализации облученного органа проведен сравнительный анализ динамики показателей иммунного статуса в группах с облучением метастазов в печени (29 пациентов) и в легких (17 больных).

Отдельно проведен анализ динамики иммунного статуса 21 больного, у которых при исследовании морфологического материала определялась экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1). Морфологическое исследование проводилось

в патологоанатомическом отделении НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Для определения PD-L1 экспрессии был использован морфологический материал (первичная опухоль или метастаз), полученный до проведения СТЛТ. Определение экспрессии PD-L1 выполнялось по стандартной методике с использованием набора 22C3 (платформа Dako, Inc). Пациенты были распределены по группам с учетом индекса **Combined Positive Score (CPS)** - количество опухолевых и лимфоидных PD-L1 клеток с позитивным окрашиванием по отношению к общему количеству жизнеспособных опухолевых клеток, умноженное на 100 (CPS<1 – группа с негативной экспрессией, а CPS≥1 — позитивной).

Оценка иммунологических показателей производилась в 3-х 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 Biosciense, США (исследование иммунологических показателей у пациентов выполнялось впервые). Для обработки данных использовали программное обеспечение BD FACSDiva (версия 8.0.1).

Фенотипы определяемых субпопуляций иммунологических показателей представлены в таблице 2.

Таблица 2

Основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток и их фенотип

Номер	Показатель	Фенотип
1	Т-лимфоциты	CD3 ⁺ CD19 ⁻
2	В-лимфоциты	CD3 ⁻ CD19 ⁺
3	Т-хелперы	CD3 ⁺ CD4 ⁺
4	Активированные Т-хелперы	CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺
5	Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	CD4 ⁺ CD25 ⁺
6	Цитотоксические Т-лимфоциты	CD3 ⁺ CD8 ⁺
7	Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺
8	НК-клетки	CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺
9	НКТ-клетки, НКТ-подобные лимфоциты, γδ-Т-клетки	CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺
10	Двойные положительные Т-лимфоциты	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺
11	Двойные отрицательные Т-лимфоциты	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
12	Т-регуляторные лимфоциты	CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{low}
13	Иммунорегуляторный индекс	CD4 ⁺ /CD8 ⁺

Для более удобной и наглядной интерпретации результатов исследования построены визуальные ряды и диаграммы, характеризующие динамику показателей иммунного статуса.

Систематизацию, статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2010 и R v. 3.6.2. Для определения статистически значимых различий в динамике изменения показателей применяли критерий Фридмана [Friedman, 1940]. В качестве апостериорного теста для множественных попарных сравнений использовали критерий Немени [P. Nemenyi, 1963]. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями после проведения стереотаксической лучевой терапии

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 отсутствуют. В связи с этим, в представленном исследовании была проанализирована динамика иммунного статуса после СТЛТ метастатических изменений легких или печени у 46 пациентов (табл. 3).

Таблица 3

Значения иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями на фоне проведения стереотаксической лучевой терапии

Субпопуляция иммунного статуса	Медианное значение показателя		
	до СТЛТ	через 3-4 нед. после СТЛТ	через 6-8 нед. после СТЛТ
НК-клетки	15,15	14,15	14,1
НКТ-подобные лимфоциты	6,8	5,35	5,35
Т-регуляторные лимфоциты	9,7	8	8,45
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	19,05	20,85	21,3
Активированные Т-хелперы	4,9	7,3	6,8
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	9,45	10,9	11,65
В-лимфоциты	6,2	4,75	5,85
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	3	2,8	3,25
Двойные положительные Т-лимфоциты	1,9	1,8	1,8
Иммунорегуляторный индекс	1,435	1,555	1,45
Т-лимфоциты	74,05	76,55	75,75
Т-хелперы	40,65	43,95	40,25
Цитотоксические Т-лимфоциты	28,9	26,8	29,95

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 по сравнению с исследованием до СТЛТ [χ^2 Фридмана = 13,781; p = 0,001; попарное p = 0,001]. Кроме того, отмечалось статистически значимое повышение субпопуляции Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) [χ^2 Фридмана = 11,01; p = 0,004; попарное p = 0,003] через 3-4 нед. после облучения по сравнению с исследованием до ЛТ и недостоверным постепенным снижением их концентрации к 6-8 нед. после облучения.

Отмечалось повышение содержания активированных Т-хелперов через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после окончания СТЛТ по сравнению с исследованием до облучения (рис. 1) [χ^2 Фридмана = 38,8; p = 0,001; попарное p = 0,001 и 0,001 соответственно].

Также было отмечено статистически значимое повышение активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности антиген HLA-DR⁺, через 3-4 нед. после завершения радиотерапии (попарное p = 0,001) и продолжающийся рост показателей данной субпопуляции через 6-8 нед. после лучевого воздействия (попарное p = 0,004) [χ^2 Фридмана = 15,4; p = 0,001] (рис. 2).

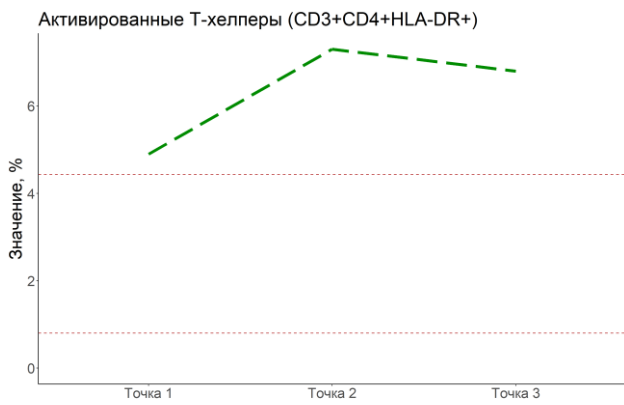


Рис.1. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных Т-хелперов (медианы значений)

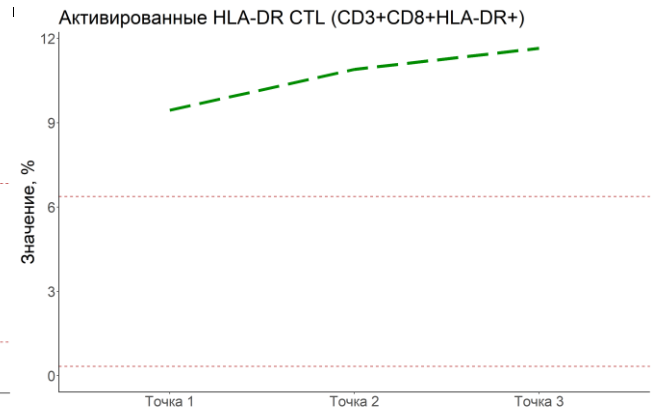


Рис.2. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (медианы значений)

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 [χ^2 Фридмана = 35,4; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,002$ соответственно]. При этом, клетки гуморального звена статистически значимо повышались через 6-8 нед. после облучения по сравнению с исследованием через 3-4 нед. [попарное $p = 0,001$]. Также было отмечено статистически значимое повышение иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$) через 3-4 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до радиотерапии [χ^2 Фридмана = 7,1; $p = 0,03$, попарное $p = 0,01$].

Кроме того, зафиксировано уменьшение Т-регуляторных лимфоцитов ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$), обладающих иммуносупрессивной функцией, через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после проведения СТЛТ [χ^2 Фридмана = 12,96; $p = 0,002$, попарное $p = 0,004$ и $0,01$ соответственно] по сравнению с исследованием до радиотерапии (рис. 3).

Также наблюдалось снижение NKT-клеток ($CD3^+CD16^+56^+$) через 6-8 нед. после облучения по сравнению с исследованием до СТЛТ [χ^2 Фридмана = 9,8; $p = 0,007$; попарное $p = 0,006$].

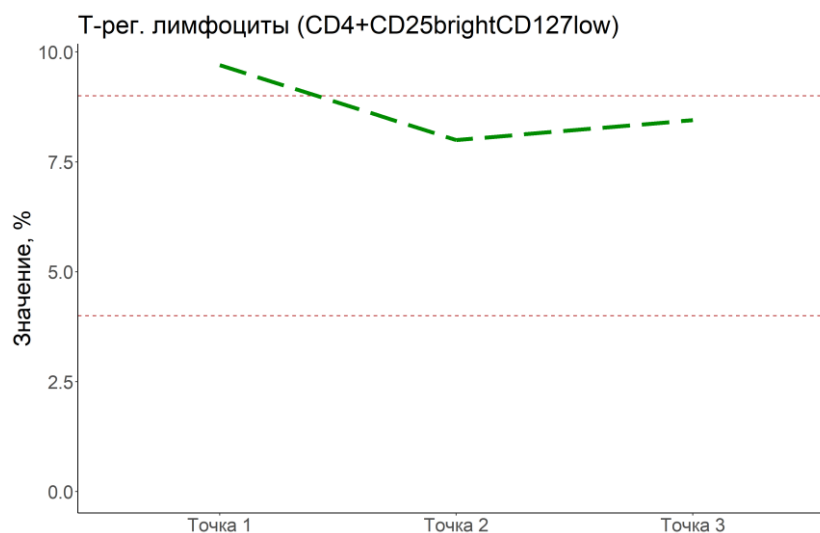


Рис.3. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-регуляторных лимфоцитов (медианы значений)

Статистически значимых изменений остальных показателей иммунного статуса (активированные CD25⁺ Т-хелперы, НК-клетки, двойные положительные Т-лимфоциты, двойные отрицательные Т-лимфоциты) в исследуемой группе пациентов выявлено не было.

Полученные результаты позволяют сформулировать выводы об интенсификации Т-клеточной активации 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⁺) на фоне снижения показателей Т-регуляторных лимфоцитов (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}) и 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.

2. Оценка взаимосвязи между характером изменений в иммунном статусе и режимом подведения дозы при стереотаксической лучевой терапии

На сегодняшний день происходит активная дискуссия в отношении влияния дозы СТЛТ на выраженность системных иммунологических эффектов радиотерапии. Клинические данные, позволяющие напрямую сравнивать различные режимы подведения дозы отсутствуют. В связи с этим, была изучена динамика иммунного статуса больных на фоне СТЛТ в зависимости от режима подведения и величины суммарной поглощенной дозы (табл. 4). Пациенты были распределены следующим образом: группа А - EQD2 < 106 Гр (23 пациента) и группа В - EQD2 > 106 Гр (23 пациента).

Таблица 4

Значения иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями на фоне проведения СТЛТ в зависимости от подведенной дозы

Субпопуляция иммунного статуса	Доза EQD2: А <106 Гр В >106 Гр	Медианное значение показателя		
		до СТЛТ	через 3-4 нед. после СТЛТ	через 6-8 нед. после СТЛТ
НК-клетки	А	13,3	13,8	14
НКТ-подобные лимфоциты	А	5,3	5,1	4,6
Т-регуляторные лимфоциты	А	9,6	8,6	8,7
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	А	18,5	19,4	21,6
Активированные Т-хелперы	А	4,6	7	7,5
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	А	8,5	10,9	11,7
В-лимфоциты	А	6,2	4,7	5,4
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	А	2,8	2,7	2,6
Двойные положительные Т-лимфоциты	А	1,8	1,8	1,7
Иммунорегуляторный индекс	А	1,55	1,6	1,4
Т-лимфоциты	А	73,4	78,3	77,4
Т-хелперы	А	40,8	44,1	40,3
Цитотоксические Т-лимфоциты	А	27,3	26,4	30,1

НК-клетки	В	17,5	15,6	14,7
НКТ-подобные лимфоциты	В	7,8	6,6	6
Т-регуляторные лимфоциты	В	9,8	7,7	8
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	В	20,2	21,1	21,2
Активированные Т-хелперы	В	5	7,3	5,9
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	В	11	10,1	11,6
В-лимфоциты	В	6	4,8	6
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	В	4,5	3	3,3
Двойные положительные Т-лимфоциты	В	1,9	1,8	1,9
Иммунорегуляторный индекс	В	1,33	1,5	1,5
Т-лимфоциты	В	74,2	76,1	73,7
Т-хелперы	В	40,5	43,8	40,2
Цитотоксические Т-лимфоциты	В	29,9	28,3	29,8

При исследовании Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) у пациентов с распространенными формами солидных опухолей обнаружено статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) через 3-4 нед. после облучения как в группе с использованием дозы EQD2<106 Гр (группа А) [χ^2 Фридмана = 7,3; p = 0,03; попарное p = 0,02], так и в группе с EQD2>106 Гр (группа В) [χ^2 Фридмана = 7,1; p = 0,03; попарное p = 0,03].

Кроме того, зафиксировано статистически значимое увеличение Т-хелперов через 3-4 нед. после завершения лучевой терапии по сравнению с исследованием до СТЛТ в группе с EQD2<106 Гр [χ^2 Фридмана = 6,96; p = 0,03; попарное p = 0,03]. В группе В (EQD2>106 Гр) изменений в содержании данной субпопуляции клеток обнаружено не было.

Отмечалось статистически значимое повышение содержания активированных Т-хелперов через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после окончания СТЛТ в сравнении с исследованием до облучения как в группе А (EQD2<106 Гр) [χ^2 Фридмана = 26,2; p = 0,001; попарное p = 0,001 и 0,001 соответственно], так и в группе В (EQD2>106 Гр) (рис. 4) [χ^2 Фридмана = 14,2; p = 0,001; попарное p = 0,001 и 0,003 соответственно]. При этом в группе В наблюдалась тенденция к снижению клеток данной субпопуляции через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием через 3-4 нед.

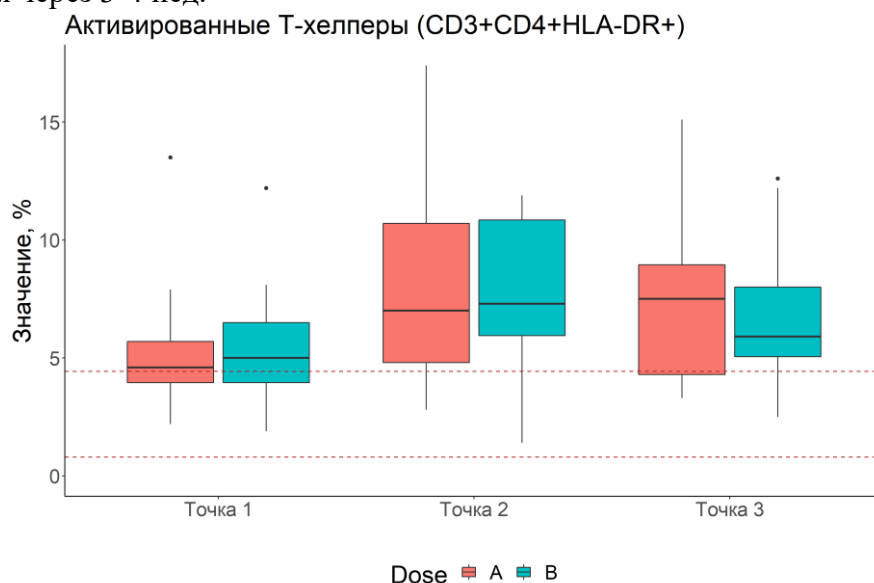


Рис. 4. Динамика (box-plot) содержания активированных Т-хелперов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

Кроме того, при анализе содержания активированных $CD4^+CD25^+$ Т-хелперов отмечено статистически значимое увеличение данных клеток через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до радиотерапии в группе А ($EQD2 < 106$ Гр) [χ^2 Фридмана = 6,3; $p = 0,04$; попарное $p = 0,03$ соответственно]. В группе с использованием дозы $EQD2 > 106$ Гр статистически значимых изменений в данном показателе не обнаружено.

Достаточно интересна картина динамики активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$). При использовании $EQD2 < 106$ Гр 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 = 16,1; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,003$ соответственно]. При этом, статистически значимых изменений в клетках с фенотипом $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$ при $EQD2 > 106$ Гр не было зафиксировано (рис. 5).

Интересные данные получены при оценке динамики Т-регуляторных лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией. Так, в группе $EQD2 > 106$ Гр было отмечено снижение показателей данной субпопуляции через 3-4 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 7,7; $p = 0,02$; попарное $p = 0,04$]. В группе $EQD2 < 106$ Гр, не получено статистически значимых изменений в данной субпопуляции, однако тенденция к снижению очевидна (рис. 5).

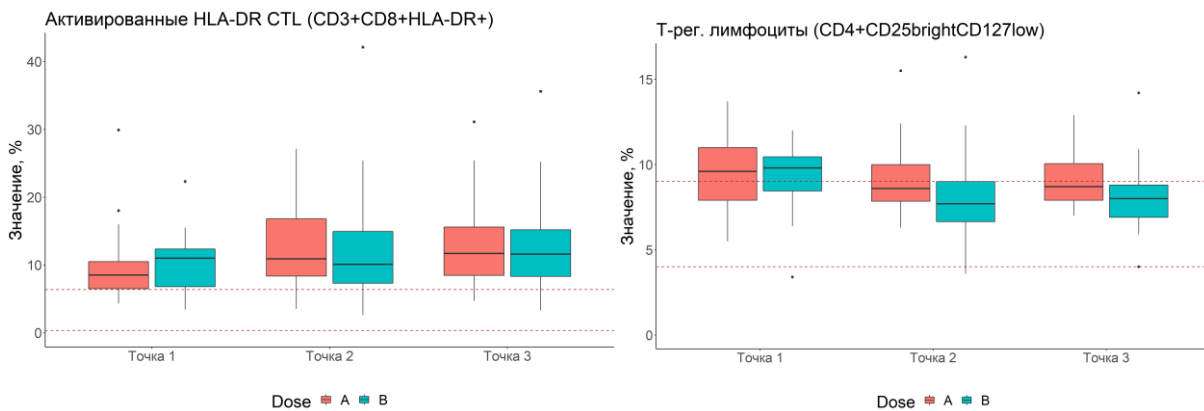


Рис. 5. Динамика (box-plot) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-регуляторных лимфоцитов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

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 $EQD2 < 106$ Гр [χ^2 Фридмана = 15,3; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,04$ соответственно]. В случае использования более высоких доз ($EQD2 > 106$ Гр), зафиксировано статистически значимое снижение В-лимфоцитов только через 3-4 нед. после лучевого воздействия и последующее увеличение показателей данной субпопуляции через 6-8 нед. по сравнению с исследованием через 3-4 нед. после радиотерапии [χ^2 Фридмана = 16,4; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,02$ соответственно]. Также, отмечено статистически значимое увеличение иммунорегуляторного индекса в группе $EQD2 < 106$ Гр через 3-4 нед. по сравнению с исследованием до СТЛТ [χ^2 Фридмана = 6,5; $p = 0,04$; попарное $p = 0,04$].

В результате проведенного исследования обнаружено, что при использовании $EQD2 < 106$ Гр происходит более активный иммунный ответ преимущественно за счет увеличения Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^+$); активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$); активированных $CD4^+CD25^+$ Т-хелперов и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$). Кроме того, было зафиксировано статистически значимое снижение Т-регуляторных лимфоцитов в группе $EQD2 > 106$ Гр. Показатели гуморального иммунитета снижались на фоне СТЛТ в обеих дозовых группах ($EQD2 < 106$ Гр и $EQD2 > 106$ Гр).

3. Определение взаимосвязи между количеством облученных очагов и динамикой изменений в иммунном статусе после стереотаксической лучевой терапии

На настоящий момент, вопрос о взаимосвязи между изменениями иммунного статуса и объемом облучения остается открытым и малоизученным. В связи с этим, была проанализирована динамика иммунного статуса 46 больных в зависимости от количества метастатических очагов, облученных с помощью СТЛТ: группа А (32 пациента) - с облучением одного метастатического очага; группа Б (14 пациентов) - с облучением 2-х и более метастатических очагов (табл. 5).

Таблица 5

Значения иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями на фоне проведения СТЛТ в зависимости от количества облучаемых очагов

Субпопуляция иммунного статуса	Кол-во облученных очагов: А – 1 Б ≥ 2	Медианное значение показателя		
		до СТЛТ	через 3-4 нед. после СТЛТ	через 6-8 нед. после СТЛТ
НК-клетки	А	18,35	15,5	14,85
НКТ-подобные лимфоциты	А	6,8	5,35	5,1
Т-регуляторные лимфоциты	А	9,8	8,15	8,6
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	А	18,4	19,55	21,2
Активированные Т-хелперы	А	4,5	7,3	6,7
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	А	8,95	10,5	10,8
В-лимфоциты	А	6,85	4,8	5,85
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	А	2,7	2,3	2,35
Двойные положительные Т-лимфоциты	А	1,9	1,95	2,2
Иммунорегуляторный индекс	А	1,3	1,53	1,35
Т-лимфоциты	А	72,45	76,35	74,5
Т-хелперы	А	38,25	42,95	39,3
Цитотоксические Т-лимфоциты	А	30,2	26,55	30,55
НК-клетки	Б	13,85	10,85	13,25
НКТ-подобные лимфоциты	Б	6,05	5,35	5,55
Т-регуляторные лимфоциты	Б	9,7	7,95	8,05
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	Б	19,9	21,85	22,15
Активированные Т-хелперы	Б	5,65	7,65	7,6
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	Б	9,55	12,1	12,85
В-лимфоциты	Б	6,05	4,25	5,7
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	Б	4,55	3	3,5
Двойные положительные Т-лимфоциты	Б	1,95	1,6	1,6
Иммунорегуляторный индекс	Б	1,69	1,605	1,515
Т-лимфоциты	Б	75,7	80,55	76,95
Т-хелперы	Б	46,1	45,05	44,35
Цитотоксические Т-лимфоциты	Б	28,35	27,65	28,25

При анализе показателей иммунного статуса в зависимости от количества облученных очагов обнаружено статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$) через 3-4 нед. после радиотерапии в группе, где был облучен один очаг (группа А) [χ^2 Фридмана = 9,2; $p = 0,01$; попарное $p = 0,008$]. В те же временные сроки после СТЛТ в группе А наблюдалось и увеличение количества Т-хелперов [χ^2 Фридмана = 9,1; $p = 0,01$; попарное $p = 0,008$]. Изменений вышеуказанных показателей иммунного статуса не происходило в группе с облучением 2 и более очагов (группа Б) (рис. 6).

В группе А было зафиксировано увеличение содержания активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$) через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после облучения в сравнении со значениями, полученными до начала СТЛТ [χ^2 Фридмана = 33,2; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и 0,001 соответственно]. В группе Б также наблюдалась тенденция к увеличению показателей данной субпопуляции, однако в подгрупповом анализе статистически значимых изменений получено не было [χ^2 Фридмана = 6,9; $p = 0,03$; попарное $p = 0,06$ и 0,06 соответственно] (рис. 6).

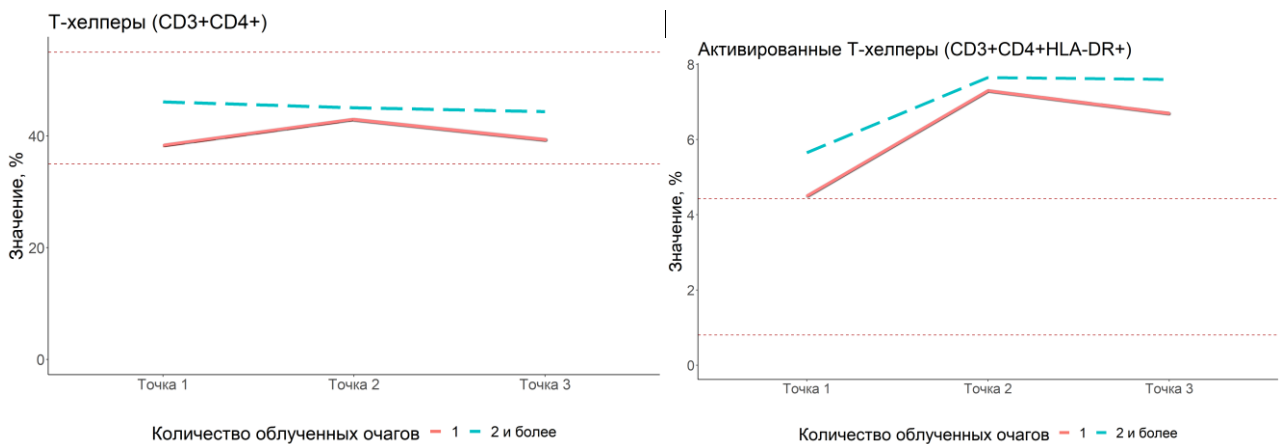


Рис. 6. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-хелперов и активированных Т-хелперов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

Помимо этого, статистически значимые изменения наблюдались в содержании активированных цитотоксических Т-лимфоцитов. Так, при облучении одного метастатического очага через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после СТЛТ, по сравнению с исследованием до радиотерапии, отмечалось статистически значимое увеличение показателей данной субпопуляции [χ^2 Фридмана = 11,6; $p = 0,003$; попарное $p = 0,005$ и 0,02 соответственно]. В группе Б статистически значимых изменений обнаружено не было, однако наблюдалась тенденция к увеличению содержания цитотоксических Т-лимфоцитов.

Кроме того, зафиксировано статистически значимое снижение В-лимфоцитов через 3-4 нед. после СТЛТ в сравнении с показателями до облучения как в группе Б (с облучением 2-х и более очагов) [χ^2 Фридмана = 13; $p = 0,002$; попарное $p = 0,001$], так и в группе А [χ^2 Фридмана = 18,3; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$].

В группе с облучением одного очага отмечено увеличение иммунорегуляторного индекса через 3-4 нед. после облучения в сравнении с исследованием до лучевого лечения [χ^2 Фридмана = 9,9; $p = 0,007$; попарное $p = 0,006$]. Помимо этого, в группе А было зафиксировано снижение НК-клеток [χ^2 Фридмана = 7; $p = 0,003$; попарное $p = 0,003$] и НКТ-подобных лимфоцитов [χ^2 Фридмана = 9,3; $p = 0,001$; попарное $p = 0,008$] через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до радиотерапии. В группе Б статистически значимых изменений данных показателей не наблюдалось.

При анализе Т-регуляторных лимфоцитов в группе, где облучения подвергался один очаг, зафиксировано снижение показателей данной субпопуляции через 3-4 нед. и через 6-8 нед. по сравнению с исследованием до лучевой терапии [χ^2 Фридмана = 13,2; $p = 0,001$; попарное $p = 0,005$ и 0,006 соответственно]. В группе с облучением нескольких

метастатических очагов также наблюдалась тенденция (статистически незначимая) к снижению Т-регуляторных лимфоцитов.

Согласно данным проведенного исследования, анализ показателей иммунного статуса в зависимости от количества облученных очагов показал, что более активный Т-клеточный иммунный ответ происходит в группе с облучением одного метастатического очага. При анализе полученных данных создается впечатление о более поздней активации Т-клеток при облучении нескольких метастазов по сравнению с радиотерапией одного очага.

4. Сравнение степени выраженности иммунологических изменений, возникающих после проведения облучения метастазов в печени и легких

Одной из задач настоящего исследования стало изучение динамики иммунного статуса больных метастатическими формами солидных опухолей в зависимости от локализации облучаемых метастатических изменений – в печени (29 пациентов) или легких (17 больных) (табл. 6).

Таблица 6

Значения иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями на фоне проведения СТЛТ в зависимости от локализации облучаемых очагов

Субпопуляция иммунного статуса	Локализация облучаемого метастаза	Медианное значение показателя		
		до СТЛТ	через 3-4 нед. после СТЛТ	через 6-8 нед. после СТЛТ
НК-клетки	Легкое	18,8	15,6	13,7
НКТ-подобные лимфоциты	Легкое	7,3	5,9	5,5
Т-регуляторные лимфоциты	Легкое	10	7,9	8,1
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	Легкое	21,6	20,1	24,5
Активированные Т-хелперы	Легкое	4,4	6,9	5,3
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	Легкое	8	8,6	9,2
В-лимфоциты	Легкое	6,6	6,2	7,1
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	Легкое	4,3	3,7	4,3
Двойные положительные Т-лимфоциты	Легкое	2,1	2	2
Иммунорегуляторный индекс	Легкое	1,29	1,5	1,28
Т-лимфоциты	Легкое	73,4	72,9	73,6
Т-хелперы	Легкое	37,4	39,5	38,4
Цитотоксические Т-лимфоциты	Легкое	29,3	28,3	30,7
НК-клетки	Печень	14,5	12,75	14,1
НКТ-подобные лимфоциты	Печень	6,4	5,35	5,25
Т-регуляторные лимфоциты	Печень	9,5	8,05	8,55
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	Печень	18,15	20,85	20,45
Активированные Т-хелперы	Печень	5,15	7,4	7,25
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	Печень	10	12,85	12,85

В-лимфоциты	Печень	6,15	3,4	5,05
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	Печень	2,75	2,7	2,9
Двойные положительные Т-лимфоциты	Печень	1,75	1,6	1,6
Иммунорегуляторный индекс	Печень	1,5	1,65	1,515
Т-лимфоциты	Печень	75,6	80,65	76,95
Т-хелперы	Печень	43,1	48,2	43,3
Цитотоксические Т-лимфоциты	Печень	28,9	26,65	29,95

Исследование динамики показателей иммунного статуса у пациентов с метастатическими опухолями различной локализации показало статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$) через 3-4 нед. после облучения и последующим достоверным снижением через 6-8 нед. после завершения СТЛТ в группе с облучением метастазов в печени [χ^2 Фридмана = 12,8; $p = 0,002$; попарное $p = 0,002$ и $0,02$ соответственно]. Аналогичная динамика показателей наблюдалась при исследовании субпопуляции Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) [χ^2 Фридмана = 10,6; $p = 0,005$; попарное $p = 0,006$] через 3-4 нед. после СТЛТ в группе, где облучению подверглись очаги в печени. Статистически значимых изменений вышеуказанных показателей при облучении метастазов в легких обнаружено не было.

Отмечалось повышение содержания активированных Т-хелперов через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после завершения лучевой терапии по сравнению с исследованием до облучения как в группе с облучением печени [χ^2 Фридмана = 29,2; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,001$ соответственно], так и легких [χ^2 Фридмана = 8,9; $p = 0,01$; попарное $p = 0,02$ и $0,04$ соответственно] (рис. 7).

Также, было отмечено статистически значимое повышение активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности антиген HLA-DR⁺, через 3-4 нед. после завершения радиотерапии (попарное $p = 0,004$) и через 6-8 нед. после лучевого воздействия (попарное $p = 0,01$) [χ^2 Фридмана = 12,2; $p = 0,004$] в группе с облучением метастазов в печени. Подобных изменений не наблюдалось при облучении очагов в легких (рис. 7).

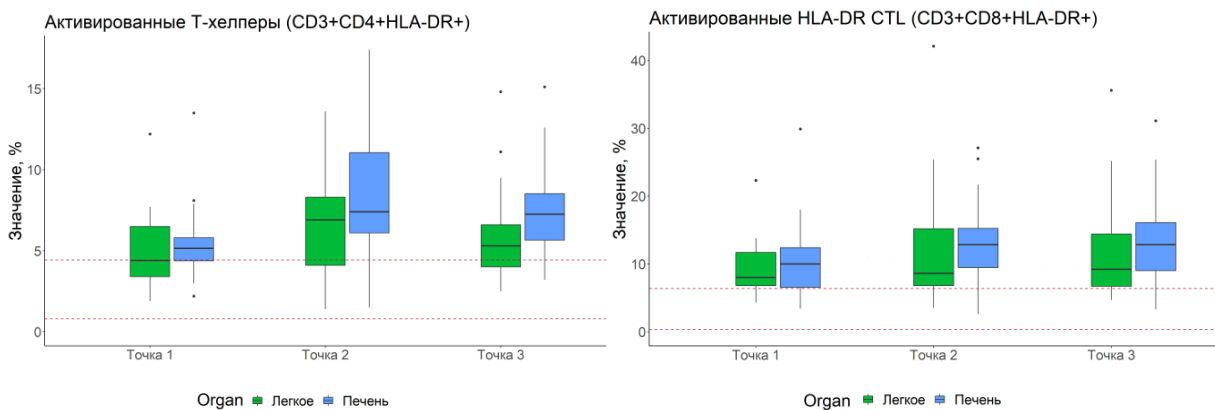


Рис. 7. Динамика (box-plot) содержания активированных Т-хелперов и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов в зависимости от локализации опухолевого очага (медианы значений)

При исследовании В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) отмечалось их снижение через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с иммунологическими показателями до проведения радиотерапии в группе с облучением очагов в печени [χ^2 Фридмана = 29,7; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,007$ соответственно]. При этом, наблюдалось статистически значимое восстановление клеток данной субпопуляции через 6-8 нед. по сравнению с исследованием через 3-4 нед. (попарное $p = 0,04$). При облучении метастазов в легких вышеуказанных изменений не зафиксировано.

Кроме того, в группе с облучением метастазов в печени, было обнаружено статистически значимое повышение иммунорегуляторного индекса через 3-4 нед. после завершения радиотерапии (попарное $p = 0,04$) и последующее снижение через 6-8 нед. после лучевого воздействия (попарное $p = 0,01$) [χ^2 Фридмана = 10,8; $p = 0,004$].

В этой же группе (с облучением метастазов в печени) отмечено снижение НКТ-клеток через 6-8 нед. после СТЛТ в сравнении с исследованием до облучения [χ^2 Фридмана = 9,02; $p = 0,01$; попарное $p = 0,01$]. Не было зафиксировано статистически значимых изменений в вышеуказанных показателях при облучении очагов в легких, однако в данной группе наблюдалось статистически значимое снижение Т-регуляторных лимфоцитов через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после стереотаксической лучевой терапии в сравнении с показателями до лучевого лечения [χ^2 Фридмана = 15,6; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,006$ соответственно]. Помимо этого, отмечено снижение НК-клеток через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 9,3; $p = 0,01$; попарное $p = 0,01$].

Таким образом, согласно данным проведенного исследования отмечается более выраженная активация Т-клеточного звена иммунитета в группе с облучением метастазов в печени по сравнению с группой, где облучению подвергались очаги в легких.

5. Изучение влияния статуса PD-L1 на динамику иммунологических изменений после проведения СТЛТ у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей

В группе 21 больного проведен анализ взаимосвязи между динамикой иммунологических показателей до и после СТЛТ и уровнем экспрессии PD-L1 в морфологическом материале, полученном до начала лучевого лечения.

Результаты определения экспрессии PD-L1 в морфологическом материале пациентов, полученным до проведения стереотаксической лучевой терапии, представлены в табл. 7.

Таблица 7

Оценка экспрессии PD-L1 у исследуемых пациентов по индексу CPS

Пациент	Опухоль/метастаз	CPS	Даты СТЛТ
1	Первичная опухоль от 12.2018 (трепан-биопсия)	2	12.2018
2	Первичная опухоль от 05.2017	12	11.2018
3	Метастаз от 07.2017	менее 1	06.2019
4	Метастаз от 08.2017	7	12.2018
5	Метастаз от 08.2019	0	09.2019
6	Метастаз от 02.2018	менее 1	12.2018

7	Метастаз от 05.2019	3	07.2019
8	Первичная опухоль от 12.2018	2	10.2019
9	Первичная опухоль от 08.2018 (трепан-биопсия)	15	10.2018
10	Первичная опухоль от 09.2015	0	11.2018
11	Первичная опухоль от 02.2016	0	10.2018
12	Метастаз от 03.2017	0	06.2019
13	Первичная опухоль от 05.2016	0	10.2018
14	Первичная опухоль от 12.2016	менее 1	12.2018
15	Первичная опухоль от 03.2017	0	11.2018
16	Первичная опухоль от 10.2017	менее 1	11.2018
17	Рецидив в области первичной опухоли от 04.2019	1	10.2019
18	Метастаз от 04.2019	1	06.2019
19	Первичная опухоль от 12.2017 (трепан-биопсия)	0	11.2019
20	Метастаз от 04.2019	менее 1	09.2019
21	Первичная опухоль от 12.2017 (трепан-биопсия)	10	07.2019

При использовании индекса CPS положительная экспрессия PD-L1 установлена у 9 пациентов, а отрицательная экспрессия - у 12 больных. Медианные значения иммунного статуса пациентов с учетом данного индекса представлены в табл. 8.

Таблица 8

Значения иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями на фоне проведения СТЛТ в зависимости от экспрессии PD-L1 (индекс CPS)

Субпопуляция иммунного статуса	Экспрессия PD-L1 (индекс CPS)	Медианное значение показателя		
		до СТЛТ	через 3-4 нед. после СТЛТ	через 6-8 нед. после СТЛТ
НК-клетки	позитивная	14,5	11,6	12,3
НКТ-подобные лимфоциты	позитивная	6,8	5,6	5,7
Т-регуляторные лимфоциты	позитивная	10,3	6,8	7,3
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	позитивная	18,3	24,2	17,3

Активированные Т-хелперы	позитивная	4,5	7,5	7,7
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	позитивная	11	13	12,1
В-лимфоциты	позитивная	5,1	3,5	4,5
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	позитивная	6,5	6,5	5,8
Двойные положительные Т-лимфоциты	позитивная	1,1	1,6	1,5
Иммунорегуляторный индекс	позитивная	1,5	1,6	1,5
Т-лимфоциты	позитивная	76,7	82,1	79,1
Т-хелперы	позитивная	40,8	42,8	36,4
Цитотоксические Т-лимфоциты	позитивная	28,5	26	31,1
НК-клетки	негативная	14,55	11,25	14,4
НКТ-подобные лимфоциты	негативная	6,4	4,9	4,35
Т-регуляторные лимфоциты	негативная	8,8	7,95	8,3
Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	негативная	18,9	18,8	19,15
Активированные Т-хелперы	негативная	5,3	7,45	6,95
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты	негативная	9,9	14,2	14,3
В-лимфоциты	негативная	6,7	5,3	5,9
Двойные отрицательные Т-лимфоциты	негативная	2,4	1,95	2,35
Двойные положительные Т-лимфоциты	негативная	2,15	1,8	1,7
Иммунорегуляторный индекс	негативная	1,3	1,63	1,35
Т-лимфоциты	негативная	74,45	78,4	75,05
Т-хелперы	негативная	40,75	46,8	40,6
Цитотоксические Т-лимфоциты	негативная	30,65	28,9	29,95

Согласно результатам сравнительного анализа, отмечалось статистически значимое повышение содержания активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) через 3-4 нед. после завершения лучевой терапии и дальнейшее увеличение показателей данной субпопуляции через 6-8 нед. после окончания СТЛТ в группе CPS<1 [χ^2 Фридмана = 10,5; p = 0,005; попарное p = 0,006 и 0,004 соответственно]. При этом в сравниваемой группе (CPS≥1) увеличение активированных Т-хелперов зафиксировано только через 6-8 недель по сравнению с исследованием до радиотерапии [χ^2 Фридмана = 9,6; p = 0,008; попарное p = 0,006].

Достаточно интересна картина динамики активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺). При CPS<1 было отмечено статистически значимое повышение количества клеток данной субпопуляции как через 3-4 нед. после СТЛТ, так и через 6-8 нед. после лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 10,5; p = 0,005; попарное p = 0,006 и 0,038 соответственно]. При этом, статистически значимых изменений в клетках с фенотипом CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ при CPS≥1 не было зафиксировано (рис.8).

При определении Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) у включенных в исследование пациентов в группе CPS<1 наблюдалось увеличение общего количества клеток этой субпопуляции через 3-4 недели после радиотерапии [χ^2 Фридмана = 6,7; p = 0,035, попарное p = 0,029] по сравнению с исследованием, выполненным до проведения СТЛТ. В группе CPS≥1, статистически значимых изменений в содержании Т-хелперов обнаружено не было.

Схожая картина была обнаружена и при исследовании Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$). Так, в группе $CPS < 1$ зафиксировано статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$) через 3-4 нед. после облучения [χ^2 Фридмана = 7,8; $p = 0,02$; попарное $p = 0,016$]. При этом, весьма интересен тот факт, что при $CPS \geq 1$, статистически значимых изменений в содержании Т-лимфоцитов не наблюдалось.

Кроме того, были получены достаточно интересные данные при исследовании Т-регуляторных лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$). Так, в группе с позитивной экспрессией зафиксировано снижение показателей данной субпопуляции через 3-4 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до радиотерапии [χ^2 Фридмана = 6,7; $p = 0,0035$; попарное $p = 0,036$]. В группе с $CPS < 1$ не получено статистически значимых изменений в данной субпопуляции, однако, наблюдалась тенденция к снижению исследуемых показателей (рис. 8).

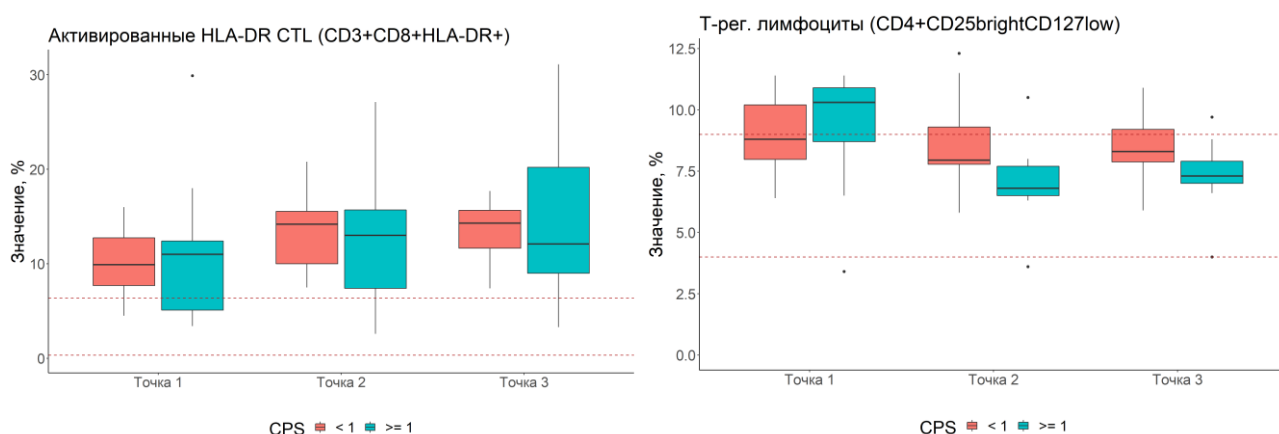


Рис. 8. Динамика (box-plot) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-регуляторных лимфоцитов, группировка по индексу CPS (медианы значений)

В результате нашего исследования было обнаружено, что в группе с негативной экспрессией PD-L1 ($CPS < 1$) наблюдается более активный иммунный ответ по сравнению с группой пациентов с позитивной экспрессией ($CPS \geq 1$). В первую очередь это происходит за счет увеличения активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$), активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$), Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$); Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$). Кроме того, весьма интересен факт снижения Т-регуляторных лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$), в группе с положительной экспрессией PD-L1 ($CPS \geq 1$).

Выводы

1. После проведения стереотаксической лучевой терапии (СТЛТ) наблюдается активация Т-клеточного звена иммунной системы ($p \leq 0,01$) за счет увеличения Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$); Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$); активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$) на фоне снижения количества регуляторных Т-лимфоцитов ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$) и антителопродуцирующих клеток ($CD3^+CD19^+$), наиболее выраженная - через 3-4 недели после лучевого воздействия.

2. При облучении метастатических очагов в суммарной очаговой дозе, эквивалентной 93,75 Гр – 105,75 Гр происходит более значимая активация Т-клеточного иммунного ответа ($p \leq 0,04$) по сравнению с EQD2=150 Гр.

3. Определена выраженная активация Т-клеточного звена иммунной системы в группе пациентов с облучением одного метастатического очага по сравнению с группой больных, где радиотерапии подверглись два и более очага; $p \leq 0,03$.

4. Более выраженное увеличение показателей Т-клеточного звена иммунной системы выявлено после СТЛТ метастатических очагов в печени по сравнению с облучением метастазов в легких; $p \leq 0,04$.

5. Установлено, что PD-L1 статус определяет динамику иммунологических показателей после СТЛТ: у пациентов при CPS<1 наблюдается рост эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$; $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$, $p < 0,05$) без статистически значимого снижения регуляторных Т-лимфоцитов ($p > 0,05$), тогда как у больных с позитивным статусом PD-L1 (CPS \geq 1) наблюдается значимое снижение регуляторных Т-лимфоцитов ($p \leq 0,04$) без изменения эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов.

Практические рекомендации

1. СТЛТ возможно применять в комбинации с иммунотерапевтическими препаратами в виду выраженных позитивных активирующих иммунологических изменений, возникающих после лучевого воздействия.

2. Комбинация СТЛТ с иммунотерапией представляется более оправданной через 3-4 нед. после лучевого воздействия у больных с метастатическими формами солидных опухолей, поскольку наиболее выраженные иммунологические изменения наблюдаются именно в эти сроки.

3. Стереотаксическая лучевая терапия может использоваться как в качестве самостоятельного фактора, индуцирующего иммунный ответ, так и в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа у пациентов с негативной экспрессией PD-L1.

Перспективы разработки данной темы

Видится целесообразным дальнейшее изучение иммунологических показателей на фоне стереотаксической лучевой терапии на большей выборке больных с метастатическими формами солидных опухолей.

Кроме того, необходимо продолжение исследований, направленных на поиск иммунологических маркеров с целью расширения показаний к комбинированной терапии (СТЛТ и анти-PD-(L)1-препаратов) у пациентов с отрицательной экспрессией PD-L1 или пациентов с положительным статусом PD-L1 в случае приобретенной резистентности к ингибиторам контрольных точек иммунного ответа (феномен «иммунного истощения»).

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Зозуля, А.Ю. Характер изменения иммунного статуса у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей, подвергшимся стереотаксической лучевой терапии: зависимость от дозы и количества облученных очагов / А.Ю. Зозуля, И.А. Балдуева, С.Н. Новиков, Д.В. Гирдюк., Н.В. Емельянова, Е.И. Тюреева, Е.А. Федосова, Ф.Е. Антипов, А.И. Арсеньев, И.А. Коробова., М.М. Гиршович, С.В. Канаев, А.М. Беляев // Вопросы онкологии. – 2021. – Т.67, №3. – С.391–396.
2. Зозуля, А.Ю. Изменение иммунного статуса у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей на фоне стереотаксической лучевой терапии / А.Ю. Зозуля, С.Н. Новиков, И.А. Балдуева, Д.В. Гирдюк., Н.В. Емельянова, Е.И. Тюреева, Е.А. Федосова, Ф.Е. Антипов, А.Е. Наволока, С.В. Канаев, А.М. Беляев // Вопросы онкологии. – 2020. – Т.66, №3. – С.277–282.
3. Зозуля, А.Ю. Иммунологические эффекты стереотаксической лучевой терапии при злокачественных новообразованиях различных локализаций: обзор литературы / А.Ю. Зозуля, И.А. Балдуева, С.Н. Новиков // Сибирский онкологический журнал. 2020. – Т.19. – №5. – С.108–113.
4. Арсеньев, А.И. Перспективы использования стереотаксической лучевой терапии при первичных и олигометастатических опухолевых поражениях лёгких / А.И. Арсеньев, С.Н. Новиков, С.В. Канаев, А.А. Барчук, Ф.Е. Антипов, А.Ю. Зозуля и др. // Вопросы онкологии. – 2021. – Т.67, №3. – С.391–396.
5. Балдуева, И.А. Стереотаксическая лучевая терапия в фокусе системных иммунологических эффектов / И.А. Балдуева, А.Ю. Зозуля, С.Н. Новиков // Злокачественные опухоли. 2019. – №9 (3s1). – С. 23-25.
6. Zozulya, A.Yu. Dynamics of indicators of the immune status in patients with metastatic solid tumors on the background of stereotactic ablative radiation therapy collection of abstracts / A.Yu. Zozulya, S.N. Novikov, I.A. Baldueva, D.V. Girdyuk, N.V. Emelyanova, E.I. Tyuryaeva, E.A. Fedosova, F.E. Antipov, A.I. Arseniev, S.V. Kanaev, A.M. Belyaev // Annals of Oncology: collection of abstracts. 2020 – Vol. 31 (suppl_7). – P. 1424.
7. Зозуля, А.Ю. Динамика показателей иммунного статуса у пациентов с метастатическим колоректальным раком на фоне стереотаксической лучевой терапии / А.Ю. Зозуля, И.А. Балдуева, С.Н. Новиков, Н.В. Емельянова, Т.Л. Нехаева, А.В. Новик, А.Б. Данилова, Н.П. Пипиа, Д.В. Гирдюк., Е.А. Федосова, Е.И. Тюреева, Ф.Е. Антипов // Белые ночи: материалы V Петербургского международного онкологического форума. Тезисы.– Санкт-Петербург: Изд-во АННОМО «Вопросы онкологии», 2019. – С.125.
8. Зозуля, А.Ю. Динамика показателей иммунного статуса у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей на фоне стереотаксической лучевой терапии / А.Ю. Зозуля, И.А. Балдуева, С.Н. Новиков // Сборник тезисов V конференции молодых учёных, посвященной памяти академика А.Ф. Цыба «Перспективные направления в онкологии, радиобиологии и радиологии». – Обнинск: Изд-во МРНЦ им. А.Ф. Цыба, 2019. – С.15–16.
9. Зозуля, А.Ю. Изучение динамики показателей иммунного статуса у пациентов с генерализованным колоректальным раком на фоне стереотаксической лучевой терапии метастазов в печени / А.Ю. Зозуля, С.Н. Новиков, И.А. Балдуева, Н.В. Емельянова, Д.В. Гирдюк., Е.И. Тюреева, Е.А. Федосова, Ф.Е. Антипов // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: материалы конгресса молодых ученых. Тезисы. – Томск 2020. – С.218-221.
10. Зозуля, А.Ю. Изучение динамики иммунного статуса у пациентов с различной экспрессией PD-L1 после стереотаксической лучевой терапии олигометастазов / А.Ю. Зозуля, И.А. Балдуева, А.С. Артемьева, С.Н. Новиков, А.Л. Муравцева, Д.В. Гирдюк., Н.В. Емельянова, Е.И. Тюреева, Е.А. Федосова, Ф.Е. Антипов, А.И. Арсеньев, М.М. Гиршович // Белые ночи: материалы VII Петербургского международного онкологического форума. Тезисы.– Санкт-Петербург: Изд-во АННОМО «Вопросы онкологии», 2021. – С.108.