

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ЗОЗУЛЯ АНТОН ЮРЬЕВИЧ

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

Специальность: 3.1.6 – онкология, лучевая терапия
(медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
Балдуева Ирина Александровна
доктор медицинских наук, доцент
Новиков Сергей Николаевич

Санкт-Петербург

2021 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1.	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Изучение влияния стереотаксической лучевой терапии на функциональное состояние иммунной системы у больных с метастатическими формами солидных опухолей.....	12
1.2 Особенности проведения СТЛТ опухолевых очагов в печени и легких в клинической практике.....	26
ГЛАВА 2	33
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Материалы.....	33
2.2 Методы	37
2.2.1 Стереотаксические и рентгенологические методики исследования	37
2.2.2 Иммунологические методики исследования.....	42
2.2.3 Морфологические методики исследования.....	45
2.2.4 Статистическая обработка результатов	46
ГЛАВА 3	47
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	47
3.1 Изучение иммунологических показателей пациентов с метастатическими опухолями после проведения стереотаксической лучевой терапии.....	47
3.2 Оценка взаимосвязи между характером изменений в иммунном статусе и режимом подведения дозы при стереотаксической лучевой терапии.....	54
3.3 Определение взаимосвязи между количеством облученных очагов и динамикой изменений в иммунном статусе после стереотаксической лучевой терапии	62
3.4 Сравнение степени выраженности иммунологических изменений, возникающих после проведения облучения метастазов в печени и легких	69
3.5 Изучение влияния статуса PD-L1 на динамику иммунологических изменений после проведения СТЛТ у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей.....	76

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
ВЫВОДЫ.....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ДАННОЙ ТЕМЫ.....	89
ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Лучевая терапия 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 [91].

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 [4,6]. 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, 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». «Эффект свидетеля» (коммунальный эффект, абскопальный эффект) — немишенный эффект радиации, заключающийся в передаче радиационных сигналов от облученных клеток необлученным [3].

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 [36, 42, 58]. Кроме того, следует отметить, что облучение оказывает

влияние на сосуды, строму опухоли, стволовые опухолевые клетки [4]. 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 [2].

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 [98]. 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» [107]. 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 [37], меланомы [68,99], колоректального рака [83], почечно-клеточного рака [103], рака молочной железы [26], рака шейки матки [86].

В настоящее время достаточно неплохо изучены основные иммунологические изменения, возникающие на фоне традиционной 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 метастатическим процессом, 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 22C3 (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 [31]. В качестве апостериорного теста для множественных попарных сравнений использовали критерий Немени [65].

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 [92], 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 научных специальностей

Научные положения настоящей диссертационной работы соответствует паспорту специальности «3.1.6 – онкология, лучевая терапия» 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения онкологических пациентов, который обеспечивает достоверное увеличение локального и регионального контроля над опухолью, тем самым способствуя росту показателей общей и безрецидивной выживаемости. Накопленный опыт показывает, что около 70 % онкологических больных получают радиотерапию в качестве компонента комплексного противоопухолевого лечения [91]. При этом комбинация эффективного локального и системного лечения является необходимым условием успешной терапии больных распространенным опухолевым процессом. В этой связи сочетание лучевой и лекарственной терапии представляется интересным и перспективным подходом.

Особого внимания заслуживают указания на то, что локально применяемая лучевая терапия может индуцировать системный противоопухолевый эффект, что подтверждается регрессом вторичных метастатических очагов, расположенных на расстоянии от облучаемого объема [107]. Системный эффект лучевой терапии, получивший название абскопального эффекта, впервые был описан Mole и соавт. в 1953 г. [63]. Однако, частота возникновения абскопальных эффектов после применения стандартного лучевого лечения очень низка [80].

Классическая радиационная биология сосредоточена на изучении радиоиндуцированных повреждений ДНК, приводящих к торможению клеточного цикла в сочетании с гибелью клеток облученной опухоли посредством апоптоза, некроза и аутофагии [6]. В литературе имеются указания на то, что иммунологические реакции также играют важную роль в реализации эффектов лучевой терапии [66]. К сожалению, вопрос о взаимосвязи между степенью выраженности и характером индуцированных облучением иммунных реакций и

особенностях проводимой лучевой терапии остается малоизученным. Несомненно, необходимо тщательное изучение вопроса о влиянии объема лучевой терапии, режима и технологии подведения дозы, величины суммарной поглощенной дозы на интенсивность противоопухолевого иммунного ответа. Использование режимов гипофракционирования с разовой очаговой дозой от 8 Гр и более ассоциируется с увеличением частоты возникновения абскопальных эффектов [66]. В частности, результаты метаанализа Marconi R, Strolin S. и соавт. указывают на достоверное увеличение частоты возникновения абскопальных эффектов при увеличении суммарной очаговой дозы, поглощенной опухолью [56]. В связи с этим, при обсуждении вопросов, связанных с радиоиндуцированным абскопальным эффектом, особое внимание уделяется стереотаксической лучевой терапии – методу дистанционной лучевой терапии, обеспечивающему возможность подведения высокой тумороцидной дозы к мишени с субмиллиметровой точностью за одну или несколько фракций. Важные достоинства СТЛТ заключаются в возможности достижения высоких показателей локального контроля, низкой токсичности, возможности лучевого лечения очагов, находящихся в непосредственной близости от критических органов, доставкой абляционной дозы за короткое время.

Существует мнение, что системное действие радиотерапии опосредовано иммунологическими феноменами. Фактически, одной из основных реакций иммунной системы на опухоль является цитотоксический ответ, называемый иммуногенной клеточной смертью. Этот процесс зависит как от внутренних характеристик опухоли, так и от иммунного статуса пациента. При облучении опухоли возникает клеточный стресс, что приводит к усиленному высвобождению различных опухолево-ассоциированных антигенов в результате некротической и апоптической гибели опухолевых клеток. Опухолевые клетки экспрессируют уникальные опухолевые антигены, которые включают вирусные белки, мутированные онкопротеины, такие как p53 и ras, уникальные гибридные белки, экспрессируемые из транслоцированных онкогенов, таких как BCR-ABL, и белки, которые экспрессируются во время эмбриогенеза, но не экспрессируются нормальными тканями [102]. Иммунная система обладает способностью

распознавать и уничтожать клетки с мутантными белками, которые являются предшественниками опухоли. Во время эволюции опухолей мутированные клетки теряют экспрессию белков, которые участвуют в механизме процессинга и презентации антигена, таких как молекулы TAP-2 и MHC класса I [13,82]. Это адаптивное уклонение от иммунологического надзора включает отбор менее иммуногенных клонов опухолевых клеток и часто опосредуется приобретением мутаций с потерей функции и эпигенетической регуляцией транскрипции генов, которые участвуют в иммунном распознавании и реализации эффекторных путей адаптивного противоопухолевого иммунитета. Вышеуказанные ОАА поглощаются антиген-презентирующими клетками и затем представляются CD8⁺ Т-клеткам, которые распознают и атакуют как облучаемую опухоль, так и метастатические очаги. Облучение по дозозависимой кривой увеличивает экспрессию на клеточной поверхности молекул главного комплекса гистосовместимости класса I и рецепторов гибели клеток, таких как Fas, тем самым увеличивая выработку пептидов, презентацию антигенов и цитотоксический эффект, опосредованный Т-лимфоцитами [20,79].

Помимо этого, лучевая терапия индуцирует иммуногенную клеточную гибель преимущественно за счет молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMPs). DAMPs представляют собой молекулы клеток-хозяев, которые активируются в ответ на клеточный стресс, особенно в клетках, подвергающихся иммуногенной смерти. Следует отметить, что экспрессия сигналов DAMPs в опухолевых клетках прямо пропорциональна увеличению суммарной очаговой дозы облучения [36].

Механизм иммуногенной клеточной смерти не может быть реализован без активации дендритных клеток. Для этого умирающие клетки опухоли должны предоставить ДК два сигнала:

- 1) специфический сигнал «eat me» (представлен транслокацией цитоплазматического кальретикулина на клеточную мембрану), который позволяет дендритным поглощать умирающие опухолевые клетки [67].

- 2) специфический сигнал «опасности», который активирует ДК, стимулирует процессинг антигена и представление его Т-клеткам.

Сигналы «опасности», одним из представителей которых является ядерный негистоновый белок группы 1 с высокой подвижностью (HMGB1), индуцируют иммунную систему реагировать на агенты, которые наносят вред организму, а не на те, которые просто чужеродны [59]. В отсутствие сигналов «опасности» дендритные клетки остаются толерантными, в то время как при наличии этих сигналов ДК созревают и активируются при индукции ко-стимулирующих молекул Т-лимфоцитов, таких как CD80 и CD86. Помимо HMGB1, эндогенные сигналы «опасности» предоставляются стрессовыми молекулами - белками теплового шока (HSP), которые высвобождаются из умирающих некротических опухолевых клеток и активно поглощаются ДК. HSP являются не только носителями опухолевых антигенов, но также могут вызывать созревание дендритных клеток, что приводит к более эффективной презентации антигена [55, 90, 101]. Также в облученных тканях выделяется и другие сигналы «опасности»: АТФ, окисленные липиды [12], мочевиная кислота [48] и др., которые могут вызывать иммунный ответ.

Радиоиндуцированный генотоксический стресс приводит к накоплению двухцепочечной ДНК, состоящей из митохондриальной и геномной ДНК в цитозоле опухолевых клеток [108]. Накопление этих молекул имитирует вирусную инфекцию в облученных клетках. Кроме того, радиотерапия может индуцировать экспрессию эпигенетически «молчащих» вирусных генов в опухоли и способствовать активации противоопухолевого иммунного ответа.

Многочисленные исследователи показали, что активность интерферонов I типа (в особенности, от Batf3-зависимых ДК) является одним из обязательных условий для эффективного контроля над опухолью. При этом, когда в дендритных клетках функция IFN типа I была заблокирована, опухолецидного эффекта не наблюдалось [19, 25, 28].

Еще одним проиммуногенным фактором в реализации противоопухолевого иммунного ответа является активация TLR-9. Данный феномен происходит за счет связывания неклоточной геномной и митохондриальной двухцепочечной ДНК с

антимикробным пептидом LL37 с последующим эндоцитозом в плазматических дендритных клетках [21, 113].

Кроме того, окисление двухцепочечной ДНК за счет иммунологических реакций приводит к мощной стимуляции воспалительных цитокинов и созданию внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET) [34].

Помимо этого, окисленная ДНК под действием трех экзонуклеаз-1 первичной репарации (TREX1) и цитозольной экзонуклеазы становится более устойчивой к разрушению, тем самым способствуя защите от аутоиммунитета [104].

При повреждении ДНК происходит привлечение ферментов репарации ДНК и семейства киназ, связанных с фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K). Активация PI3K-опосредованной киназы приводит к запуску Chk1 и Chk2 с последующей активацией NF- κ B, что приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу, активации гена стимулятора интерферона с высвобождением IFN α и IFN λ [18, 33, 62].

Радиоиндуцированное высвобождение цитокинов, например, интерферон-бета 1 и интерферон-гамма, также играет роль в активации дендритных клеток [35]. Активированные дендритные клетки мигрируют в лимфатические узлы, чтобы представить антиген Т-лимфоцитам, что, в свою очередь, приводит к опухолеспецифической активации и пролиферации Т-лимфоцитов. Зрелые и активированные дендритные клетки могут секретировать хемокины, которые мобилизируют эффекторные CD8⁺ Т-лимфоциты в опухоль [50].

Помимо вышеуказанных иммунологических явлений, радиотерапия вызывает повышенную экспрессию на клеточной поверхности молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. Эти молекулы содержат эндогенные пептиды, которые способствуют распознаванию опухолевых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. При облучении ложа опухоли повышается экспрессия провоспалительных хемокинов, таких как CXCL16 и эндотелиальных факторов адгезии VCAM и ICAM-1, которые направляют иммунные клетки в опухолевые очаги, что также играет важную роль в иммунном ответе [1, 92].

Однако, не смотря на солидный список проиммуногенных свойств лучевой терапии, в литературе представлены и иммуносупрессивные эффекты облучения. Обращает на себя внимание низкая частота абскопальных эффектов в рутинной клинической практике, что может быть связано с тем, что даже активированные CD8⁺ Т-клетки не способны преодолеть супрессирующий потенциал опухолевого микроокружения. Говоря об иммуносупрессии при ЛТ, следует начать с лимфопении, что является достаточно частым нежелательным явлением на фоне облучения. Так, по данным систематического обзора Venkatesulu и соавт., у больных, перенесших радиотерапию, наличие радиоиндуцированной лимфопении негативно влияло на выживаемость пациентов [105]. Весьма интересен тот факт, что по сравнению с классическим фракционированием, СТЛТ ассоциируется со значительно меньшей радиоиндуцированной лимфопенией у пациентов с местнораспространенным раком поджелудочной железы [106].

Выделяемые опухолью иммуносупрессирующие цитокины, такие как трансформирующий фактор роста β (TGF β), а также, поверхностные рецепторы, экспрессируемые на Т-клетках (CTLA4, PD-1), могут приводить к истощению Т-лимфоцитов. М2-макрофаги, клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) и незрелые дендритные клетки также приводят к супрессии Т-клеточного иммунного ответа. ЛТ также способствует накоплению в опухоли Т-регуляторных лимфоцитов-супрессоров.

Одним из основных сигнальных путей, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе является cGAS-STING. Существуют данные о том, что подавление cGAS-STING приводит к угнетению иммунного ответа и отсутствию тумороцидного действия на необлученные метастатические очаги [43, 53, 64].

Необходимо дополнительно отметить, что облучение может привести к увеличению инфильтрации опухоли лимфоцитами с помощью 2-х основных механизмов:

- увеличение проницаемости сосудистой сети опухоли для лимфоцитов [32] и повышение экспрессии молекул эндотелиальной адгезии [41], что, в свою очередь, приводит к усилению экстравазации иммунных клеток;

- высвобождение хемокинов для стимуляции миграции и инвазии иммунных клеток [57].

Резюмируя все вышесказанное, механизм радиоиндуцированного иммунного ответа можно представить на рис.1 [2].

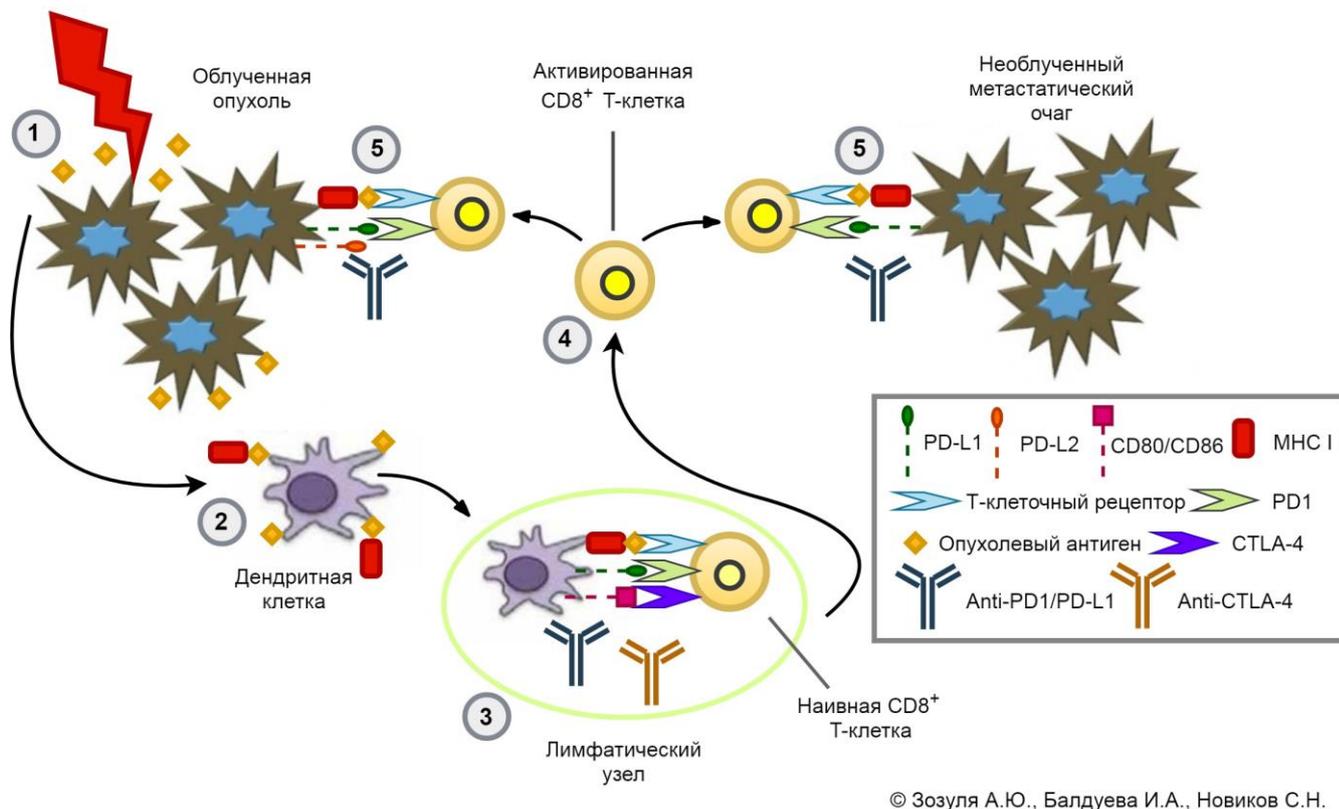


Рис. 1. Механизм радиоиндуцированного иммунного ответа.

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. Действительно, в последние годы иммуноонкологические препараты всё чаще используются в клинической практике. Более того, применение PD-1 / CTLA-4 ингибиторов на настоящий момент является общепризнанным стандартом в

лечении определенных нозологий (меланома кожи, немелкоклеточный рак легкого, почечноклеточный рак).

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 [108]. При этом, злокачественные новообразования со скудной инфильтрацией Т-лимфоцитами (так называемые «холодные» опухоли) представляют собой наиболее частый фенотип среди солидных опухолей, что является одной из причин невысокой эффективности ингибиторов контрольных точек в монорежиме.

В литературе имеются указания на то, что лучевая терапия может превратить «холодную» опухоль в «горячую» [107]. Учитывая вышесказанное, сочетание ЛТ и ИТ видится одним из наиболее прогрессивных подходов в лечении онкологических пациентов с точки зрения достижения абскопального эффекта и иммунологического контроля над опухолевым процессом.

Следует отметить, что не все радиотерапевтические подходы одинаковы по своим иммуномодулирующим эффектам. Режим облучения, доза и общее время лучевого лечения напрямую влияют на реализацию противоопухолевого иммунного ответа. Так, при использовании лучевой терапии в разовой очаговой дозе более 10 Гр за 1-5 фракций, возникает иммуногенная клеточная смерть опухолевых клеток, высвобождение большого количества опухолевоассоциированных антигенов, молекул DAMPs, молекул главного комплекса гистосовместимости I класса. При этом отмечается повышенная экспрессия ингибирующих молекул PD-L1, привлечение иммуносупрессивных клеток в опухолевое микроокружение [38, 79]. В литературе данный подход рассматривают как вакцинацию *in situ*.

Субабляционное фракционирование (РОД 5-10 Гр; 3-5 фракций в течение 5-10 дней) увеличивает экспрессию иммуномодулирующих молекул на поверхности

опухолевых клеток, тем самым увеличивая восприимчивость выживших опухолевых клеток к атаке цитотоксических Т-лимфоцитов. При этом выделяется меньшее количество ОАА.

Облучение, модулирующее опухолевое микроокружение, представляет собой классическое фракционирование (РОД ≤ 2 Гр, длительный курс лечения). Было показано, что низкие дозы радиотерапии нормализуют сосудистую сеть, что может обеспечить более эффективную перфузию [60, 74] и фактически перепрограммируют макрофаги в «провоспалительный» фенотип M1 [47]. При этом, стандартное фракционирование с длительностью лечения более 7–10 дней считается иммунодепрессивным для сопутствующего лечения иммунотерапевтическими средствами [97].

Таким образом, наиболее привлекательными вариантами для сочетанных комбинаций с иммуноонкологическими препаратами являются стереотаксическая лучевая хирургия и стереотаксическая лучевая терапия.

Одними из первых исследователей, представивших клиническую эффективность вышеуказанной комбинации, стали Postow и соавт. [73], которые в 2012 году представили оригинальный случай устойчивого полного ответа у пациента с метастатической меланомой, который был пролечен комбинацией стереотаксической лучевой терапии на паравертебральный очаг и иммунотерапией ипилимумабом.

В настоящее время комбинация ЛТ и ИТ предполагает использование трех возможных последовательностей. При первом варианте СТЛТ на опухолевый очаг проводится до начала иммунотерапии. Лучевой компонент в данной ситуации рассматривается как вакцинация *in vivo*. Так, предварительные результаты рандомизированного исследования II фазы, PEMBRO-RT (NCT02492568) показывают преимущество в выживаемости без прогрессирования у пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого при использовании комбинации СТЛТ (3 фракции по 8 Гр) с анти-PD-1 препаратами по сравнению с монотерапией чек-пойнт ингибиторами (в экспериментальную группу включены 36 больных). Кроме того, присоединение к иммунотерапевтическому лечению СТЛТ

позволило в 2 раза повысить частоту объективного ответа на лечение (с 18% до 36%) [94].

Во втором случае комбинированного лечения ИТ и ЛТ при метастатических солидных опухолях является применение лучевой терапии в качестве «терапии спасения», когда отмечается прогрессирование опухолевого процесса на фоне иммунотерапии. Однако, в ряде случаев, при использовании данного подхода, СТЛТ используется после проведения иммунотерапии для консолидации достигнутого эффекта. Так, ожидаются результаты исследования ABC-X (NCT03340129) [8], в котором изучается применение радиотерапии у пациентов с метастатической меланомой, когда было зафиксировано прогрессирование опухолевого процесса на фоне проведения иммунотерапии. По данным Chicas-Sett и соавт., у пациентов с метастатическим опухолевым процессом (меланома кожи, немелкоклеточный рак легкого, опухоли головы и шеи, рак мочевого пузыря, почечноклеточный рак) после прогрессирования на фоне лечения иммуноонкологическими препаратами, проведение СТЛТ обеспечивало высокие показатели местного контроля (локальный ответ был зарегистрирован у 29 пациентов - 73%) и индуцировало системные реакции (абскопальный эффект был отмечен у 13 больных – 33%) [23].

Третьей стратегией является одновременное проведение лучевой и иммунотерапии. Ретроспективный анализ совместного использования ЛТ и ИТ у 25 больных меланомой с метастатическим поражением головного мозга показал, что конкурентное использование этих методов приводит к достоверному улучшению локального контроля и увеличению показателя выживаемости без прогрессирования [88]. Преимущество сочетанного подхода также показали Theurich S., Rothschild S.I., Hoffmann M. и соавт. при одновременном проведении лучевой и иммунотерапии у 19 больных меланомой с экстракраниальными метастазами (статистически достоверное увеличение медианы общей выживаемости) [95].

В целом, при разработке клинических испытаний комбинации иммунотерапии с лучевой терапией необходимо учитывать два вопроса:

- может ли иммунотерапия усиливать действие лучевой терапии при ограничении суммарной очаговой дозы в связи с высокой радиационной нагрузкой на окружающие нормальные ткани;

- может ли лучевая терапия способствовать повышению эффективности противоопухолевого иммунитета?

На сегодняшний день, существуют данные о том, что лабораторные показатели свидетельствуют о развитии противоопухолевого иммунного ответа, но они не могут быть косвенным свидетельством повышения общей выживаемости онкологических пациентов. Поэтому при оценке клинического значения лучевой терапии целесообразна оценка показателей безрецидивной и общей выживаемости.

Многими авторами разрабатываются различные терапевтические подходы по сочетанию радиотерапии с системными агентами [22]. При этом, важно учитывать «иммунологические этапы», возникающие на фоне облучения. Эти этапы включают высвобождение и поглощение ассоциированных с опухолью антигенов антигенпрезентирующими клетками, особенно ДК, активацию и созревание ДК, перекрестную презентацию антигена Т-клеткам, а также активацию и доступность Т-клеток в опухоль. Комбинированные методы лечения, нацеленные на вышеуказанные этапы, повышают вероятность устойчивого ответа эффекторных клеток в опухоли и, в конечном счете, способствуют благоприятному клиническому результату после лучевой терапии. Основываясь на работы Teng M.W. и соавт. [93], а также Chen D.S. и соавт. [22] была предложена дорожная карта для разработки комбинированных исследований по комбинации СТЛТ и иммунотерапии на основе данных о радиоиндуцированном иммунитете и иммунном ландшафте опухолей. Классификация опухолевого микроокружения по иммуногенному потенциалу позволит персонализировать наиболее эффективные методы лечения [22, 93].

Классификация иммунного ландшафта опухолевого микроокружения, основанная на наличии или отсутствии инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и экспрессии PD-L1 [93] представлена ниже:

Тип I (TIL + / PD-L1 +): адаптивная иммунная резистентность;

Тип II (TIL- / PD-L1-): иммунологическое игнорирование;

Тип III (TIL- / PD-L1 +): собственная индукция;

Тип IV (TIL + / PD-L1-): иммунологическая толерантность.

Иммунологически опухоли с «горячим» воспалительным фенотипом способствуют инфильтрации лимфоцитов в опухоль и обычно имеют высокую мутационную нагрузку. Эти опухоли имеют все компоненты, необходимые для эффективного иммунного ответа; однако иммунная система подавляется из-за адаптивного иммунного сопротивления, вызванного экспрессией молекул контрольных точек иммунного ответа и/или инфильтрацией опухоли регуляторных Т-лимфоцитов и опухолевоассоциированных макрофагов. Количество кандидатов в качестве контрольных точек иммунного ответа, таких как PD-L1, PD-L2, TIM3 и LAG3, постоянно увеличивается. Опухоли, экспрессирующие высокие уровни PD-L1, могут хорошо реагировать на блокаду иммунных контрольных точек против PD1 / PD-L1, но могут терять эффективность из-за компенсаторных механизмов [9, 45, 61].

Затем следует рассмотреть возможность блокирования альтернативных мишеней при терапии ингибиторами контрольных точек для опухолей, отрицательных по PD-L1. Если абляционное фракционирование с помощью SABR или SRS возможно, то лучевой компонент можно комбинировать с иммуноонкологическим препаратом. Когда ограничения по дозе для органов, подверженных риску, исключают использование абляционного фракционирования, субабляционная иммуномодулирующая ЛТ может быть объединена с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа вместе с другими методами лечения, такими как активация антител к CD40. Поскольку радиотерапия индуцирует экспрессию рецепторов клеточной смерти на поверхности опухолевых клеток, адаптивный перенос клеток с цитокин-активированными Т-клетками может быть добавлен после лучевой терапии для повышения эффективности иммунотерапии этих опухолей. Альтернативно, активность опухолевоассоциированных макрофагов может быть модулирована блокирующими антителами к рецептору колониестимулирующего фактора-1 или ингибиторам индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназы [76, 89].

Опухоли с иммунологическим «холодным» фенотипом имеют низкую инфильтрацию опухоли лимфоцитами и могут быть далее классифицированы на опухоли с высокой мутационной нагрузкой и низкой мутационной нагрузкой. Считается, что опухоли с низкой инфильтрацией лимфоцитами и высокой мутационной нагрузкой участвуют в «иммунном уклонении», ограничивая реализацию адекватных иммунных ответов.

Лучшими методами лечения при данном иммунофенотипе опухоли будут антиангиогенные средства для увеличения перфузии опухоли и доступности Т-клеток в опухолевую ткань. Такую терапию можно комбинировать с абляционной лучевой терапией для индуцирования синергетического ответа опухоли на проводимое лечение.

Аналогичным образом, опухоли с низкой инфильтрацией лимфоцитами и низкой мутационной нагрузкой, с экспрессией PD-L1 или без нее, считаются невосприимчивыми. В лечении данного подтипа возможно использование лучевой терапии, модулирующей опухолевое микроокружение. ЛТ, модулирующая микросреду опухоли - это облучение с низкой дозой, обычно менее 2 Гр [60].

Воздействие низких доз облучения влияет на сосудистую сеть опухоли, что, в дальнейшем, может обеспечить более эффективную перфузию и увеличить доступность Т-лимфоцитов к опухоли [39, 74, 85]. Klug и его коллеги продемонстрировали, что облучение в низких дозах действительно может перепрограммировать макрофаги на более провоспалительный фенотип M1 [47, 78]. В конечном итоге, после данного перепрограммирования опухолевого микроокружения, происходит инфильтрация и активация функции Т-лимфоцитов-эффекторов.

Комбинации ЛТ, Flt3L и анти-CD40 или агониста TLR9 могут способствовать созреванию и активации антигенпредставляющих клеток в достаточной степени, чтобы вызвать презентацию антигена и активацию Т-лимфоцитов. Целью комбинированной терапии является усиление полезных аспектов каждого терапевтического подхода для синергетического эффекта. Таким образом, можно индивидуализировать комбинированную терапию для конкретного пациента,

используя данную классификацию, с тщательным учетом дозы и режима фракционирования при проведении лучевой терапии, типов иммунотерапевтических агентов и исходного иммунофенотипа опухоли.

На настоящий момент, высокодозные режимы облучения (СТРХ, СТЛТ) оказывают выраженное влияние на противоопухолевый иммунный ответ, усиливая CD8⁺ Т-клеточную инфильтрацию и вызывая освобождение большего количества опухолевоассоциированных антигенов [50, 87]. Стереотаксическая радиотерапия и стереотаксическая радиохирurgia индуцируют стойкий противоопухолевый иммунный ответ, обеспечивают высокие показатели локального контроля над опухолью. Поэтому существует острая необходимость в изучении и более глубоком понимании иммунологических изменений, происходящих на фоне высокодозных режимов лучевой терапии. Конкретные иммунологические изменения, которые происходят на фоне стереотаксической лучевой терапии, могут выступать в роли предиктивных факторов с целью получения пользы от предполагаемой комбинации с иммуноонкологическими препаратами.

1.2 ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ СТЛТ ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГОВ В ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

В настоящее время стереотаксическая лучевая терапия применяется для лечения новообразований печени как первичного, так и метастатического характера. Частота последних существенно выше, поэтому методика СТЛТ получила наибольшее распространение именно при вторичных поражениях печени. Величина суммарной очаговой дозы, выбор технологии подведения и режима фракционирования зависят от характера опухолевого процесса, числа очагов и их локализации; в меньшей степени на выбор тактики лечения влияют гистологический тип первичной опухоли, общесоматический статус и возраст пациента. Наиболее благоприятные условия для проведения СТЛТ создаются при наличии единичного периферического очага небольших размеров, расположенного на достаточном расстоянии (> 1 см) от критических органов (прежде всего, двенадцатиперстной и тонкой кишки, желудка, диафрагмы, ребер), а также, ворот печени [75].

Решение о выборе СТЛТ для лечения метастазов и первичных новообразований печени (гепатоцеллюлярного рака) может быть принято при соблюдении следующих условий [15, 24, 29]:

- 1) исходном адекватном функциональном состоянии печени (уровень А по шкале Child-Pugh,
- 2) возможности сохранения достаточного объема нормальной печеночной ткани (не менее 700 см^3);
- 3) размере очага не более 3-5 см;
- 4) общем числе метастазов не более 3;
- 5) локализации, позволяющей обеспечить допустимые дозные нагрузки на органы риска.
- 6) олигометастатическом характере поражения (в случае стабилизации внепеченочных очагов)

Критериями исключения являются: множественный характер поражения печени, неконтролируемое прогрессирование основного процесса, близость к критическим органам (менее 5-10 мм), выраженная печеночная недостаточность (класс С по шкале Child-Pugh) [15].

Следует остановиться на возможных ограничениях к применению СТЛТ печени более подробно. Классификация степени тяжести нарушения функции печени согласно критериям Child-Pugh [24], разработанным для больных циррозом печени, содержит три прогностических уровня (А,В,С) в зависимости от степени выраженности энцефалопатии, отсутствия или наличия асцита, нарушений свертываемости, уровня общего билирубина и альбумина в сыворотке крови. Проведение СТЛТ можно считать безопасным и оправданным только у пациентов, соответствующих прогностическому классу А (не более 5-6 баллов). Следует отметить, что на практике применение балльной системы актуально для первичных опухолей печени. Солитарные метастазы печени редко сопровождаются значительным снижением ее функции, и для осуществления СТЛТ это условие является легко выполнимым. Другим возможным ограничением для проведения стереотаксической лучевой терапии является локализация очага. Наименее благоприятна для проведения СТЛТ локализация очага в I сегменте печени, а также, в центральных отделах сегментов вблизи гепатобилиарной зоны. В отличие от других факторов риска, наиболее строгие требования предъявляются к соблюдению необходимой дистанции от воротной вены до опухолевого очага. Для того, чтобы избежать постлучевых окклюзионных осложнений эта дистанция должна быть не менее 15 мм [69]. Вместе с тем, существует мнение о том, что подобная мера предосторожности актуальна только при проведении СТЛТ первичных опухолей печени и ее соблюдение не обязательно для больных с метастатическим поражением. Серьезные сложности для проведения СТЛТ возникают при близости опухолевого очага к стенке желудка или тонкой кишки. В этом случае применение композитных биологических тканевых спейсеров может оказать существенную помощь в дистанцировании мишени от органов риска [109]. Однако эта инвазивная методика пока не нашла широкого клинического применения.

При облучении метастатических очагов в печени существуют особенности предлучевой подготовки. КТ-симуляция проводится в положении больного лежа на спине с заведенными за голову руками, с иммобилизацией при помощи специализированных приспособлений (укладочная дека, оснащенная оцифрованными пазами для подголовника и рукояток, а также фиксирующимися подплечниками) [75].

Использование штатных дек обеспечивает воспроизводимость и минимализацию погрешности при укладке (в зависимости от типа устройства варьирует от 2,2 до 3,9 мм).

Необходимое требование – унификация условий при проведении топографии (в том числе в подготовке больного) и лечения. Вопрос о целесообразности применения абдоминальной компрессии остается предметом дискуссий. Основным аргументом против использования компрессии является компенсаторное форсированное увеличение экскурсии легких, а также нежелательное смещение желудка, что может приводить к межфракционному изменению вектора смещения опухоли. В настоящее время абдоминальная компрессия используется редко.

Перед завершающей КТ-топоеметрией производится установка маркеров (не менее 3) вблизи опухолевого очага под УЗ-навигацией. В качестве меток используются рентгеноконтрастные нити (10x0,28 мм) или золотые цилиндрические маркеры-зерна (1,0x4,0 мм). Наличие меток позволяет визуализировать положение опухолевого очага и его смещения (tracking) при проведении сеансов СТЛТ, что особенно важно при метастазах небольших размеров. Работа с высококачественными КТ (МР) изображениями является залогом адекватного оконтуривания мишени и органов риска. Идеальным вариантом является оконтуривание очага по совмещенным КТ- и МР-сканам с внутривенным контрастированием (при условии соблюдения идентичного положения больного в ходе исследований и/или высококачественного совмещения изображений) [72, 75].

Оптимальный шаг КТ-сканов – 1,25 мм. При определении границ очага (GTV) анализируются все фазы КТ-исследования с в/в контрастированием. При

метастатических очагах, в большинстве случаев, наиболее важную информацию о границах очага несет портальная фаза КТ (первичные опухоли печени нередко лучше визуализируются в артериальную или отсроченную фазы).

Режим фракционирования и суммарные очаговые дозы (в том числе биологически эффективные) остаются предметом дискуссии [7, 46, 51]. В настоящее время нет единого протокола для проведения стереотаксического облучения как первичных, так и метастатических очагов в печени. Первые опыты СТЛТ, начиная с 1995 года [14], ограничивались однократным подведением разовой дозы 8-12 Гр. Постепенно величина разовой дозы увеличилась до 15 Гр, а затем до 20 Гр; число фракций значительно варьировало (от 1 до 5). Оценить преимущества того или иного варианта фракционирования СТЛТ до настоящего времени сложно [96], так как отдельные центры располагают ограниченным количеством собственных наблюдений, а результаты крупных многоцентровых рандомизированных исследований III фазы отсутствуют [49, 81, 84].

СТЛТ может применяться для лечения олигометастатического поражения легких при различных злокачественных новообразованиях (НМРЛ, саркома, почечно-клеточный рак, рак щитовидной железы или колоректальный рак и пр.). При этом показатели 2-3 летнего локального контроля превышают 85-90% [11,30].

Особенностью опухолевых очагов в лёгких возможность смещения мишени (опухолевого узла) в акте дыхания, которое зависит от расположения опухоли. В верхних и парамедиастинальных отделах смещение очага, как правило, не превышает 1-5 мм, а в нижних долях и особенно наддиафрагмальных областях оно может достигать 2-3см. Для уменьшения влияния смещения опухоли используют разные маневры контроля (синхронизация) дыхания – искусственная вентиляция, тренировка с аудиовизуальной обратной связью, задержка дыхания, абдоминальная компрессия и интрафракционная методика отслеживания опухоли в реальном времени с динамической коррекцией траектории пучка и / или стола (гейтинг), облучение в отдельные фазы дыхательного цикла [10].

В связи с чем при моделировании и планировании лечения существуют определенные особенности:

- Наиболее часто используемые подходы, позволяющие учитывать движение опухоли в акте дыхания это: большие PTV/ITV; стробирование (гейтинг); отслеживание смещения с маркерами или без них.
- Применяется техника задержки дыхания с использованием клапана с закрытым спирометром в заданном объеме.
- Система гейтинга и облучения в отдельные фазы дыхательного цикла.
- Система динамического отслеживания с использованием маркеров (например, CyberKnife), позволяющая адаптировать траекторию пучка к топографии мишени. Основными недостатками этой системы являются длительность облучения и риск возникновения пневмоторакса. В настоящее время осуществляются попытки внедрить эндоскопическую установку маркеров или внутрибронхиальных спиралей в условиях навигационной бронхоскопии.
- Разрабатываются методики слежения за мишенью без использования маркеров.
- При планировании проведения СТЛТ рекомендуемая величина среза МСКТ $\leq 1,5$ мм. Предпочтительно использовать 4D-КТ или усредненные на максимальных показаниях фаз вдоха и выдоха КТ (медленная КТ).
- Для точного облучения опухолевых очагов в легких на практике наиболее часто используется технология планирования СТЛТ с формированием внутреннего клинического объема с учетом смещения мишени во время дыхательного цикла. Важным условием для корректного формирования ITV является наличие данных МСКТ, синхронизированных с дыханием. Как показывают проведенные исследования – использование ITV увеличивает на 10-30% объем мишени, но при этом дополнительная нагрузка на ипсилатеральное легкое (V5, V10 и V20) увеличивается в среднем всего на 1-1,5% [10,111].

- iGTV формируется как проекция максимального смещения мишени (Maximum Intensity Projection) в дыхательном цикле на основе 4D-СТ. Следует учитывать, что при прилегании опухоли к диафрагме или грудной стенке плотность окружающих тканей может быть одинаковой.
- GTV / iGTV определяется как опухоль, видимая на МСКТ в окне легочного режима: уровень -600 Hounsfield units (HU), при ширине окна ± 1600 HU. Оптимальным для определения медиастинальных мишеней является средостенное окно: уровень 20 HU; ширина окна ± 400 HU.
- CTV / ITV определяется как GTV / iGTV + 0–10 мм.
- PTV = CTV / ITV + 3–10 мм (в зависимости от используемых технологий подведения дозы. Согласно текущим рекомендациям RTOG [10, 44, 77]:
 - При невозможности планирования с 4D-СТ: PTV = GTV + 5 мм по оси, 10 мм в краниокаудальном и 5 мм в остальных направлениях.
 - При использовании 4D-СТ: PTV = ITV + 3-5 мм по всем осям.
 - V_{Rx} доза $\geq 95\%$ PTV; $V_{90} \geq 99\%$ PTV.
 - Превышение дозы ($\geq 105\%$ Rx дозы) должно попадать в PTV.
 - Индекс соответствия (Conformality Index goal) ≤ 1.2 .
- Дозы на органы риска, на промежуточные области за пределами CTV / ITV, как правило, уменьшаются при увеличении лучей и углов, а также при минимизации полей на мишени.
- Возможно проведение облучения без использования выравнивающих фильтров, что позволяет повышать мощность дозы до 2000-2400 мониторных единиц / мин, и сокращать время сеанса лучевой терапии.
- Дозиметрический контроль планов облучения является обязательным.

В отношении рекомендуемых доз и режимов фракционирования, используемых при СТЛТ метастатических очагов в легких, следует учитывать ограничения по токсичности облучения для соседних нормальных тканей при $BED_{10} > 100$ [77, 112, 115].

Целесообразность изменения дозы в зависимости от гистологического типа опухолевых очагов, объема, локализации и первичного, либо метастатического их характера находится в стадии изучения.

В настоящее время, как правило, используется от 1 до 5 фракций. При проведении СТЛТ с периферической локализацией опухолевого очага в легких, не прилежащего к средостению, используют следующие режимы подведения доз: 25–34 Гр × 1 фракция; 18 Гр × 3 фракции; 20 Гр × 3 фракции; 13,5 Гр × 4 фракции; 12 Гр × 4 фракции; 10 Гр × 5-6 фракций [30, 97].

Использование СТЛТ у больных олигометастатическим НМРЛ, вероятно, нужно рассматривать как терапевтический стандарт, так как результаты проспективных рандомизированных исследований убедительно свидетельствуют о достоверном увеличении выживаемости при применении СТЛТ у этих пациентов.

Таким образом, становится очевидным необходимость изучения иммунологических эффектов, возникающих на фоне стереотаксической лучевой терапии, у пациентов с метастатическими формами солидных опухолей с целью поиска новых терапевтических стратегий, что, в конечном счете, будет приводить к увеличению показателей локального контроля и выживаемости пациентов.

Глава 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

В исследование было включено 46 пациентов с метастатическими формами солидных опухолей, которые проходили лечение в отделении 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.). Добровольное информированное согласие на проведение стереотаксической лучевой терапии, иммунологическое и морфологическое исследования было получено в письменном виде от всех пациентов или их законных представителей.

Характеристика пациентов, включенных в исследование

В настоящее исследование было включено 54 пациента с метастатическими формами солидных опухолей (всеми было подписано добровольное информированное согласие), из которых 46 больным был проведен полный курс стереотаксической лучевой терапии, а также у них был выполнен забор крови для иммунологических исследований в установленные сроки.

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 ≤ 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.

В исследование были включено 46 пациентов (30 женщин и 16 мужчин) с метастатическими формами солидных опухолей (средний возраст 55,9 лет [95% ДИ 52,4 - 59,4]), которые проходили лечение в отделении радиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Подробная характеристика пациентов, включенных в исследование, приведена в табл. 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).

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.

Распределение пациентов по дозовым группам при облучении метастатических очагов в легких и печени производилось с учетом эквивалентной дозы 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. Пациенты были распределены по группам с учетом индекса **Combined Positive Score (CPS)** (см. Методы, пункт 2.2.3).

Перед началом курса СТЛТ выполнялись общий клинический и биохимический анализы крови; коагулограмма; общий анализ мочи; исследование иммунного статуса с помощью метода проточной цитофлуориметрии (исследование иммунологических показателей у пациентов выполнялось впервые). Через 3-4 недели и через 6-8 недель после окончания лучевой терапии общий клинический анализ крови и исследование иммунологических показателей выполнялись повторно.

После завершения стереотаксической лучевой терапии с результатами запланированного контрольного обследования пациенты были направлены к химиотерапевту для решения вопроса о необходимости системной терапии.

2.2 Методы

2.2.1 Стереотаксические и рентгенологические методики исследования

СТЛТ на очаги в печени

Процедура предлучевой подготовки для стереотаксического облучения метастазов в печени проводилась по следующему алгоритму: на первом этапе на мультиспиральном томографе осуществлялась предварительная («пристрелочная») компьютерная топометрия в положении больного на фиксирующей деке, с заведенными за голову руками, на свободном дыхании. Исследование проводилось натощак, с предварительным (за 3-5 мин.) приемом 200 мл воды для более четкой визуализации просвета желудка и двенадцатиперстной кишки. После нативного сканирования выполнялась КТ на свободном дыхании в артериальную и портальную фазы контрастирования (на 20-30 сек. и 60-80 сек. после в/в введения контрастного препарата соответственно). Исследование позволяло оценить локализацию и размеры очага до внедрения рентгеноконтрастных меток, в лечебном положении, а вынесение на кожу проекции центра мишени упрощало процедуру установки маркеров под УЗ-навигацией.

Следующий этап топометрии проводился по прошествии 3 дней после маркировки очага рентгеноконтрастными золотыми метками (N=2-3), что необходимо для уменьшения зоны послеоперационного отека и более точного оконтуривания метастатического очага. После нативной КТ (с водным пероральным контрастированием полости желудка), корректировалось положение накожных меток, указывающих проекцию центра мишени. После обучения пациента правильному дыханию (без глубоких вдохов и выдохов) с равномерной амплитудой дыхательных экскурсий выполнялось сканирование с синхронизацией дыхания (4D). Затем - КТ на свободном дыхании в артериальную и портальную фазы после внутривенного контрастирования.

Наиболее важным и ответственным этапом топометрической подготовки являлось тщательное поэтапное оконтуривание очага. Для грамотного определения

границ мишени использовались КТ-сканы с двойным (пероральным и внутривенным) контрастированием, при этом анализировалась и сопоставлялась визуальная информация нативного изображения, контрастной и постконтрастной фаз.

Для учета смещений опухоли во время сеансов облучения выполнялась синхронизация с дыханием. Создание «внутреннего» объема мишени (ITV) осуществлялась с помощью 4D сканирования (т.е. КТ с записью дыхательных экскурсий), исходя из выбранной методики СТЛТ облучения на свободном дыхании, при дыхании с компрессией живота, на задержке дыхания или в отдельные его фазы. Выбор метода зависил от степени подвижности мишени при дыхании. Если амплитуда смещения мишени была относительно невелика (менее 5 мм), записывали траекторию очага в режиме свободного дыхания.

Подход к последующему формированию планируемого объема мишени (PTV) с необходимыми и достаточными отступами от границ ITV, определялись подвижностью очага и технологией СТЛТ. При установке рентгеноконтрастных маркеров, упрощающих визуализацию очага, проведении лечения в режиме синхронизации дыхания, обычно ограничивали отступы 3-4 мм. Если подвижность мишени была более 5 мм - лечение проводилось на задержке дыхания или на свободном дыхании с облучением только в фазу выдоха или вдоха. Для расчета нагрузки на органы риска производилось оконтуривание пищевода, желудка, двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок, спинного мозга, почек, легких, сердца, ребер и центральной гепатобилиарной зоны в радиусе 15 мм от воротной вены (от селезеночного конfluence до бифуркации на правую и левую желудочные вены).

У исследуемых пациентов с метастатическим поражением печени для обеспечения локального контроля при метастазах меланомы и почечноклеточного рака, обладающих выраженной радиорезистентностью, суммарная очаговая доза на опухолевый очаг обычно составляла 60 Гр за три фракции. При метастазах колоректального рака разовые дозы варьировали от 15 Гр до 20 Гр, суммарные очаговые дозы – от 45 Гр до 60 Гр за 3 фракции. Для сравнения результатов

различных протоколов лечения в ретроспективных анализах использовалась линейно-квадратичная модель расчета биологически эффективной дозы (БЭД): $БЭД = D \times (1 + d / \alpha / \beta)$, где D- суммарная доза, d – доза за фракцию, а $\alpha / \beta = 10$.

Доза и фракционирование определялись ограничениями (constraints) по токсичности облучения для соседних нормальных тканей при $BED_{10} > 100$ (табл. 2).

Таблица 2

**Ограничения доз на критические органы при планировании SBRT
на опухолевый узел в печени**

Орган	Число фракций	Доза (Гр/фр)
Ребро	3	28-30 Гр
12-перстная кишка	3	10 Гр; D 10 см ³ < 15 Гр
Желудок	3	22 Гр; точно ≤ 25 Гр
Пищевод	3	17-22 Гр
Печень	3	V ₂₁ sum < 30%; D 700 см ³ < 17-19 Гр
Почки	3	V ₁₂ sum < 25%; тотально < 15 Гр
Спиной мозг	3	12-13 Гр; точно ≤ 18 Гр
Толстая кишка	3	22-23 Гр; точно ≤ 24 Гр
Кожа	3	30 Гр; D _{0,03} - 10 см ³

Дозиметрические расчеты стереотаксического облучения новообразований печени осуществлялись, как правило, методом обратного планирования, т.е. пространственно-временной модуляцией интенсивности пучка в соответствии с формой и структурой мишени. Для лечения на линейных ускорителях с многолепестковым коллиматором применялся ротационный вариант с непрерывной модуляцией интенсивности излучения (VMAT) или многопольное копланарное изоцентрическое статическое облучение. Стандартным являлся охват 98% изодозой 98% объема CTV (ITV), при включении 95% объема PTV в 95% изодозное распределение. При необходимости следования общим канонам дозиметрического планирования, таких, как создание равномерного и однородного

покрытия мишени PTV, ограничение «горячих» зон (V105- менее 110%), на практике основным приоритетом при создании дозиметрического плана являлось соблюдение жестких ограничений дозных нагрузок для органов риска, компромисс в отношении гомогенности распределения дозы в очаге. Величины допустимых доз для критических органов зависели от выбранной разовой и суммарной дозы облучения при СТЛТ, а также функционального состояния печени [54, 70, 72].

СТЛТ на очаги в легких

При планировании проведения СТЛТ опухолевых очагов в легких величина среза МСКТ составляла 1-1,25 мм. Для точного облучения опухолевых очагов в легких использовалась технология планирования СТЛТ с формированием внутреннего клинического объема с учетом смещения мишени во время дыхательного цикла.

iGTV формировался как проекция максимального смещения мишени в дыхательном цикле на основе 4D-СТ. GTV / iGTV определялось как опухоль, видимая на МСКТ в окне легочного режима: уровень -600 Hounsfield units (HU), при ширине окна ± 1600 HU. CTV / ITV определялось как GTV / iGTV + 0–10 мм. У исследуемых пациентов объёмы iGTV и ITV не отличались, отступ составил 0 мм. PTV определялся следующим образом - CTV / ITV + 3–10 мм.

Доза и фракционирование определялись ограничениями (constraints) по токсичности облучения для соседних нормальных тканей при BED10 > 100 (табл. №3).

Таблица 3

Ограничения доз на критические органы при планировании SBRT на опухолевый узел в легком [5, 44, 71]

Структура	Число фракций	Ограничения доз
Лёгкое	1	V7 < 1500 см ³ , V20 < 30%; ≤13 Гр.
	3	V11.6 < 1500 см ³ , V20 < 10%; ≤18 Гр
	5	V12.5 < 1500 см ³ , ≤25 Гр
Центральные бронхи и трахея	1	V10.5 < 4 см ³ , Dmax 20.2 Гр
	3	V15 < 4 см ³ , Dmax 30 Гр, 1 см ³ < 30 Гр

	5	$V_{16.5} < 4 \text{ см}^3$, $D_{\max} 40 \text{ Гр}$, $1 \text{ см}^3 < 32 \text{ Гр}$
Грудная стенка	1	$V_{22} < 1 \text{ см}^3$, $D_{\max} 30 \text{ Гр}$
	3	$V_{28.8} < \text{см}^3$, $D_{\max} 36.9 \text{ Гр}$, $V_{30} < 30 \text{ см}^3$
	5	$V_{35} < 1 \text{ см}^3$, $D_{\max} 43 \text{ Гр}$, $V_{30} < 30 \text{ см}^3$
Сердце	1	$V_{16} < 15 \text{ см}^3$, $D_{\max} 18-22 \text{ Гр}$
	3	$V_{24} < 15 \text{ см}^3$, $D_{\max} 24-30 \text{ Гр}$, $1 \text{ см}^3 < 24 \text{ Гр}$
	5	$V_{32} < 15 \text{ см}^3$, $D_{\max} 27-38 \text{ Гр}$, $1 \text{ см}^3 < 27 \text{ Гр}$
Пищевод	1	$V_{11.9} < 5 \text{ см}^3$, $D_{\max} 14-15.4 \text{ Гр}$
	3	$V_{17.7} < 5 \text{ см}^3$, $D_{\max} 24-26 \text{ Гр}$
	5	$V_{19.5} < 5 \text{ см}^3$, $D_{\max} 27-35 \text{ Гр}$
Плечевое сплетение	1	$V_{14} < 3 \text{ см}^3$, $D_{\max} 16-17.5 \text{ Гр}$
	3	$V_{20.4} < 3 \text{ см}^3$, $D_{\max} 24 \text{ Гр}$, $1 \text{ см}^3 \leq 24 \text{ Гр}$
	5	$V_{27} < 3 \text{ см}^3$, $D_{\max} 30-32 \text{ Гр}$, $1 \text{ см}^3 \leq 27 \text{ Гр}$
Спиной мозг	1	$V_{10} < 0.35 \text{ см}^3$, $D_{\max} 12-14 \text{ Гр}$, $\leq 13 \text{ Гр}$
	3	$V_{18} < 0.35 \text{ см}^3$, $D_{\max} 18-21.9 \text{ Гр}$, $\leq 18 \text{ Гр}$
	5	$V_{23} < 0.35 \text{ см}^3$, $D_{\max} 25-30 \text{ Гр}$, $\leq 25 \text{ Гр}$
Кожа	1	$V_{23} < 10 \text{ см}^3$, $D_{\max} 26 \text{ Гр}$
	3	$V_{30} < 10 \text{ см}^3$, $D_{\max} 33 \text{ Гр}$, $\leq 24 \text{ Гр}$
	5	$V_{36.5} < 10 \text{ см}^3$, $D_{\max} 39.5 \text{ Гр}$
Перикард	5	$D_{\max} < 22 \text{ Гр}$, $V_{32} < 15 \text{ см}^3$
Аорта	3	$D_{\max} < 45 \text{ Гр}$
	5	$D_{\max} < 52.5 \text{ Гр}$

При расположении опухолевого очага в легких, который не прилежал к средостению, использовался режим 20 Гр x 3 фракции. При проведении СТЛТ с периферической парамедиастинальной и центральной локализацией опухолевого очага в легких использовался режим 13,5 Гр x 4 фракции (BED_{10} ограничена возможной токсичностью для центральных бронхов и трахеи, сердца, пищевода и спинного мозга). В случае повторного проведения лучевой терапии проводилось

совмещенное планирование СТЛТ с соответствующей BED-конверсией при суммировании дозы.

Подведение дозы СТЛТ осуществлялось в соответствии с текущими протоколами ежедневно или через день. Верификация положения мишени может осуществлялось после проведения КТ в конусном пучке на столе ускорителя. При смещении мишени во время дыхательного цикла на 10 мм и более предпочтение отдавалось облучению, синхронизированному с дыханием.

При СТЛТ во всех фазах дыхательного цикла проводилась синхронизация с дыханием для предотвращения облучения при глубоких вдохе и выдохе.

2.2.2 Иммунологические методики исследования

Проведен графический анализ показателей иммунных статусов у 46 больных метастатическими формами солидных опухолей, получавших курс стереотаксической лучевой терапии в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Выполнен сравнительный анализ иммунологических показателей пациентов перед началом лучевого лечения, а также через 3-4 недели и через 6-8 недель после завершения СТЛТ. Фенотипы определяемых субпопуляций иммунологических показателей представлены в табл. 4. Исследование проводилось в научном отделе онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Для иммунологического анализа (метод проточной цитофлуориметрии) использовали кровь пациентов с метастатическими формами солидных опухолей.

Таблица 4

Исследуемые субпопуляции и фенотипы иммунокомпетентных клеток

№	Показатель	Фенотип
1.	В-лимфоциты	CD3 ⁻ CD19 ⁺
2.	Т-хелперы	CD3 ⁺ CD4 ⁺
3.	Т-лимфоциты	CD3 ⁺ CD19 ⁻
4.	Активированные CD25 ⁺ Т-хелперы	CD4 ⁺ CD25 ⁺

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

Методика анализа субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных методом проточной цитометрии представлена ниже:

1. проводят забор периферической венозной крови пациента в вакутейнер - BD Vacutainer, содержащий ЭДТА, объемом 4 мл.
2. цельную кровь разделяют на 2 пробирки для цитофлюориметрического анализа (12x75 мм) равным объемом по 100 мкл. В каждую пробирку с исследуемым образцом помещают раствор моноклональных антител, меченных соответствующим флюорохромом:
 - в пробирку №1 добавляют 20 мкл антител для многоцветной панели (BD FACSCanto2 HIV Reagents Kits, 6-color TBNK Reagent, кат. № 337166, BD Bioscience, США) и 5 мкл мышинных античеловеческих моноклональных антител HLA-DR, меченых V450 (кат.№ 655874, BD Bioscience, США);
 - в пробирку №2 – 20 мкл антител CD25, меченых FITC (кат.№ , 555431, BD Bioscience, США), 20 мкл моноклональных антител CD4, меченых флюорохромом PerCP-Cy™5.5 (кат.332772, BD Bioscience, США) и 5 мкл антител CD 127, меченых Pe-Cy7 (кат.№ 560822, BD Bioscience, США);
3. пробу перемешивают на автоматическом миксере Digital Vortex Mixer (Fisher Scientific, США) в течении 1-3 секунд на скорости 3000 оборотов в минуту;

4. инкубируют при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 20 минут;
5. для приготовления рабочего разведения (1X) лизирующего раствора добавляют 9 объемов дистиллированной воды к одному объему маточного раствора FACS Lysing solution (10X), (кат № 349202, BD Bioscience, США);
6. для лизирования эритроцитов в пробу вносят по 1 мл рабочего раствора FACS Lysing Solution в каждую пробирку, перемешивают на автоматическом миксере Digital Vortex Mixer (Fisher Scientific, США), 1-3 секунды, 3000 об/мин и инкубируют в защищенном от света месте 15 минут;
7. центрифугируют при скорости 1500 об/мин, 5 минут Labofuge 400R (Thermo Electron LED GmbH, Германия);
8. далее удаляют надосадочную жидкость и вносят 1 мл раствора для разбавления клеточной суспензии CellWASH (BD, США), который перемешивают на автоматическом миксере 1-3 секунды, 3000 об/мин;
9. повторно центрифугируют 1500 об/мин, 5 минут, удаляют надосадочную жидкость и вносят 0,5 мл раствора для разбавления клеточной суспензии CellWASH (BD, США), который перемешивают на автоматическом миксере 1-3 секунды, 3000 об/мин;
10. анализируют методом проточной цитометрии FACS Canto™ II, (BD Bioscience, США);
11. для обработки данных используют программное обеспечение BD FACSDiva (версия 8.0.1).

2.2.3 Морфологические методики исследования

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 следующего 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 $CPS \geq 1$ — позитивной).

2.2.4 Статистическая обработка результатов

Учет данных по рассматриваемым пациентам, получившим лечение в условиях НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, производился с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010. 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 [31]. В качестве апостериорного теста для множественных попарных сравнений использовали критерий Немени [65]. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 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. 5).

Таблица 5

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

Установлено статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) через 3-4 нед. после завершения радиотерапии по сравнению с числом Т-лимфоцитов до начала СТЛТ (рис. 2) [χ^2 Фридмана = 13,781; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$].

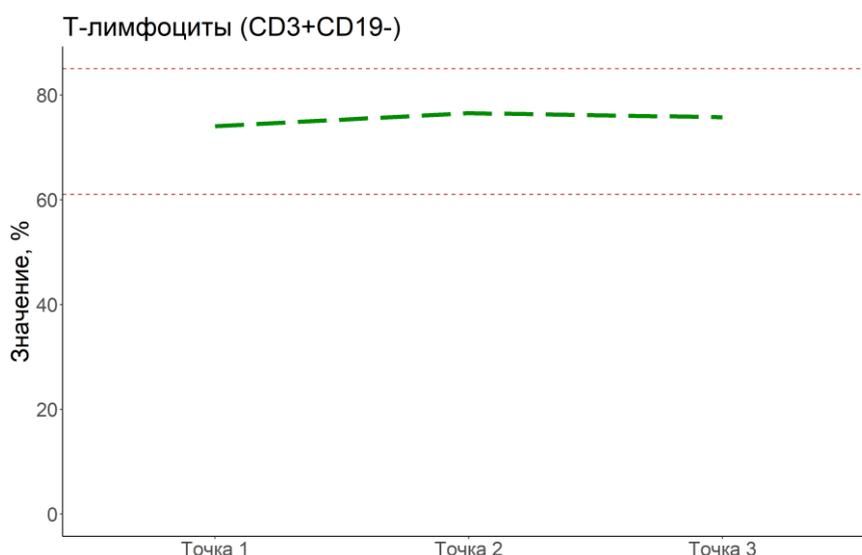


Рис.2. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-лимфоцитов (медианы значений)

Кроме того, отмечалось статистически значимое повышение числа 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 (рис. 3).

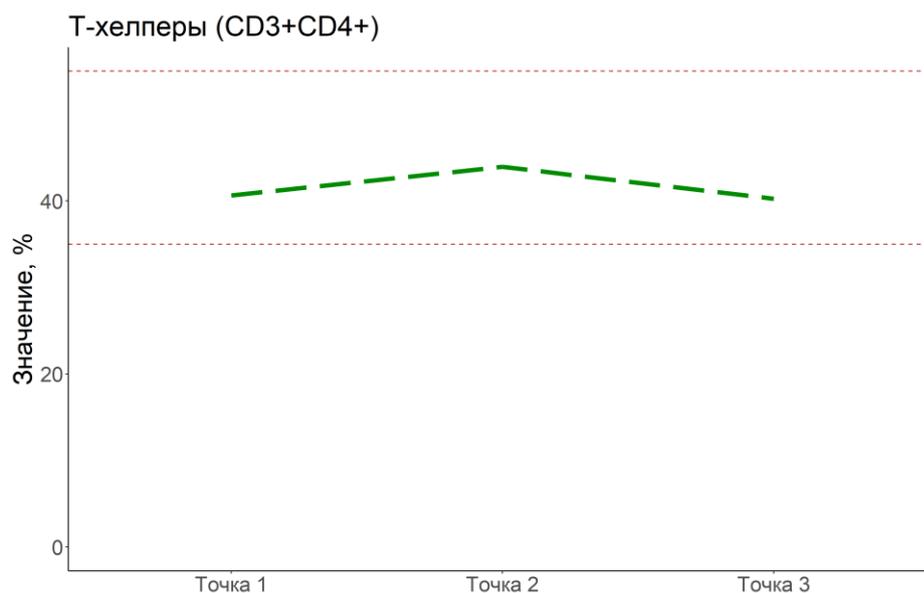


Рис.3. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-хелперов (медианы значений)

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. 4) [χ^2 Фридмана = 38,8; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,001$ соответственно].

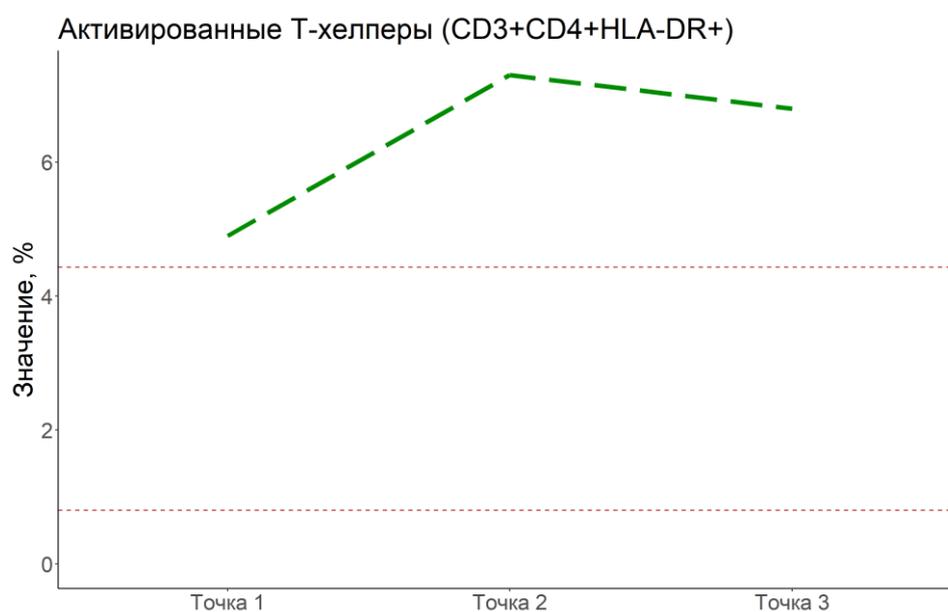


Рис.4. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных Т-хелперов (медианы значений)

Наблюдалось 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 количества цитотоксических Т-лимфоцитов через 6-8 нед. после облучения (попарное $p = 0,004$) [χ^2 Фридмана = 15,4; $p = 0,001$] (рис. 5).

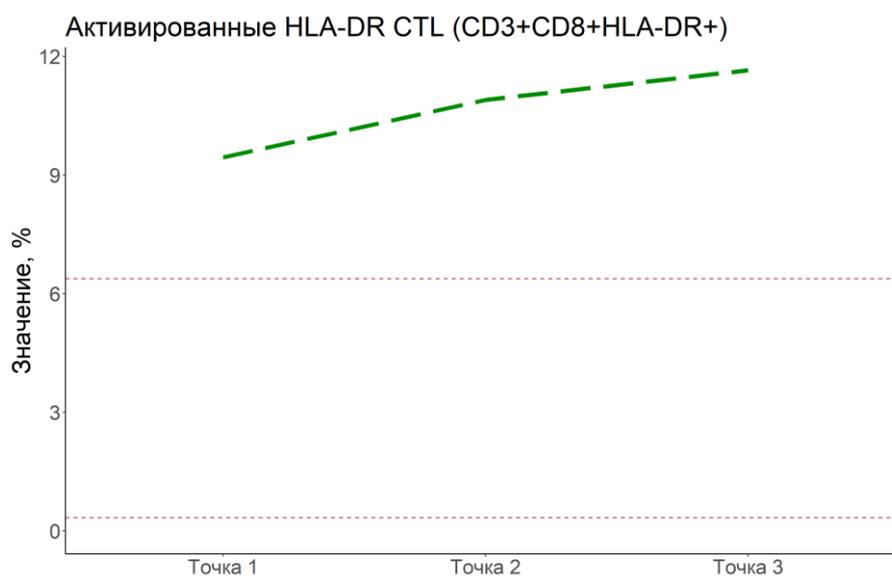


Рис.5. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (медианы значений)

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, полученными до проведения радиотерапии (рис.6) [χ^2 Фридмана = 35,4; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и 0,002 соответственно]. При этом, число В-лимфоцитов статистически значимо повышалось через 6-8 нед. после облучения по сравнению с исследованием через 3-4 нед. [попарное $p = 0,001$].

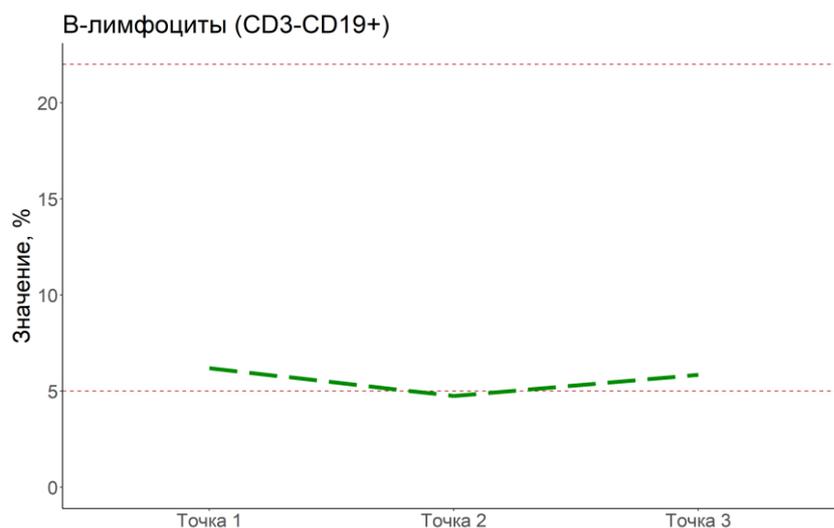


Рис.6. Динамика (визуальный ряд) содержания В-лимфоцитов (медианы значений)

Отмечалось статистически значимое повышение иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$) через 3-4 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до начала облучения (рис.7) [χ^2 Фридмана = 7,1; $p = 0,03$, попарное $p = 0,01$].

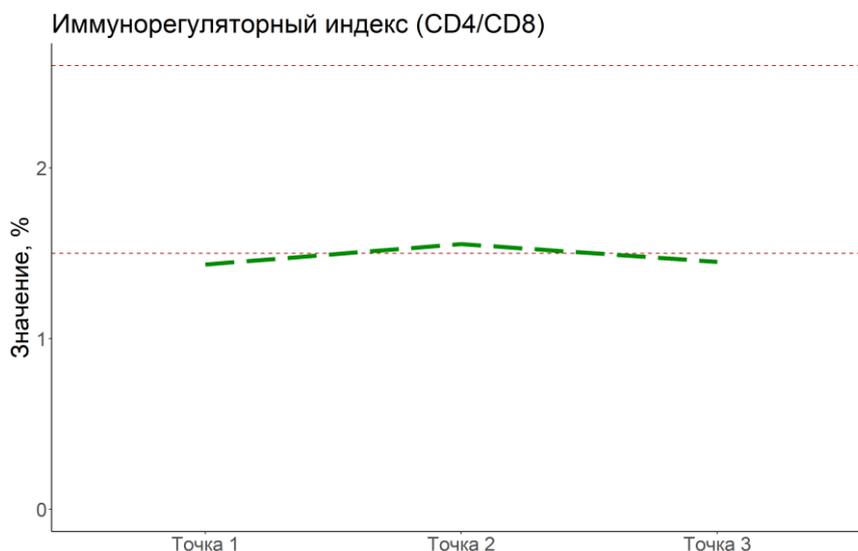


Рис.7. Динамика (визуальный ряд) иммунорегуляторного индекса (медианы значений)

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

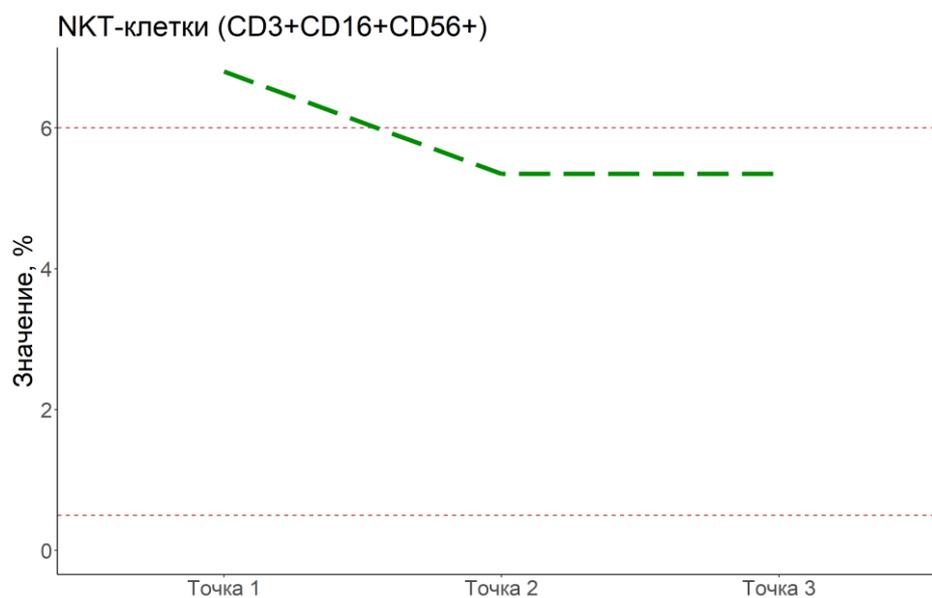


Рис.8. Динамика (визуальный ряд) содержания НКТ-клеток (медианы значений)

Кроме того, было отмечено 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 количеством Т-регуляторных клеток, определяемых до начала радиотерапии (рис. 9).

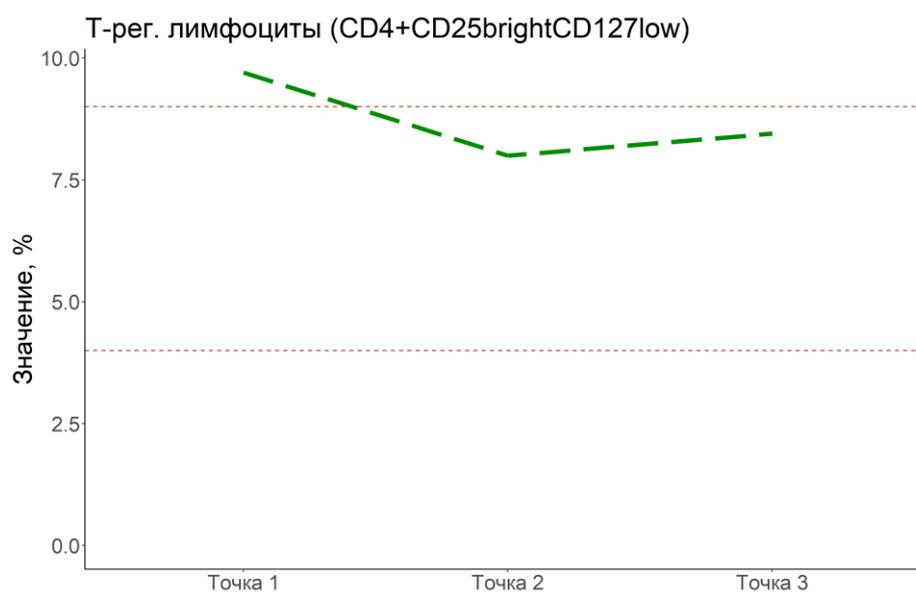


Рис.9. Динамика (визуальный ряд) регуляторных Т-лимфоцитов (медианы значений)

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

Полученные результаты констатируют активацию Т-клеточного звена иммунитета, реализующуюся достоверным 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⁺) и Т-регуляторных лимфоцитов (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}). Интересно, что при оценке динамики иммунологических показателей после завершения СТЛТ наиболее выраженные изменения в иммунном статусе были зафиксированы через 3-4 нед. после проведения СТЛТ.

Следует особо отметить то, что полученные результаты указывают на достоверное увеличение показателей Т-клеточного звена иммунитета после СТЛТ метастатических изменений в печени или легких, проявляющихся в увеличении количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺). В литературе, подобное состояние описывается как Т-клеточный «воспалительный фенотип» или «горячая» опухоль [100] и рассматривается в качестве благоприятного прогностического фактора, свидетельствующего о высокой вероятности положительного ответа на лечение иммуноонкологическими препаратами (ингибиторы PD-L1 и/или CTLA-4). Принимая во внимание то, что наиболее высокие показатели Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа были зарегистрированы через 3-4 нед. после завершения стереотаксической лучевой терапии, можно предположить, что этот период является оптимальным для сочетания лучевой терапии с другими иммунотерапевтическими воздействиями. Причем, в данном аспекте, наиболее привлекательной видится комбинация СТЛТ с ингибиторами контрольных точек (PD-1/PD-L1; CTLA-4).

3.2 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 после СТЛТ в зависимости от режима подведения и величины суммарной поглощенной дозы (табл. 6). Пациенты были распределены следующим образом: группа А - EQD2<106 Гр (23 пациента) и группа В - EQD2>106 Гр (23 пациента).

Таблица 6

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 обнаружены статистически значимое увеличение количества Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻) через 3-4 нед. после облучения как в группе с использованием эквивалентной суммарной очаговой 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] (рис. 10).

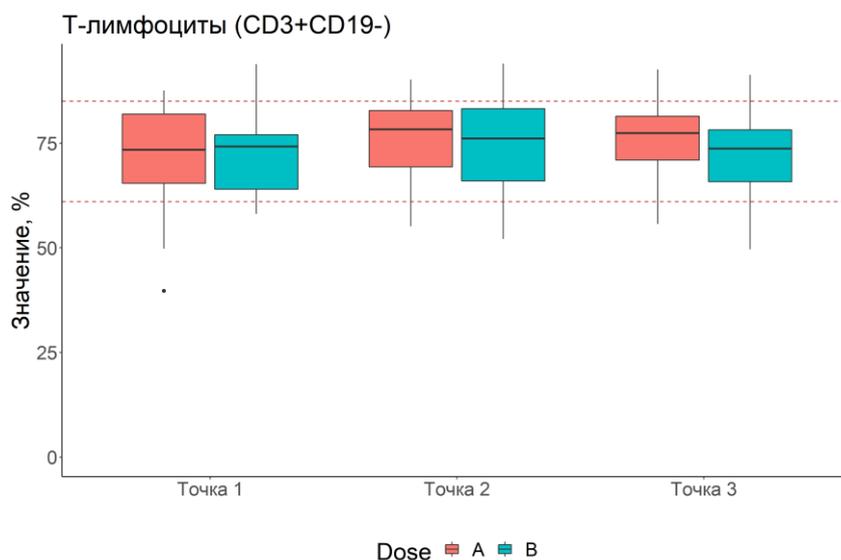


Рис. 10. Динамика (box-plot) содержания Т-лимфоцитов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

Кроме того, отмечалось статистически значимое увеличение числа Т-хелперов через 3-4 нед. после завершения облучения по сравнению с их значениями, установленными до начала проведения СТЛТ, при подведении к метастатическому очагу эквивалентной суммарной очаговой дозой <106 Гр [χ^2 Фридмана = 6,96; $p = 0,03$; попарное $p = 0,03$]. В группе В (EQD2 >106 Гр) изменений в количестве Т-хелперов до и после облучения не наблюдалось (рис. 11).

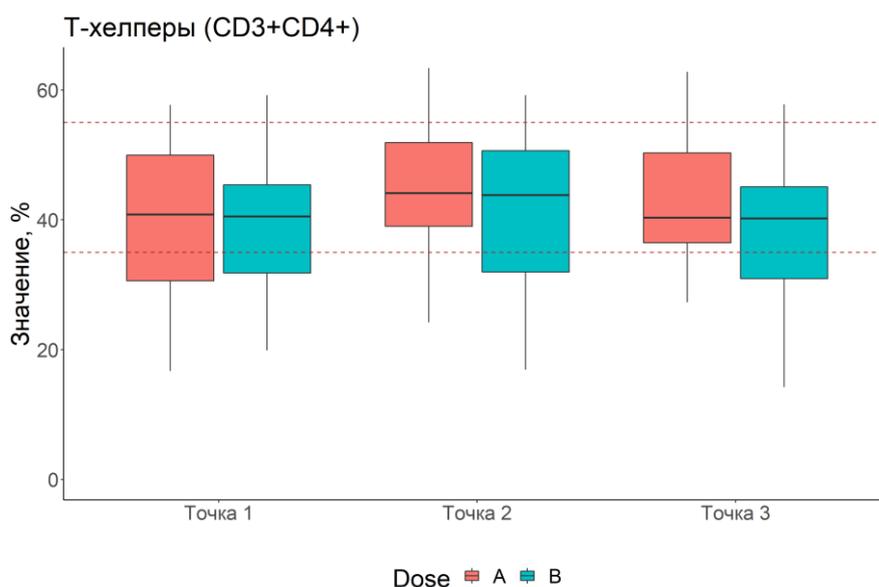


Рис. 11. Динамика (box-plot) содержания Т-хелперов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

Отмечалось статистически значимое повышение числа активированных Т-хелперов через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после окончания СТЛТ вне зависимости от величины суммарной эквивалентной дозы, подводимой на метастатический очаг: в группе А (EQD2<106 Гр) [χ^2 Фридмана = 26,2; p = 0,001; попарное p = 0,001 и 0,001 соответственно], в группе В (EQD2>106 Гр) (рис. 12) [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, выполненным через 3-4 нед. после облучения.

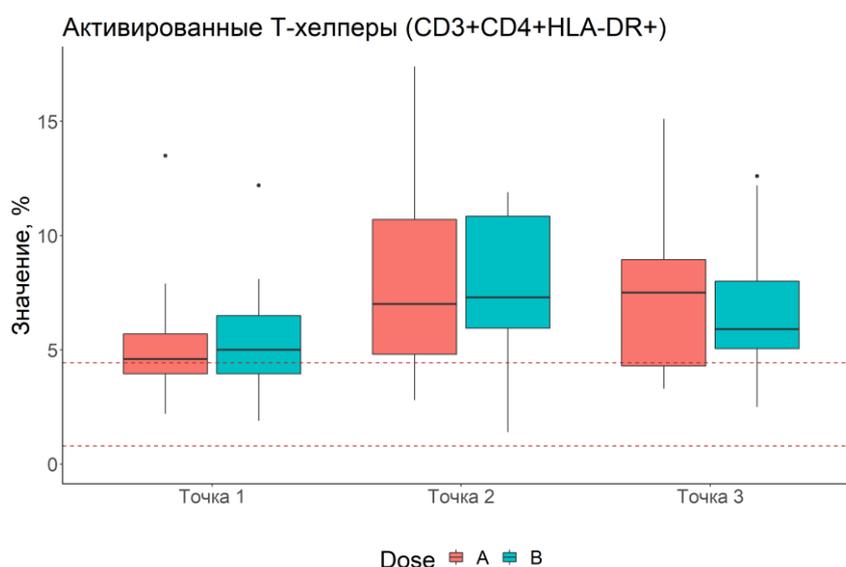


Рис. 12. Динамика (box-plot) содержания активированных CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ Т-хелперов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

При анализе содержания активированных CD4⁺CD25⁺ Т-хелперов в группе А (EQD2<106 Гр) выявлено статистически значимое увеличение количества лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁺ через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием до начала лечения [χ^2 Фридмана = 6,3; p = 0,04; попарное p = 0,03 соответственно]. При подведении более высокой суммарной эквивалентной дозы (EQD2>106 Гр) к опухолевым очагам статистически значимых изменений количества активированных CD4⁺CD25⁺ Т-хелперов не обнаружено (рис. 13).

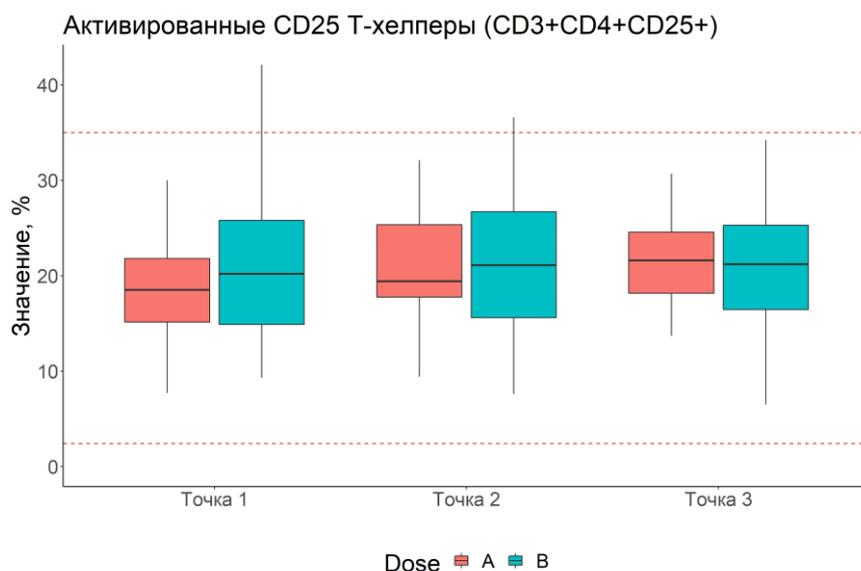


Рис. 13. Динамика (box-plot) содержания активированных CD4⁺CD25⁺ Т-хелперов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

Достаточно интересна картина динамики активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺). При использовании EQD2<106 Гр обнаружено 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]. Напротив, при использовании более высокой суммарной поглощенной эквивалентной дозы (EQD2>106 Гр) статистически значимых изменений в лимфоцитах с фенотипом CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ при EQD2>106 Гр не зафиксировано (рис. 14).

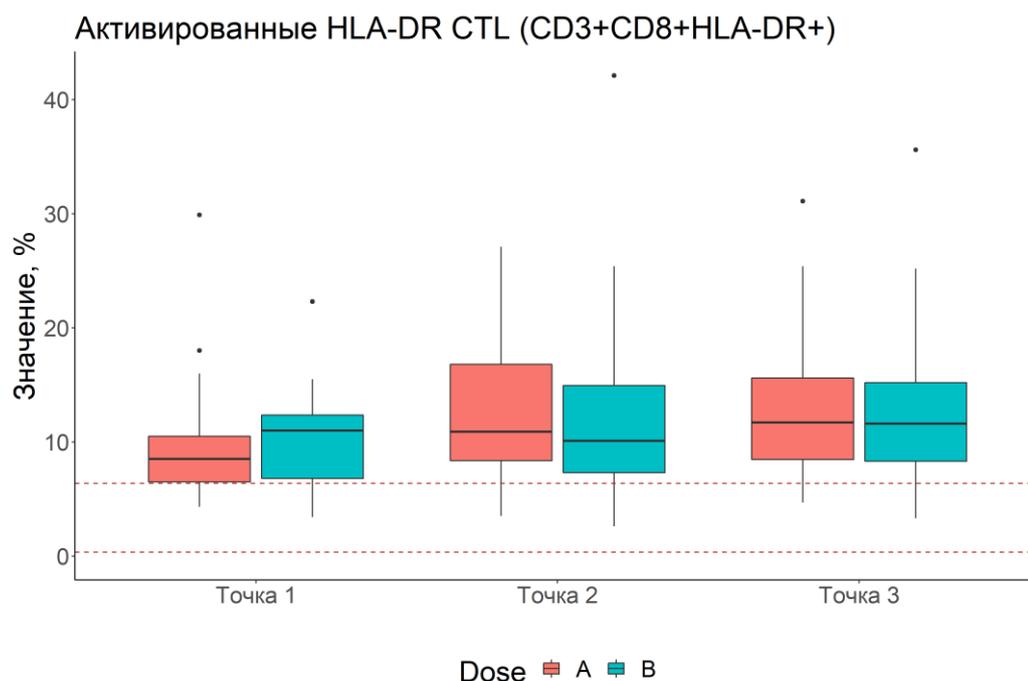


Рис. 14. Динамика (box-plot) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов лимфоцитов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

Особого внимания заслуживает анализ динамики числа Т-регуляторных лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией. При подведении к метастатическому очагу высокой суммарной эквивалентной дозы (EQD2>106 Гр) отмечено снижение количества Т-регуляторных лимфоцитов через 3-4 нед. после СТЛТ [χ^2 Фридмана = 7,7; $p = 0,02$; попарное $p = 0,04$]. При подведении более низкой суммарной эквивалентной дозы (EQD2<106 Гр) наблюдалась тенденция к снижению числа Т-регуляторных лимфоцитов, однако, наблюдаемые изменения были статистически не значимы (рис. 15).

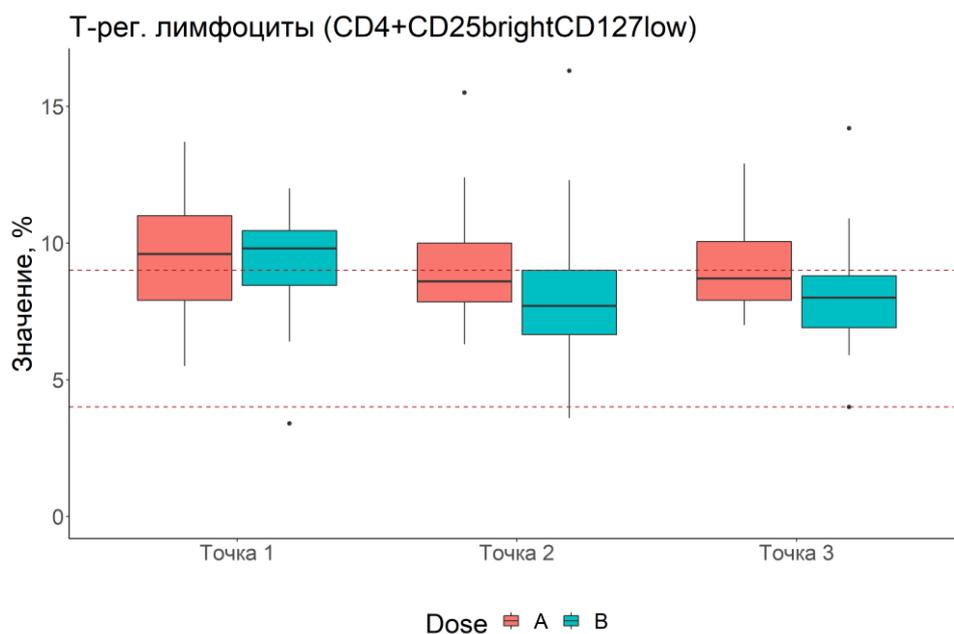


Рис. 15. Динамика (box-plot) содержания активированных Т-регуляторных лимфоцитов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

При анализе динамики В-лимфоцитов, наблюдалось снижение количества лимфоцитов с фенотипом CD3⁻CD19⁺ через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после СТЛТ в суммарной эквивалентной дозе 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), отмечалось 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] (рис. 16).

Также, зафиксировано 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 $p = 0,04$].

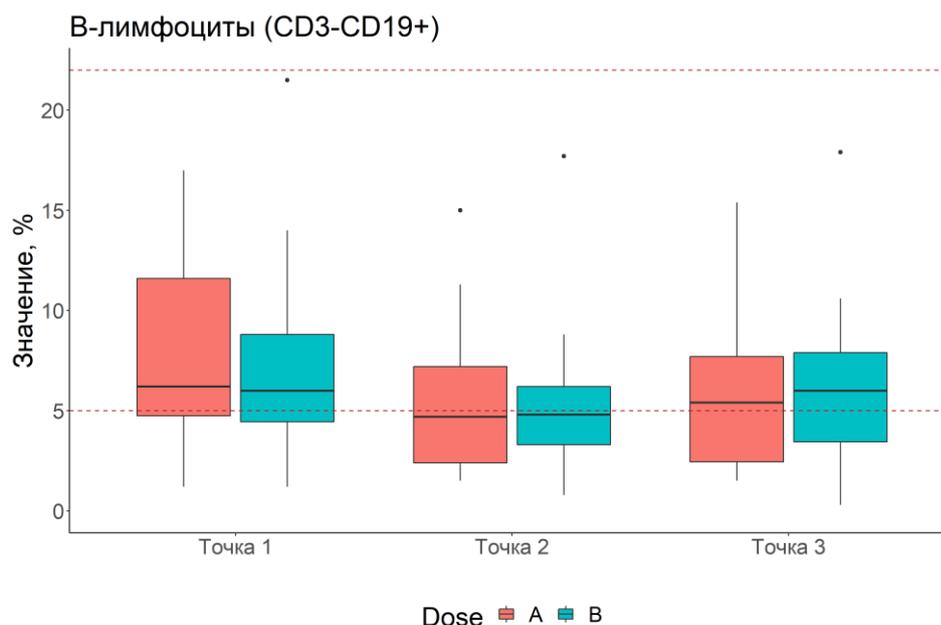


Рис. 16. Динамика (box-plot) содержания В-лимфоцитов в зависимости от подведенной дозы (медианы значений)

Полученные данные позволяют говорить о том, что при проведении СТЛТ на метастатические очаги в суммарной очаговой дозе не превышающей 106 Гр происходит более активный иммунный ответ, который проявляется в увеличении количества Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$); активированных Т-хелперов ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$); активированных $CD4^+CD25^+$ Т-хелперов и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$). С другой стороны, при проведении СТЛТ в суммарной эквивалентной дозе более 106 Гр отмечается статистически значимое снижение Т-регуляторных лимфоцитов.

Что же касается гуморального звена иммунитета, то статистически значимое снижение количества В-лимфоцитов определялось через 3-4 нед. после СТЛТ в обеих дозовых группах, не зависящим от величины суммарной очаговой дозы, подводимой к опухолевым очагам. Однако, было зафиксировано увеличение числа В-лимфоцитов через 6-8 нед. после радиотерапии по сравнению с исследованием через 3-4 нед. после СТЛТ при использовании суммарной поглощенной эквивалентной дозы более 106 Гр.

3.3 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 изучена 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. 7).

Таблица 7

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 $p = 0,008$] (рис. 17).

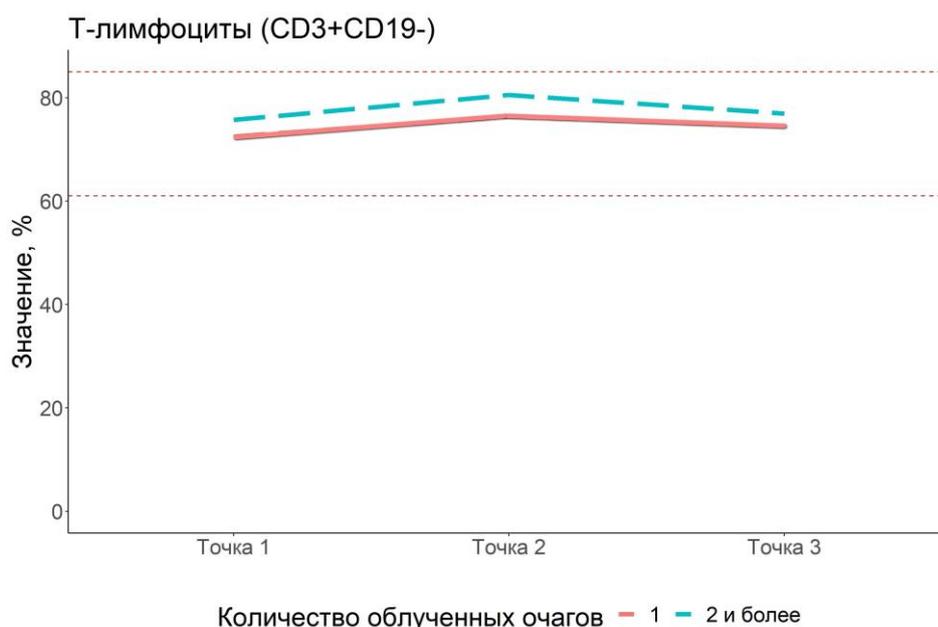


Рис. 17. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

В те же сроки после СТЛТ в группе А наблюдалось и увеличение количества Т-хелперов [χ^2 Фридмана = 9,1; $p = 0,01$; попарное $p = 0,008$], чего не происходило в группе с облучением 2 и более очагов (группа Б) (рис. 18).

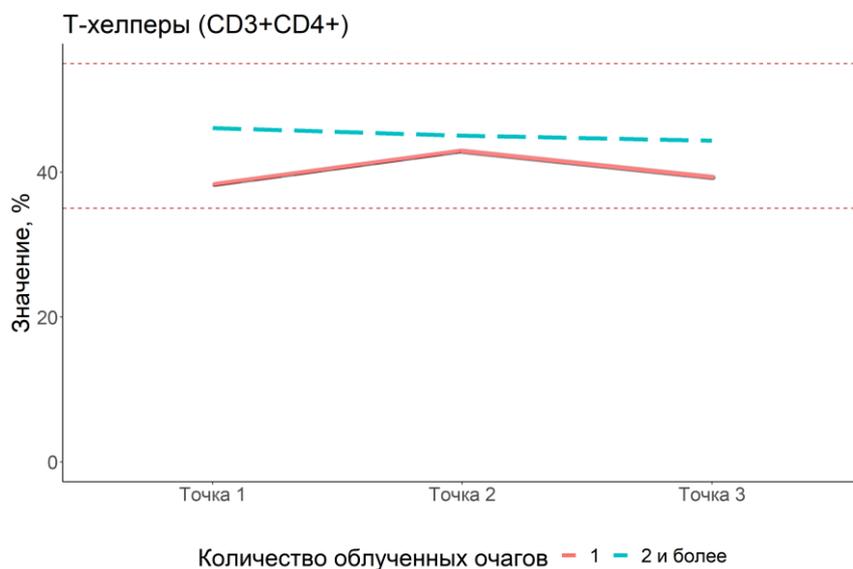


Рис. 18. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-хелперов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

В группе А 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 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. 19).

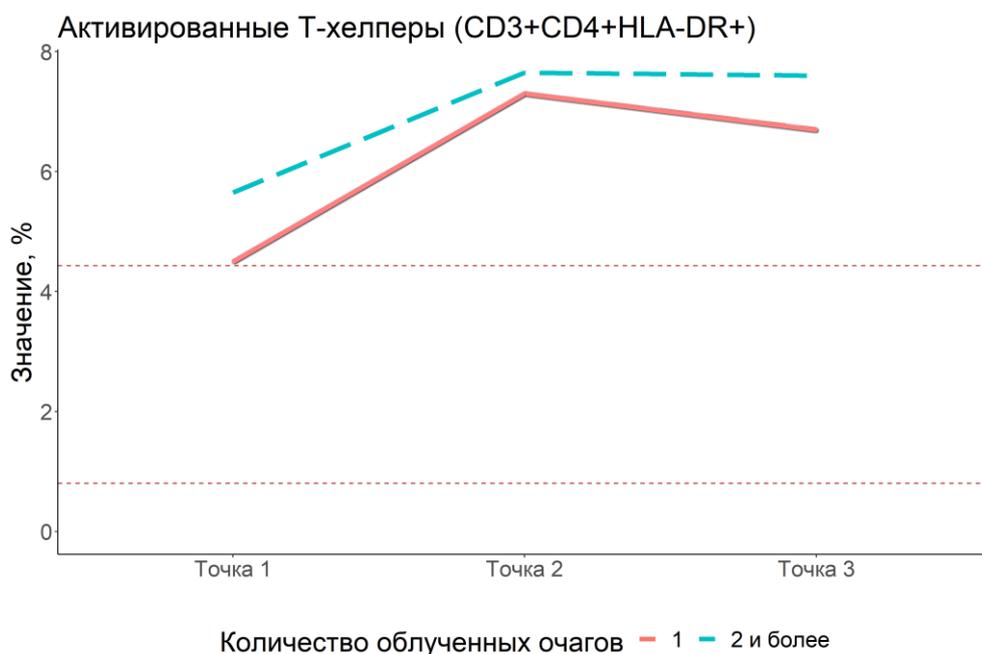


Рис. 19. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных Т-хелперов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

Помимо этого, статистически значимые изменения наблюдали 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 активированных цитотоксических Т-лимфоцитов [χ^2 Фридмана = 11,6; $p = 0,003$; попарное $p = 0,005$ и $0,02$ соответственно]. В группе Б наблюдалась тенденция к увеличению лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$, однако, статистически значимых изменений обнаружено не было (рис. 20).

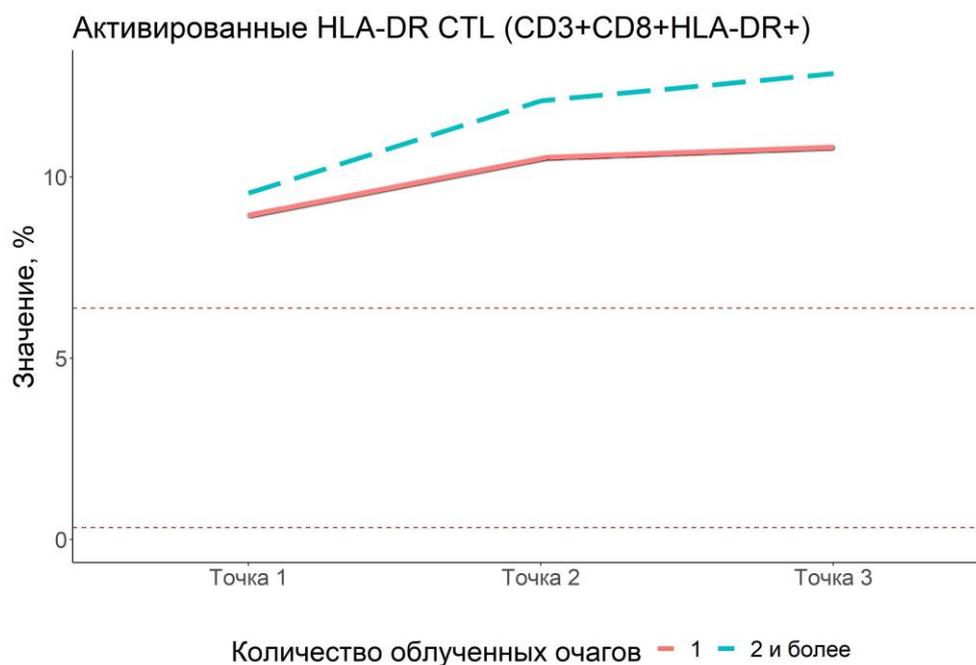


Рис. 20. Динамика (визуальный ряд) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

При анализе содержания В-лимфоцитов установлено статистически значимое снижение количества В-лимфоцитов через 3-4 нед. после СТЛТ в сравнении с показателями, полученными до облучения. Эти изменения зафиксированы 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 мы отметили увеличение иммунорегуляторного индекса через 3-4 нед. после завершения СТЛТ в сравнении с его значениями, установленными до лучевого лечения [χ^2 Фридмана = 9,9; $p = 0,007$; попарное $p = 0,006$]. Помимо этого, в группе А было зафиксировано снижение числа НК-клеток [χ^2 Фридмана = 7; $p = 0,003$; попарное $p = 0,003$] и НКТ-подобных лимфоцитов (рис. 21) [χ^2 Фридмана = 9,3; $p = 0,001$; попарное $p = 0,008$] через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с их значениями, определяемыми до начала лучевого лечения. В группе Б статистически значимых изменений в данных показателях не наблюдалось.

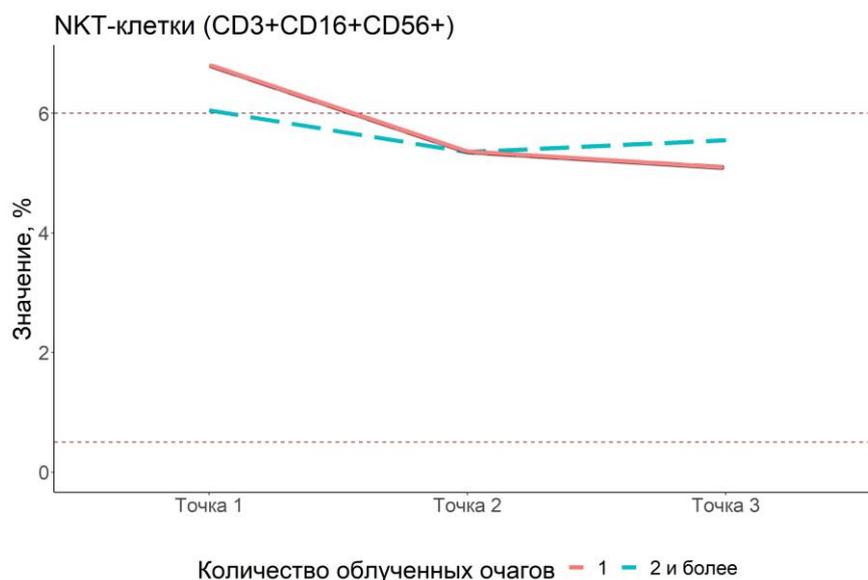


Рис. 21. Динамика (визуальный ряд) содержания НКТ-клеток в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

При анализе Т-регуляторных лимфоцитов в группе, где облучению подвергался один очаг, мы отметили снижение величины данной субпопуляции через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после облучения по сравнению с исследованием до начала 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 мы также наблюдали тенденцию (статистически незначимую) к снижению Т-регуляторных лимфоцитов (рис. 22).

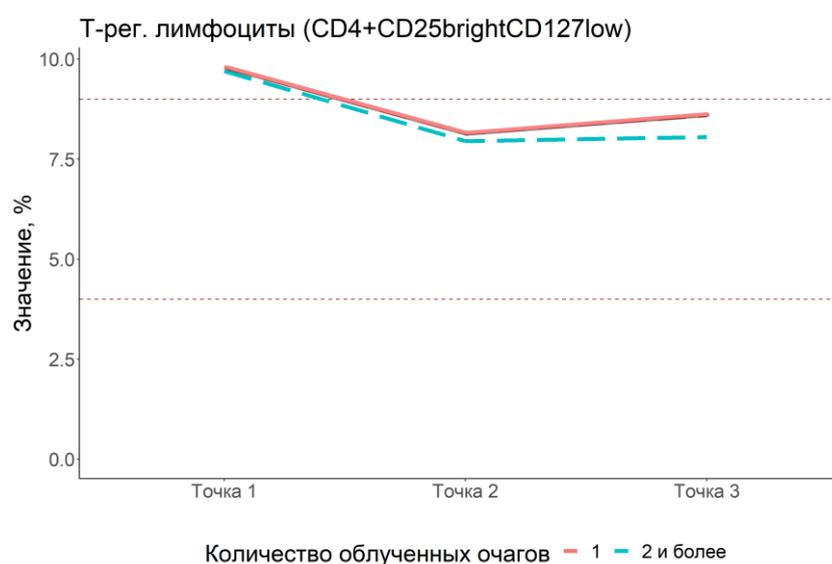


Рис. 22. Динамика (визуальный ряд) содержания Т-регуляторных лимфоцитов в зависимости от количества облучаемых очагов (медианы значений)

Некоторыми авторами высказывается мнение о том, что у больных с генерализованным опухолевым процессом облучение всех или многих метастатических очагов приводит к более выраженному иммунному ответу, чем облучение одного метастаза [17]. Так, Brooks and Chang [17] предполагают, что облучение более чем одного опухолевого очага увеличивает шанс успешной индукции противоопухолевого иммунного ответа по нескольким причинам: более массивное высвобождение и представление иммунокомпетентным клеткам опухолевоассоциированных антигенов; стимуляция сосудистой сети опухоли; оптимизированный доступ иммунных клеток ко всей опухолевой массе; разрушение устойчивых к системному лечению субклональных популяций опухоли.

В рамках представленного исследования, анализ показателей иммунного статуса у больных с облучением одного или нескольких метастатических очагов в зависимости от количества облученных очагов показал, что более активный Т-клеточный иммунный ответ наблюдался после облучения 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. Возможно, такая неоднозначная картина связана с небольшим количеством наблюдений, различной локализацией первичной опухоли и облучаемых метастазов у исследуемых пациентов.

3.4 СРАВНЕНИЕ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ВОЗНИКАЮЩИХ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ОБЛУЧЕНИЯ МЕТАСТАЗОВ В ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ

На сегодняшний день, неизвестно, каким образом облучение метастатических очагов различных локализаций влияет на состояние иммунной системы пациентов. Поэтому 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. 8).

Таблица 8

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

Изучение показателей иммунного статуса у пациентов с метастатическими опухолями в зависимости от локализации опухолевого очага 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] (рис. 23).

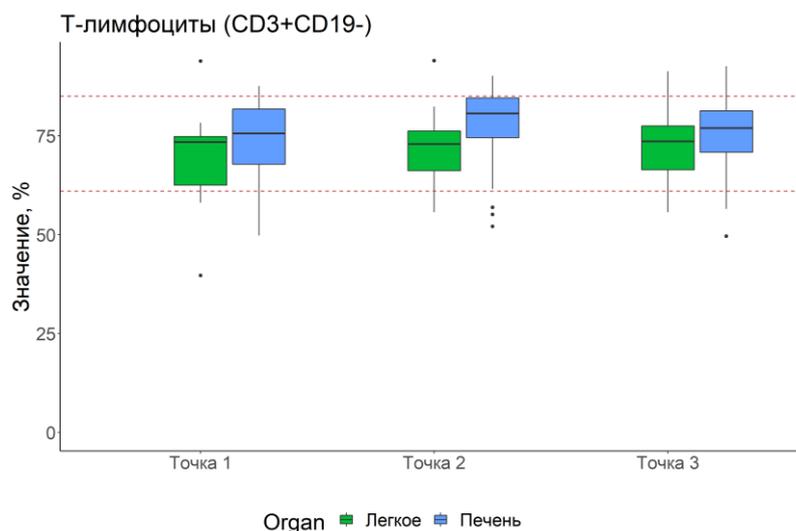


Рис. 23. Динамика (box-plot) содержания Т-лимфоцитов в зависимости от локализации облученного опухолевого очага (медианы значений)

При исследовании субпопуляции Т-хелперов [χ^2 Фридмана = 10,6; $p = 0,005$; попарное $p = 0,006$] отмечено увеличение показателей с фенотипом CD3⁺CD4⁺ через 3-4 нед. после СТЛТ в группе, где облучению подверглись очаги в печени (рис. 24). Статистически значимых изменений вышеуказанных показателей при облучении метастазов в легких обнаружено не было.

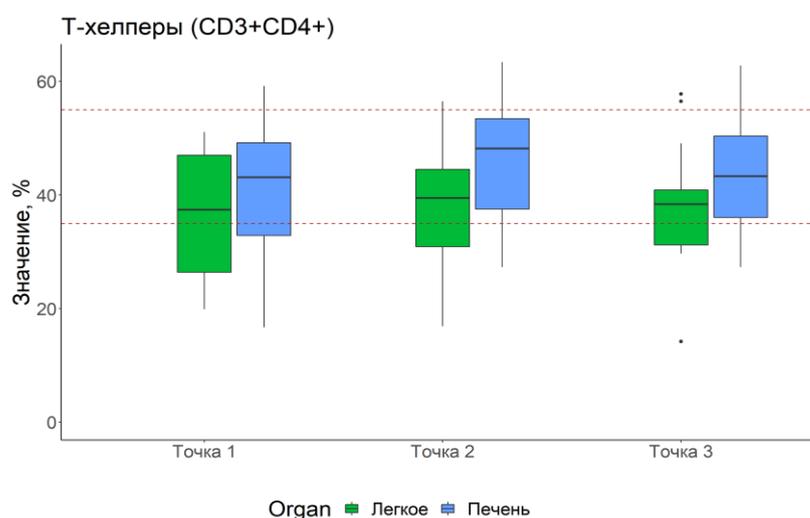


Рис. 24. Динамика (box-plot) содержания Т-хелперов в зависимости от локализации облученного опухолевого очага (медианы значений)

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 метастазов в печень [χ^2 Фридмана = 29,2; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,001$ соответственно], так и метастатических очагов в легких [χ^2 Фридмана = 8,9; $p = 0,01$; попарное $p = 0,02$ и $0,04$ соответственно] (рис. 25).

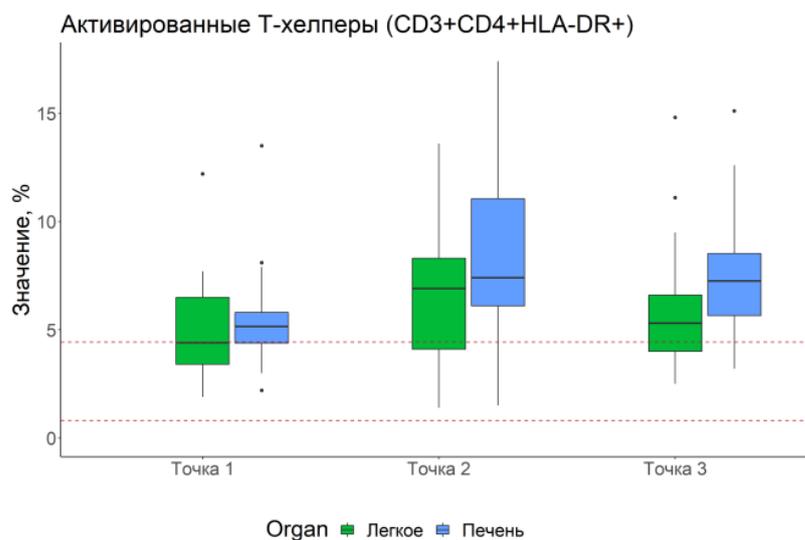


Рис. 25. Динамика (box-plot) содержания активированных Т-хелперов в зависимости от локализации облученного опухолевого очага (медианы значений)

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. 26).

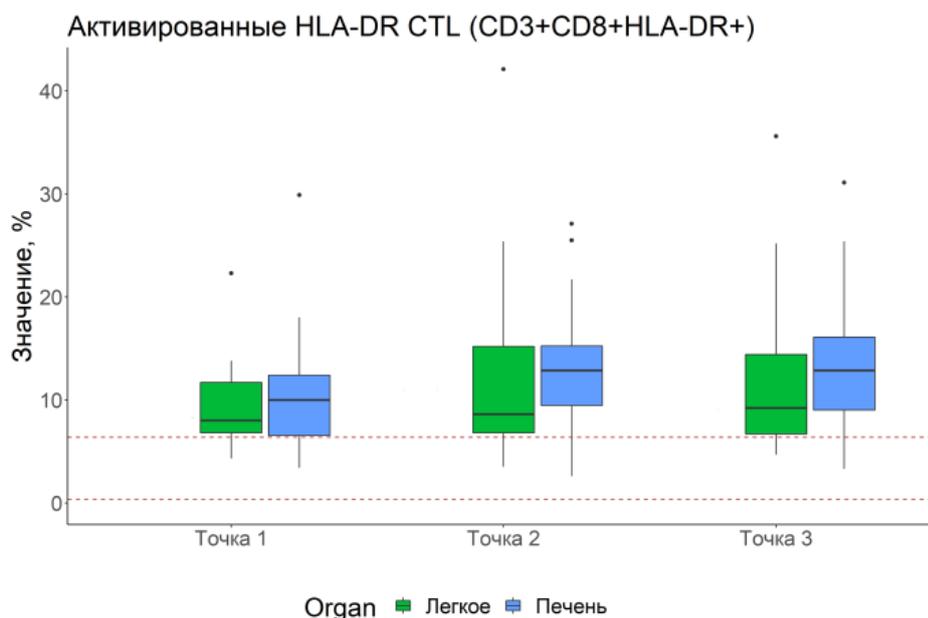


Рис. 26. Динамика (box-plot) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов в зависимости от локализации облученного опухолевого очага (медианы значений)

При исследовании В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) было отмечено 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) было отмечено снижение НКТ-клеток через 6-8 нед. после СТЛТ в сравнении с исследованием до облучения (рис. 27) [χ^2 Фридмана = 9,02; $p = 0,01$; попарное $p = 0,01$].

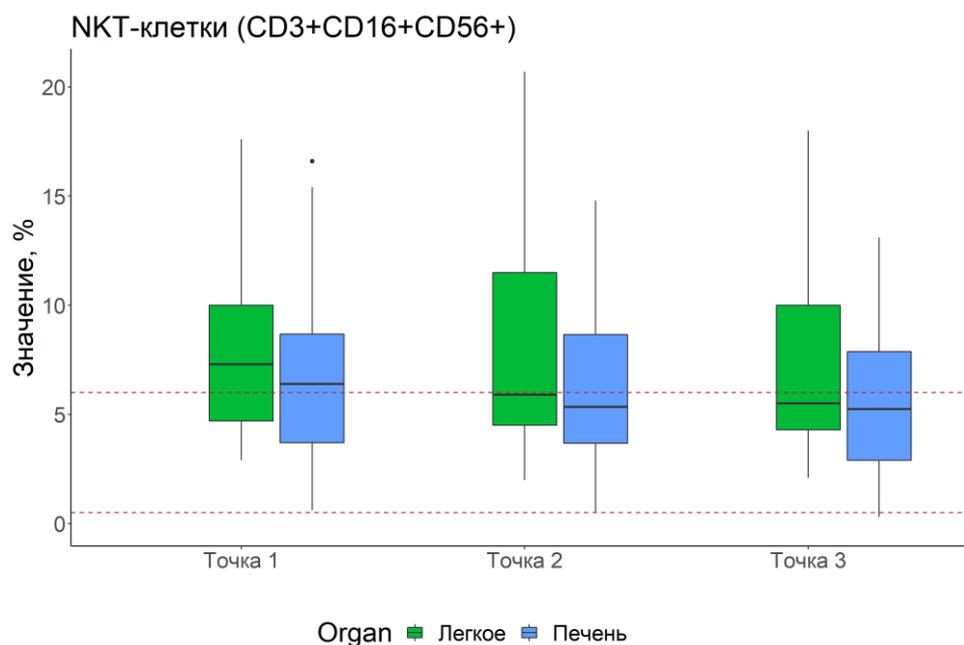


Рис. 27. Динамика (box-plot) содержания NKT-клеток в зависимости от локализации облученного опухолевого очага (медианы значений)

Статистически значимых изменений в вышеуказанных показателях при облучении очагов в легких не наблюдалось. Однако, в данной группе было зафиксировано статистически значимое снижение Т-регуляторных лимфоцитов через 3-4 нед. и через 6-8 нед. после СТЛТ в сравнении с показателями, полученными до начала лучевого лечения (рис. 28) [χ^2 Фридмана = 15,6; $p = 0,001$; попарное $p = 0,001$ и $0,006$ соответственно].

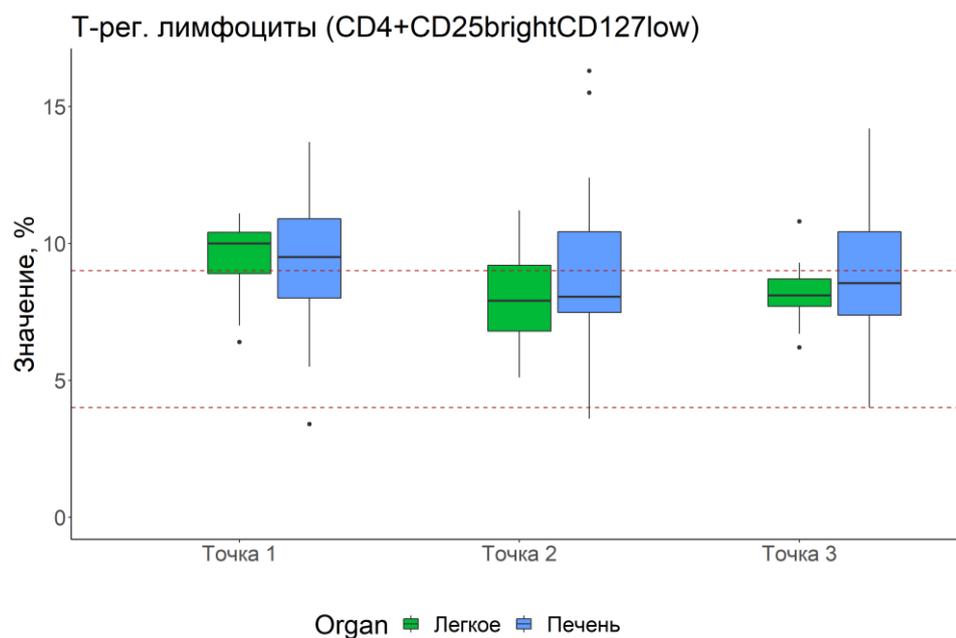


Рис. 28. Динамика (box-plot) содержания Т - регуляторных лимфоцитов в зависимости от локализации облученного опухолевого очага (медианы значений)

Помимо этого, было отмечено снижение количества НК-клеток через 6-8 нед. после СТЛТ по сравнению с исследованием, выполненным до лучевого воздействия [χ^2 Фридмана = 9,3; $p = 0,01$; попарное $p = 0,01$].

Таким образом, согласно данным нашего 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. Данное наблюдение может быть связано с тем, что печеночная ткань является более иммуногенной по сравнению с легочной. В частности, согласно результатам исследования Tang и соавт. было показано, что облучение метастазов в печени у пациентов с немелкоклеточным раком легкого приводит к более сильной активации противоопухолевого иммунитета, чем облучение легочных метастазов [92].

3.5 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 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. 9.

Таблица 9

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. 10.

Таблица 10

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 проведенного 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 больных с 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 было зафиксировано только через 6-8 недель после завершения СТЛТ по сравнению с исследованием до радиотерапии (рис. 29) [χ^2 Фридмана = 9,6; $p = 0,008$; попарное $p = 0,006$].

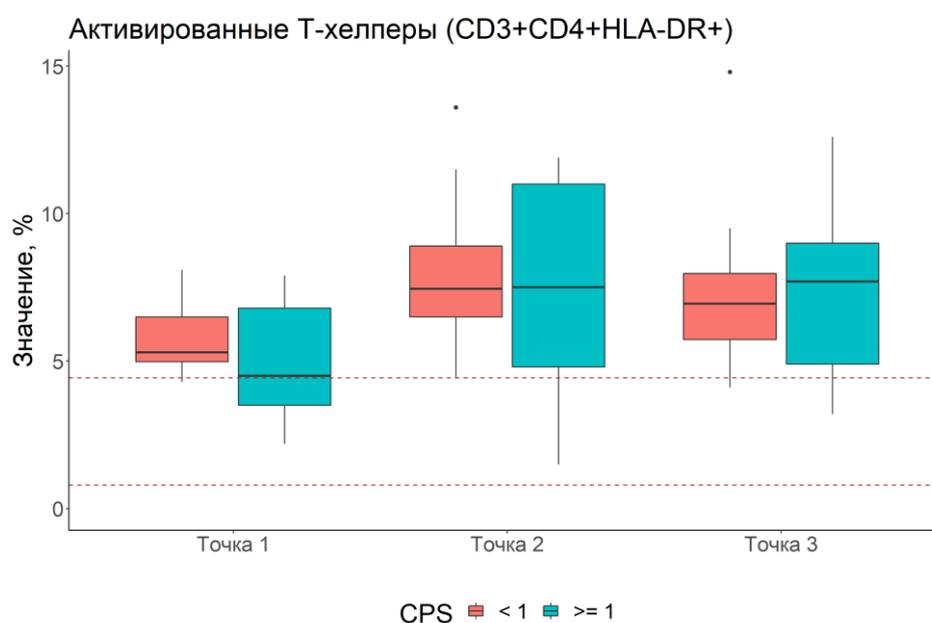


Рис. 29. Динамика (box-plot) содержания активированных Т-хелперов, группировка по индексу CPS (медианы значений)

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 лимфоцитах с фенотипом $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$ при $CPS \geq 1$ не было зафиксировано (рис. 30).

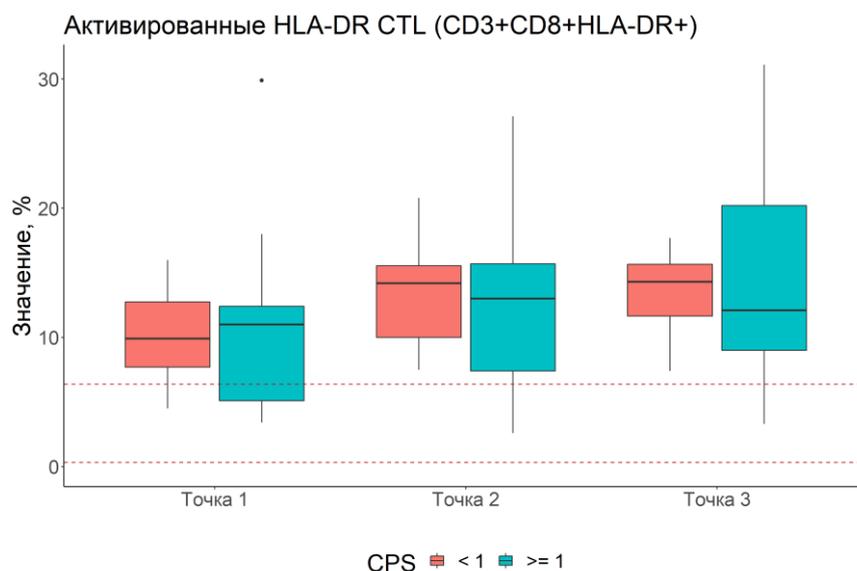


Рис. 30. Динамика (box-plot) содержания активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, группировка по индексу CPS (медианы значений)

При определении количества Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) у больных из группы с негативной экспрессией PD-L1 ($CPS < 1$) было отмечено увеличение общего числа 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 с позитивной экспрессией PD-L1 ($CPS \geq 1$), статистически значимых изменений в содержании Т-хелперов обнаружено не было (рис. 31).

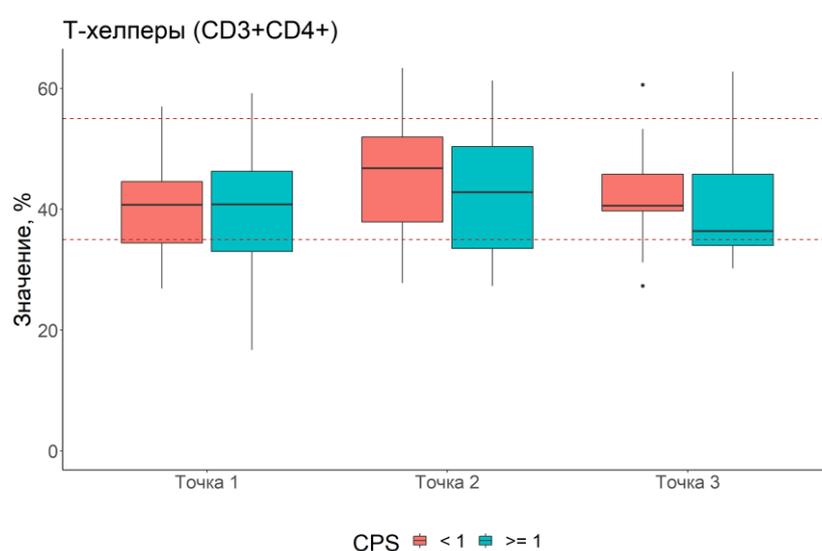


Рис. 31. Динамика (box-plot) содержания Т-хелперов, группировка по индексу CPS (медианы значений)

Схожая картина была обнаружена и при исследовании Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻). Так, в группе с отсутствием экспрессии PD-L1 (CPS<1) было 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 в группе с позитивной экспрессией PD-L1 (CPS \geq 1), статистически значимых изменений в содержании Т-лимфоцитов не наблюдалось.

Кроме того, были получены достаточно интересные данные при исследовании динамики Т-регуляторных лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}). Так, в группе с позитивной экспрессией PD-L1 было 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 негативной экспрессией PD-L1 (CPS<1) наблюдалась тенденция к снижению исследуемых показателей, однако, статистически значимых изменений в данной субпопуляции не получено (рис. 32).

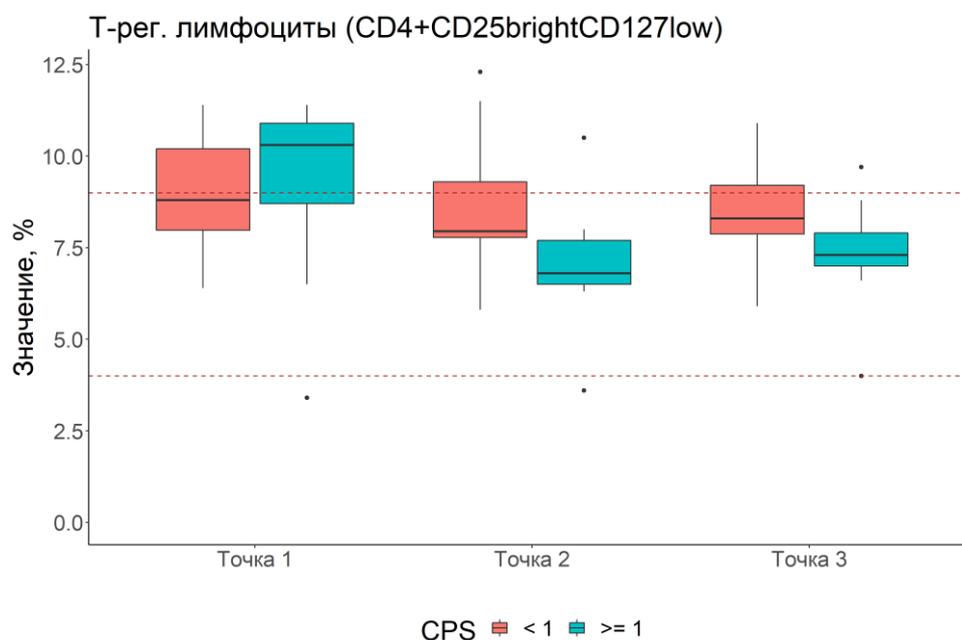


Рис. 32. Динамика (box-plot) содержания Т-регуляторных лимфоцитов, группировка по индексу CPS (медианы значений)

Согласно результатам настоящего исследования было обнаружено, что в группе с негативной экспрессией PD-L1 ($CPS < 1$) после проведения СТЛТ 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 ($CPS \geq 1$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первые работы по изучению иммунологических эффектов, возникающих на фоне лучевой терапии, были предприняты Demaria и соавт. [27], которые впервые сообщили, что «абскопальный эффект» радиотерапии является иммуноопосредованным феноменом. Недавние исследования указывают на важность CD8⁺ Т-клеточной инфильтрации для эрадикации первичной опухоли или отдаленных метастазов [40, 50]. Некоторыми авторами был сделан вывод о том, что усиление опухолевого антигенспецифического клеточного иммунитета путем сочетания СТЛТ и иммунотерапии может быть решающей стратегией для улучшения выживаемости у пациентов с немелкоклеточным раком легкого I стадии [114]. В виду вышесказанного, изучение влияния стереотаксической лучевой терапии на функциональное состояние иммунной системы у больных с метастатическими формами солидных опухолей, стало целью и определило задачи данного исследования.

Особого внимания в проведенном исследовании заслуживает увеличение показателей именно Т-клеточного звена (Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻); Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺); активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) наряду с уменьшением числа Т-регуляторных лимфоцитов и показателей гуморального звена иммунитета после проведения радиотерапии. Учитывая, что в выполненной работе наиболее высокие показатели Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа были зарегистрированы через 3-4 нед. после завершения СТЛТ, можно предположить, что этот период является оптимальным для сочетания лучевой терапии с другими иммунотерапевтическими воздействиями (PD-L/PD-L1; CTLA-4).

Кроме того, остается дискуссионным вопрос о влиянии режима и технологии подведения дозы, а также величины суммарной поглощенной дозы на интенсивность противоопухолевого иммунного ответа. В литературе имеются данные, указывающие на достоверное увеличение частоты возникновения абскопальных эффектов при увеличении суммарной очаговой дозы, подведенной к

опухолевому очагу [56, 66]. Тем не менее, согласно полученным данным, при проведении СТЛТ на метастатические очаги в печени и легких в суммарной очаговой дозе, которая не превышает 106 Гр, происходит более активный иммунный ответ за счет увеличения числа Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$); активированных субпопуляций Т-хелперов с фенотипами $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$ и $CD4^+CD25^+$; активированных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+HLA-DR^+$). Однако, при проведении СТЛТ в суммарной эквивалентной дозе более 106 Гр отмечается статистически значимое снижение Т-регуляторных лимфоцитов. Возможно, данные наблюдения могут быть связаны с тем, что при применении низких доз радиотерапии происходят изменения в сосудистой сети опухоли и увеличивается доступность Т-лимфоцитов к опухолевому очагу [39, 74].

По данным ряда авторов существует мнение о том, что у больных с метастатическим процессом облучение большего количества опухолевых очагов приводит к более выраженному иммунному ответу, чем облучение одного метастаза [17]. В рамках представленного исследования, анализ показателей иммунного статуса у пациентов с облучением одного или нескольких метастатических очагов показал, что более активный Т-клеточный иммунный ответ наблюдался после облучения 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. Подобная ситуация может быть связана с различными процессами в опухолевом микроокружении, возникающими после СТЛТ одного или нескольких метастазов, однако, необходимо увеличение выборки пациентов для формирования однозначного заключения о развитии радиоиндуцированных иммунологических изменений в зависимости от количества облученных метастатических очагов.

На сегодняшний день, отсутствует полное понимание о том, какие изменения происходят в иммунной системе пациентов с генерализованным опухолевым процессом после проведения СТЛТ метастатических очагов различных локализаций. Опираясь на результаты исследования Tang и соавт. [92], можно констатировать факт более сильной активации противоопухолевого иммунитета

после СТЛТ метастазов в печени, чем после облучения легочных метастазов у пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого. Изучение показателей иммунного статуса у больных с метастатическими опухолями в зависимости от локализации опухолевого очага показало, что более выраженная активация Т-клеточного звена иммунитета происходит в группе с облучением метастазов в печени по сравнению с группой, где облучению подвергались очаги в легких. Данное наблюдение может быть связано с тем, что ткань печени является более иммуногенной по сравнению с легочной.

По данным некоторых проспективных рандомизированных исследований есть указания на то, что совместное использование СТЛТ и иммунотерапии приводит к достоверному увеличению показателей выживаемости без прогрессирования у пациентов с олигометастатическим немелкоклеточным раком легкого в сравнении с терапией только ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [94]. Важно отметить, что Breen W.G. и соавт. [16] высказали предположение о том, что применение данного комбинированного подхода у больных с низким исходным уровнем экспрессии PD-L1 вызывает наибольший интерес. Xiaoliang Liu и соавт. в 2019 г. представили данные об эффективности комбинированной терапии СТЛТ и иммунотерапии (анти-PD-L1) у пациентов с метастатической холангиокарциномой при отрицательной экспрессии PD-L1 и низкой мутационной нагрузке [52]. Это потенциально расширяет показания к комбинированной терапии, в особенности для пациентов с отсутствием экспрессией PD-L1. Согласно данным проведенного исследования системные иммуномодулирующие эффекты СТЛТ в большей степени были выражены в группе с негативной экспрессией PD-L1 (CPS<1). Можно предположить, что у пациентов с негативной экспрессией лиганда рецептора программируемой клеточной смерти 1 сочетание СТЛТ и иммуноонкологических препаратов может рассматриваться в качестве перспективной терапевтической комбинации.

Факт возникновения противоопухолевого радиоиндуцированного иммунного ответа интересен сам по себе, тем не менее, механизмы, провоцирующие данное явление, выглядят еще более интригующими. В связи с вышесказанным, очевидно,

что необходимы дальнейшие исследования роли и значения СТЛТ в формировании специфического противоопухолевого иммунитета, поиск новых иммунологических предикторов, что, в конечном итоге, сможет помочь в реализации эффективных комбинированных терапевтических подходов.

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 ≥ 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»).

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- ДИ – доверительный интервал
- ДК – дендритные клетки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИТ – иммунотерапия
- КТ – компьютерная томография
- ЛТ – лучевая терапия
- МР – магнитнорезонансный
- МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
- НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- ОАА – опухолево-ассоциированный антиген
- РОД – разовая очаговая доза
- СТЛТ - стереотаксическая лучевая терапия
- СТРХ – стереотаксическая радиохирurgia
- УЗ – ультразвуковая
- ФК – функциональный класс
- ХСН – хроническая сердечная недостаточность
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- BATF3 – основной транскрипционный фактор лейциновой молнии АТФ-подобный 3 (Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3)
- BCR-ABL — гибридный белок, продукт гибридного гена BCR-ABL1 (fusion protein)
- BED – биологически эффективная доза (biologically effective dose)
- CD – кластер дифференцировки (cluster differentiation)
- cGAS - синтаза циклического ГМФ-АМФ (cyclic GMP-AMP synthase)
- Chk1 – эффекторная киназа 1 (effector kinase 1)
- Chk2 – эффекторная киназа 2 (effector kinase 2)
- СТСАЕ – Общие терминологические критерии для нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events)

CTLA-4 – антиген цитотоксических Т-лимфоцитов (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

CXCL16 – хемокиновый лиганд 16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16)

DAMP – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями опухолевых клеток (Damage-associated molecular pattern)

ECOG – Восточная кооперативная онкологическая группа (Eastern Cooperative Oncology Group)

Fas-рецептор – белок, кодируемые геном FAS, член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 6

Flt3L - fms-подобная тирозинкиназа 3 (fms-like tyrosine kinase 3 ligand)

GTV – общий объем опухоли (planning target volume)

HLA – группа антигенов гистосовместимости (Human Leukocyte Antigens)

HMGB-1 – ядерный негистоновый белок группы 1 с высокой подвижностью (High mobility group box 1 protein)

HSP – белки теплового шока (heat shock proteins)

IFN (ИФН) – интерферон (interferon)

ICAM-1 – молекулы межклеточной адгезии 1-го типа (intercellular adhesion molecule 1)

ITV – «внутренний» объем мишени (interior target volume)

LAG3 – ген активации лимфоцитов-3 (lymphocyte activation gene-3)

MDSCs – клетки-супрессоры миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells)

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов

NF-κB – ингибитор ядерного фактора-каппа В (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NK2GD – рецептор NK-клеток группы 2D (natural killer group 2D receptor)

NYHA – Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация (New York Heart Association)

PD-1 – белок запрограммированной гибели клеток (programmed cell death protein 1)

PD-L1 – лиганд PD-1 (programmed death-ligand 1)

PI3K – киназы, связанные с фосфатидилинозитол-3-киназой

PTV – планируемый объем мишени (planning target volume)

SABR – стереотаксическая радиотерапия (stereotactic ablative radiotherapy)

SRS – стереотаксическая радиохирургия (stereotactic radiosurgery)

STING – стимулятор генов интерферона (Stimulator of Interferon Genes)

TAP-2 – белок-антиген пептидного транспортера 2 (antigen peptide transporter 2)

TGF β – трансформирующий фактор роста β (Transforming growth factor beta)

TIL – инфильтрирующие опухоль лимфоциты (tumor-infiltrating lymphocytes)

TIM3 – Т-клеточный иммуноглобулин 3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-3)

TLR9 - толл-подобный рецептор 9 (toll like receptor 9)

TREX1 – экзонуклеазы-1 первичной репарации

VCAM – молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа (vascular cell adhesion molecule 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балдуева, И.А. Стереотаксическая лучевая терапия в фокусе системных иммунологических эффектов / И.А. Балдуева, А.Ю. Зозуля, С.Н. Новиков // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9. – № 3s1. – С. 23–25.
2. 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.
3. Литтл, Д.Б. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям / Д.Б. Литтл // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2007. – Т. 47. – № 3. – С. 262–272.
4. Рагулин, Ю.А. Сочетание иммунотерапии и лучевой терапии при немелкоклеточном раке легкого / Ю.А. Рагулин // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. –2018. – Т. 7. – № 5. – С. 90–96.
5. Alite, F. Decreased risk of radiation pneumonitis with coincident concurrent use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients receiving lung stereotactic body radiation therapy / F. Alite, N. Balasubramanian, W.H. Adams // Am. J. Clin. Oncol. – 2016. – Vol. 41. - N 6. – P. 576-580.
6. Amaravadi, R.K. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment / R.K. Amaravadi, C.B. Thompson // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13. – P. 7271–7279.
7. Ambrosino, G. Image-guided robotic stereotactic radiosurgery for unresectable liver metastases: preliminary results / G. Ambrosino, F. Polistina, G. Costantin et al. // Anticancer Res. 2009. – Vol. 29. – P. 3381–3384.
8. Anti-PD 1 brain collaboration with radiotherapy: the ABC-X Study. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03340129>
9. Benci, J.L. Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade / J.L. Benci, B. Xu, Y. Qiu et al. // Cell. – 2016. – Vol. 167. - N 6. - P. 1540–1554.e12.

10. Benedict, S.H. Stereotactic body radiation therapy: the report of AAPM Task Group 101 / S.H. Benedict, K.M. Yenice, D. Followill et al. // *Med. Phys.* – 2010. – Vol. 37. – N 8. – P. 4078–4101.
11. Bilal, H. Is radiofrequency ablation more effective than stereotactic ablative radiotherapy in patients with early stage medically inoperable non-small cell lung cancer? / H. Bilal, S. Mahmood, B. Rajashankerc et al. // *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery.* - 2012. – Vol. 15. - P. 258–265.
12. Binder, C.J. Innate sensing of oxidation- specific epitopes in health and disease / C.J. Binder, N. Papac-Milicevic, J.L. Witztum // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 16. – N 8. — P. 485–497.
13. Blades, R.A. Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy / R.A. Blades, P.J. Keating, L.J. McWilliam et al. // *Urology.* – 1995. – Vol. 46. - N 5. – P. 681–686.
14. Blomgren, H. Stereotactic high dose fraction radiation therapy of extracranial tumors using an accelerator. Clinical experience of the first thirty-one patients / H. Blomgren, I. Lax, I. Näslund et al. // *Acta Oncol. Stockh. Swed.* – 1995. – Vol. 34. – N 6. – P. 861–870.
15. Bloom, S. *Oxford Handbook of Gastroenterology and Hepatology* / S. Bloom, G. Webster - Oxford University Press. - 2011. – 488 p.
16. Breen, W.G. Radiation and immunotherapy: emerging mechanisms of synergy / W.G. Breen, K. Leventakos, H. Dong et al. // *J. Thorac. Dis.* – 2020. – Vol. 12. - N 11. – P. 7011–7023.
17. Brooks, E.D. Time to abandon single-site irradiation for inducing abscopal effects / E.D. Brooks, J.Y. Chang // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 16. – P. 123–135.
18. Brzostek-Racine, S. The DNA damage response induces IFN / S. Brzostek-Racine, C. Gordon, S. Van Scoy et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187. – N 10. – P. 5336–5345.
19. Burnette, B.C. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity / B.C. Burnette, H. Liang, Y. Lee et al. // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71. – N 7. – P. 2488–2496.

20. Chakraborty, M. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy / M. Chakraborty, S.I. Abrams, K. Camphausen et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 170. - N 12. – P. 6338–6347.
21. Chamilos, G. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37 / G. Chamilos, J. Gregorio, S. Meller et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120. – N 18. – P. 3699–3707.
22. Chen, D.S. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle / D.S. Chen, I. Mellman // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39. - N 1. – P. 1–10.
23. Chicas Sett, R. OC-0060 I-SABR induces local and abscopal responses in metastatic patients after failure to ICI treatment / R. Chicas Sett, I. Morales-Orue, J.F. Castilla-Martinez et al. // *Radiotherapy and oncology.* – 2019. – Vol. 133. – P. 524.
24. Child, C.G. Surgery and portal hypertension / C.G. Child, J.G. Turcotte // *Major Probl. Clin. Surg.* - 1964. – Vol. 1. – P. 1-85.
25. Corrales, L. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity / L. Corrales, S.M. McWhirter, T.W. Jr. Dubensky // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126. – N 7. – P. 2404–2411.
26. Deipolyi, A.R. Abscopal effect after radioembolization for metastatic breast cancer in the setting of immunotherapy / A.R. Deipolyi, J.F. Bromberg, J.P. Erinjeri et al. // *J. Vasc. Interv. Radiol.* – 2018. – Vol. 29. – P. 432-433.
27. Demaria, S. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated / S. Demaria, B. Ng, M.L. Devitt et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58. – P. 862–870.
28. Deng, L. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced Type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors / L. Deng, H. Liang, M. Xu et al. // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41. - N 5. – P. 843–852.
29. Durand, F. Assessment of prognosis of cirrhosis / F. Durand, D. Valla // *Semin Liver Dis.* – 2008. – Vol.28. - P. 110–122.
30. Franceschini, D. Role of stereotactic body radiation therapy for lung metastases from radio-resistant primary tumours / D. Franceschini, L. Cozzi, F. De Rose // *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 143. - N 7. – P. 1293-1299.

31. Friedman, M. A comparison of alternative tests of significance for the problem of m rankings / M. Friedman // *The Annals of Mathematical Statistics*. – 1940. – Vol. 11. - N 1. – P. 86–92.
32. Ganss, R. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication / R. Ganss, E. Ryschich, E. Klar et al. // *Cancer Res*. – 2002. – Vol. 62. – P. 1462–1470.
33. Gasser, S. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor / S. Gasser, S. Orsulic, E.J. Brown et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 436. – N 7054. – P. 1186–1190.
34. Gehrke, N. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing / N. Gehrke, C. Mertens, T. Zillinger et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39. – N 3. – P. 482–495.
35. Gerber, S.A. IFN-gamma mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor / S.A. Gerber, A.L. Sedlacek, K.R. Cron et al. // *Am. J. Pathol.* – 2013. – Vol. 182. – P. 2345–2354.
36. Golden, E.B. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death / E.B. Golden, D. Frances, I. Pellicciotta et al. // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 3. – e28518.
37. Golden, E.B. An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer / E.B. Golden, S. Demaria, P.B. Schiff et al. // *Cancer Immunol. Res*. – 2013. – Vol. 1. – P. 365–372.
38. Gorchs, L. Cancer-associated fibroblasts from lung tumors maintain their immunosuppressive abilities after high-dose irradiation / L. Gorchs, T. Hellevik, J.A. Bruun et al. // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 5. – P. 87.
39. Gough, M.J. Comparing equals when evaluating immunotherapy with different doses and fractions of radiation therapy / M.J. Gough, M.R. Crittenden, K.H. Young // *Immunotherapy*. – 2015. – Vol. 7. – N 8. – P. 847–849.
40. Gupta, A. Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation / A. Gupta, H.C. Probst, V. Vuong et al. // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189. – P. 558–566.

41. Hallahan, D. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium / D. Hallahan, J. Kuchibhotla, C. Wyble // *Cancer Res.* – 1996. – Vol. 56. – P. 5150–5155.
42. Hanna, G.G. Radiotherapy and immunotherapy combinations in non-small cell lung cancer: a promising future? / G.G. Hanna, T. Illidge // *Clin Oncol.* – 2016. – Vol. 28. – N 11. – P. 726–731.
43. Harding, S.M. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei / S.M. Harding, J.L. Benci, J. Irianto et al. // *Nature.* – 2017. – Vol. 548. – N 7668. – P. 466–470.
44. Heron, D.E. Stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiation therapy (SBRT) / D.E. Heron, M.S. Huq, J.M. Herman – New York. – Demos. – 2019. – 337 p.
45. Ivashkiv, L.B. Regulation of type I interferon responses / L.B. Ivashkiv, L.T. Donlin // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14. – N 1. – P. 36–49.
46. Kang, J.K. Stereotactic body radiation therapy for inoperable hepatocellular carcinoma as a local salvage treatment after incomplete transarterial chemoembolization / J.K. Kang, M.S. Kim, C.K. Cho et al. // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118. – N 21. – P. 5424–5431.
47. Klug, F. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy / F. Klug, H. Prakash, P.E. Huber et al. // *Cancer Cell.* – 2013. – Vol. 24. – N 5. – P. 589–602.
48. Kono, H. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice / H. Kono, C.J. Chen, F. Ontiveros et al. // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120. – N 6. – P. 1939–1949.
49. Lee, M.T. Phase I study of individualized stereotactic body radiotherapy of liver metastases / M.T. Lee, J.J. Kim, R. Dinniwell et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – N 10. – P. 1585–1591.
50. Lee, Y. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment / Y. Lee, S.L. Auh, Y. Wang et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – N 3. – P. 589–595.

51. Lencioni, R. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma / R. Lencioni, J.M. Llovet // *Semin. Liver Dis.* – 2010. – Vol. 30. – N 1. – P. 52–60.
52. Liu, X. Local and abscopal responses in advanced intrahepatic cholangiocarcinoma with low TMB, MSS, pMMR and negative PD-L1 expression following combined therapy of SBRT with PD-1 blockade / X. Liu, J. Yao, L. Song et al. // *J. Immunother. Cancer.* – 2019. – Vol. 7. – N 1. – P. 204.
53. Mackenzie, K.J. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity / K.J. Mackenzie, P. Carroll, C.A. Martin et al. // *Nature.* – 2017. – Vol. 548. – N 7668. – P. 461–465.
54. Mahadevan, A. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for liver metastasis – clinical outcomes from the international multi-institutional RSSearch® Patient Registry / A. Mahadevan, O. Blanck, R. Lanciano et al. // *Radiation Oncology.* – 2018. – Vol. 13. – N 1. – P. 26.
55. Manjili, M.H. Immunotherapy of cancer using heat shock proteins / M.H. Manjili, X.Y. Wang, J. Park et al. // *Front Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 43–52.
56. Marconi, R A meta-analysis of the abscopal effect in preclinical models: Is the biologically effective dose a relevant physical trigger? / R. Marconi, S. Strolin, G. Bossi et al. // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12. – N 2. – P. 1–16.
57. Matsumura, S. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells / S. Matsumura, B. Wang, N. Kawashima et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 3099-3107.
58. Matsumura, S. Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation / S. Matsumura, S. Demaria // *Radiat. Res.* – 2010. – Vol. 173. – N 4. – P. 418–425.
59. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family / P. Matzinger // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 991–1045.
60. Ministro, A. Low-dose ionizing radiation induces therapeutic neovascularization in a pre-clinical model of hindlimb ischemia / A. Ministro, P. de Oliveira, R.J. Nunes et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2017. – Vol. 113. – N 7. – P. 783–794.

61. Minn, A.J. Combination cancer therapies with immune checkpoint blockade: convergence on interferon signaling / A.J. Minn, E.J. Wherry // *Cell*. – 2016. – Vol. 165. – N 2. – P. 272–275.
62. Minn, A.J. Interferons and the immunogenic effects of cancer therapy / A.J. Minn // *Trends Immunol.* – 2015. – Vol. 36. – N 11. – P. 725–737.
63. Mole, R.H. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? / R.H. Mole // *Br. J. Radiol.* – 1953. – Vol. 26. – P. 234–241.
64. Nabet, B.Y. Exosome RNA unshielding couples stromal activation to pattern recognition receptor signaling in cancer / B.Y. Nabet, Y. Qiu, J.E. Shabason et al. // *Cell*. – 2017. – Vol. 170. – N 2. – P. 352–366.e13.
65. Nemenyi, P. Distribution-free Multiple Comparisons: Ph.D. thesis / P. Nemenyi. – Princeton University, 1963. – 254 p.
66. Ngwa, W. Using immunotherapy to boost the abscopal effect / W. Ngwa, O.C. Irabor, J.D. Schoenfeld et al. // *Nat. Rev. Cancer*. – 2018. – Vol. 18. – N 5. – P. 313–322.
67. Obeid, M. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death / M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli et al. // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13. – N 1. – P. 54–61.
68. Okwan-Duodu, D. Role of radiation therapy as immune activator in the era of modern immunotherapy for metastatic malignant melanoma / D. Okwan-Duodu, B.P. Pollack, D. Lawson et al. // *Am. J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 38. – P. 119–125.
69. Osmundson, E.C. Predictors of toxicity associated with stereotactic body radiation therapy to the central hepatobiliary tract / E.C. Osmundson, Y. Wu, G. Luxton et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2015. – Vol. 9. – N 5. – P. 986–994.
70. Park, M.J. Stereotactic body radiotherapy-induced arterial hypervascularity of nontumorous hepatic parenchyma in patients with hepatocellular carcinoma: potential pitfalls in tumor response evaluation on multiphase computed tomography / M.J. Park, S.Y. Kim, S.M. Yoon et al. // *PloS One*. – 2014. – Vol. 9. – N 2. – e90327.
71. Peulen, H. Toxicity after reirradiation of pulmonary tumors with stereotactic body radiotherapy / H. Peulen, K. Karlsson, K. Lindberg et al. // *Radiother. Oncol.* – 2011. – Vol. 101. – N 2. – P. 260–266.

72. Pollom, E.L. Normal tissue constraints for abdominal and thoracic SBRT / E.L. Pollom, A.L. Chin, M. Diehn et al. // *Semin. Radiat. Oncol.* – 2017. – Vol. 27. – N 3. – P. 197 – 208.
73. Postow, M.A. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma / M.A. Postow, M.K. Callahan, C.A. Barker et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366. – P. 925–931.
74. Potiron, V.A. Improved functionality of the vasculature during conventionally fractionated radiation therapy of prostate cancer / V.A. Potiron, R. Abderrahmani, K. Clément-Colmou et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – N 12. – e84076.
75. Qian, Y. Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) / Y. Qian, J.P. Weiner, E.J. Moding et al. – Springer Publishing Company. – 2019. – 351 p.
76. Reading, J.L. Too much of a good thing? Chronic IFN fuels resistance to cancer immunotherapy / J.L. Reading, S.A. Quezada // *Immunity.* – 2016. – Vol. 45. – N 6. – P. 1181–1183.
77. Redmond, K.J. A multinational report of technical factors on stereotactic body radiotherapy for oligometastases / K.J. Redmond, S.S. Lo, R. Dagan et al. // *Future Oncol.* – 2017. – Vol. 13. – N 12. – P. 1081–1089.
78. Reissfelder, C. A randomized controlled trial to investigate the influence of low dose radiotherapy on immune stimulatory effects in liver metastases of colorectal cancer / C. Reissfelder, C. Timke, H. Schmitz-Winnenthal et al. // *BMC Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 419.
79. Reits, E.A. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy / E.A. Reits, J.W. Hodge, C.A. Herberts et al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – N 5. – P. 1259–1271.
80. Reynders, K. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant / K. Reynders, T. Illidge, S. Siva et al. // *Cancer Treat. Rev.* – 2015. – Vol. 41. – P. 503–510.

81. Rusthoven, K.E. Multi-institutional phase I/II trial of stereotactic body radiation therapy for liver metastases / K.E. Rusthoven, B.D. Kavanagh, H. Cardenes et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1572–1578.
82. Sanda, M.G. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer / M.G. Sanda, N.P. Restifo, J.C. Walsh et al. // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 1995. – Vol. 87. – N 4. – P. 280–285.
83. Sato, H. An abscopal effect in a case of concomitant treatment of locally and peritoneally recurrent gastric cancer using adoptive T-cell immunotherapy and radiotherapy / H. Sato, Y. Suzuki, Y. Yoshimoto et al. // *Clin. Case Rep.* – 2017. – Vol. 5. – P. 380-384.
84. Scorsetti, M. Is stereotactic body radiation therapy an attractive option for unresectable liver metastasis? A preliminary report from a phase II trial / M. Scorsetti, S. Arcangelli, A. Tozzi et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2013. – Vol. 86. – P. 336–342.
85. Seung, S.K. Phase 1 study of stereotactic body radiotherapy and interleukin-2-tumor and immunological responses / S.K. Seung, B.D. Curti, M. Crittenden et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 4. – N 137. – 137ra74.
86. Sharabi, A. Exceptional response to nivolumab and stereotactic body radiation therapy (SBRT) in neuroendocrine cervical carcinoma with high tumor mutational burden: management considerations from the Center For Personalized Cancer Therapy at UC San Diego Moores Cancer Center / A. Sharabi, S.S. Kim, S. Kato et al. // *Oncologist.* – 2017. – Vol. 22. – P. 631–637.
87. Sharabi, A.B. Stereotactic radiation therapy augments antigen-specific PD-1-mediated antitumor immune responses via cross-presentation of tumor antigen / A.B. Sharabi, C.J. Nirschl, C.M. Kochel et al. // *Cancer Immunol. Res.* – 2015. – Vol. 3. – P. 345–355.
88. Skrepnik, T. Improved time to disease progression in the brain in patients with melanoma brain metastases treated with concurrent delivery of radiosurgery and ipilimumab / T. Skrepnik, S. Sundararajan, H. Cui et al. // *OncoImmunology.* – 2017. – Vol. 6. – N 3. – e1283461.

89. Spranger, S. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses / S. Spranger, T.F. Gajewski // *Nat. Rev. Cancer.* – 2018. – Vol. 18. – N 3. – P. 139–147.
90. Srivastava, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses / P. Srivastava // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 395–425.
91. Stubblefield, M.D. *Cancer Rehabilitation: Principles and Practice* / M.D. Stubblefield, M. O'Dell – New York, Demos Medical Publishing. – 2009. – 1130 p.
92. Tang, C. Ipilimumab with stereotactic ablative radiation therapy: phase I results and immunologic correlates from peripheral T cells / C. Tang, J.W. Welsh, P. de Groot et al. // *Clin. Cancer. Res.* – 2017. – Vol. 23. – P. 1388–1396.
93. Teng, M.W. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1 / M.W. Teng, S.F. Ngiew, A. Ribas et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. – N 11. – P. 2139–2145.
94. Theelen, W. Randomized phase II study of pembrolizumab after stereotactic body radiotherapy (SBRT) versus pembrolizumab alone in patients with advanced non-small cell lung cancer: the PEMBRO-RT study / W. Theelen, H. Peulen, F. Lalezari et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 36. – P. 9023.
95. Theurich, S. Local tumor treatment in combination with systemic ipilimumab immunotherapy prolongs overall survival in patients with advanced malignant melanoma / S. Theurich, S.I. Rothschild, M. Hoffmann et al. // *Cancer Immunol. Res.* – 2016. – Vol. 4. – N 9. – P. 744–754.
96. Toesca, A. Central liver toxicity after SBRT: an expanded analysis and predictive nomogram / A. Toesca, E.C. Osmundson, R.V. Eyben et al. // *Radiother. Oncol.* – 2017. – Vol. 22. – N 1. – P. 130–136.
97. Trifiletti, D.M. *Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy. A Comprehensive Guide* / D.M. Trifiletti, S.T. Chao, A. Sahgal et al. – Springer Nature Switzerland. – 2019. – 435 p.
98. Trujillo, J.A. T cell-inflamed versus non-T cell-inflamed tumors: a conceptual framework for cancer immunotherapy drug development and combination therapy

- selection / J.A. Trujillo, R.F. Sweis, R. Bao et al. // *Cancer Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 6. – P. 990–1000.
99. Tsui, J.M. Abscopal effect in a stage IV melanoma patient who progressed on pembrolizumab / J.M. Tsui, C. Mihalciou, F.L. Cury // *Cureus.* – 2018. – Vol. 10. – e2238.
100. Turajlic, S. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis / S. Turajlic, K. Litchfield, H. Xu et al. // *Lancet Oncol.* – 2017. – Vol. 18. – N 8. – P. 1009–1021.
101. Udono, H. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity / H. Udono, P.K. Srivastava // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178. – N 4. – P. 1391–1396.
102. Urban, J.L. Tumor antigens / J.L. Urban, H. Schreiber // *Annu. Rev. Immunol.* – 1992. – Vol. 10. – P. 617–644.
103. Van deWalle, M. Abscopal effect in metastatic renal cell carcinoma / M. Van deWalle, J. Demol, L. Staelens et al. // *Acta. Clin. Belg.* – 2017. – Vol. 72. P. 245–249.
104. Vanpouille-Box, C. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity / C. Vanpouille-Box, A. Alard, M.J. Aryankalayil et al. // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8. – 15618.
105. Venkatesulu, B.P. A systematic review of the influence of radiation-induced lymphopenia on survival outcomes in solid tumors / B.P. Venkatesulu, S. Mallick, S.H. Lin et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2018. – Vol. 123. – P. 42–51.
106. Wild, A.T. Lymphocyte-sparing effect of stereotactic body radiation therapy in patients with unresectable pancreatic cancer / A.T. Wild, J.M. Herman, A.S. Dholakia et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2016. – Vol. 94. – N 3. – P. 571–579.
107. Xing, D. The abscopal effect of stereotactic radiotherapy and immunotherapy: fool's gold or el dorado? / D. Xing, S. Siva, G.G. Hanna // *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*. – 2019. – Vol. 31. – N 7. – P. 432–443.
108. Xu, M.M. Dendritic cells but not macrophages sense tumor mitochondrial DNA for cross-priming through signal regulatory protein alpha signaling / M.M. Xu, Y. Pu, D. Han et al. // *Immunity.* – 2017. – Vol. 47. – N 2. – P. 363–373.

109. Yoon, S.S. Surgical placement of biologic mesh spacers to displace bowel away from unresectable liver tumors followed by delivery of dose-intense radiation therapy / S.S. Yoon, T.A. Aloia, A.B. Haynes et al. // *Pract. Radiat. Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – N 3. – P.167–173.
110. Zhang, H. An in situ autologous tumor vaccination with combined radiation therapy and TLR9 agonist therapy / H. Zhang, L. Liu, D. Yu et al. // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7. – N 5. – e38111.
111. Zhang, J. Stereotactic ablative radiotherapy in treatment of early-stage non-small cell lung cancer: Unsolved questions and frontiers ahead / J. Zhang, L. Kong, Q. Jiao et al. // *Cancer Lett.* – 2017. – Vol. 401. – P. 46–52.
112. Zhang, J. Which is the optimal biologically effective dose of stereotactic body radiotherapy for Stage I non-small-cell lung cancer? A meta-analysis / J. Zhang, F. Yang, B. Li et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2011. – Vol. 81. – N 4. – P. 305–316.
113. Zhang, Z. Mitochondrial DNA-LL-37 complex promotes atherosclerosis by escaping from autophagic recognition / Z. Zhang, P. Meng, Y. Han et al. // *Immunity.* – 2015. – Vol. 43. – N 6. – P. 1137–1147.
114. Zheng, Y. Post-treatment immune parameters predict cancer control and pneumonitis in stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic ablative radiotherapy / Y. Zheng, A. Shi, W. Wang et al. // *Clinical Lung Cancer.* – 2018. – Vol. 19. – N 4. – e399–e404.
115. Zimmermann, F.B. Stereotactic hypofractionated radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer / F.B. Zimmermann, H. Geinitz, S. Schill et al. // *Lung Cancer.* – 2005. – Vol. 48. – N 1. – P. 7–14.