

© Коллектив авторов, 2014  
УДК 616-006.6-097-097-08:615.849

**А. К. Носов**  
канд. мед. наук

**И. А. Балдуева**  
докт. мед. наук

**Е. Е. Самарцева**

**С. Б. Петров**  
докт. мед. наук

НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург

## Иммунный ответ при радиочастотной абляции опухолей почек

Произведена количественная оценка состава иммунокомпетентных клеток в процессе лечения и наблюдения у 29 пациентов с почечно-клеточной карциномой, при этом 20 пациентам была выполнена лапароскопическая радиочастотная абляция (РЧА), 9 — лапароскопическая резекция почки. У больных, которым была выполнена РЧА, выявлено повышение отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, в то время как у пациентов, которым была выполнена резекция почки, подобные изменения отсутствуют, что может свидетельствовать о формировании протективного иммунного ответа при РЧА.

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

Проблема рака почки в нашей стране остается одной из важнейших как в науке, так и в практическом здравоохранении. Почечно-клеточные карциномы составляют примерно 3 % от всех онкологических заболеваний у взрослых. Совершенствование диагностических методик (УЗИ, КТ, МРТ) привели к тому, что все чаще диагностируют опухоли почек на стадии T1a (менее 4 см в диаметре). При этом резекция почки стала наиболее частым оперативным вмешательством.

В то же самое время, выявление случаев почечно-клеточного рака (ПКР) на ранних стадиях привело к значительному повышению интереса к малоинвазивным методикам, таким как радиочастотная абляция (РЧА), криоабляция, микроволновая абляция и др. Среди последних одной из наиболее эффективных и перспективных методик считается РЧА, которая может быть использована как альтернатива резекции почки при опухолях, не превышающих в диаметре 4 см, особенно у пациентов с единственной почкой, билатеральными опухолями или с серьезными противопоказаниями к оперативным вмешательствам. Важно отметить, что РЧА —

относительно безопасная методика с редкими, обычно незначительными осложнениями [1–5].

В основе методики лежит введение иглообразного или зонтичного электрода в опухолевую ткань с последующим формированием зоны термического некроза за счет электрического тока частотой 400–500 кГц. Точное расположение электрода достигается путем использования навигационных систем (УЗИ или КТ) и/или лапароскопически. Температура вокруг зонда превышает 100°C. При температуре 42–44°C происходит тромбоз сосудов микроциркуляторного русла, при 50°C разрушаются клеточные мембраны, начинается денатурация белка и индуцируется коагуляционный некроз [1, 2, 6].

Большинство публикаций по эффективности РЧА ограничиваются оценкой зоны некроза по данным КТ или МРТ. Однако следует отметить, что в последнее время стали появляться данные, согласно которым РЧА, помимо непосредственного термического воздействия на опухолевые клетки, может служить триггером формирования протективного иммунного ответа. Так, например, М. Matuszewski с коллегами продемонстрировали значительные изменения в соотношении периферических иммунных клеток у пациентов с ПКР после РЧА [7]. Кроме того, в биоптатах печени, полученных после термоабляции, были обнаружены скопления макрофагов, дендритных клеток и T-лимфоцитов [8].

Екатерина Евгеньевна Самарцева  
e-mail: samarceva83@bk.ru

Таким образом, вероятно, локальное разрушение опухолевой ткани приводит к существенному выбросу антигенов, которые становятся доступными для клеток иммунной системы (макрофагов, дендритных клеток). Кроме того, презентация антигенов, в ходе которой макрофаги и дендритные клетки стимулируют иммунный ответ путем представления захваченного ими антигена *T*-лимфоцитам, под действием высокой температуры может усиливаться и приводить к активации *T*-лимфоцитов периферической крови, что приводит к специфической противоопухолевой активности, напоминающей эффект адьювантной иммунотерапии [6, 8–14].

Хорошо известна роль клеточного иммунитета в ответ на деструкцию опухолевой ткани. *IL-2* и *TNF-α* активируют иммунную систему и вызывают противоопухолевый ответ. В настоящее время это имеет место у пациентов с метастатическим раком почки [15]. Однако поиск новых механизмов, вызывающих иммунный ответ, продолжается. Участие РЧА в индукции специфического противоопухолевого ответа у пациентов с опухолью печени в настоящее время далеко до полного понимания, о пациентах с ПКР в литературе вообще практически отсутствуют какие-либо данные на этот счет. Изучение противоопухолевого ответа у пациентов с ПКР после РЧА может привести к лучшему пониманию эффектов термоабляции и улучшить ее эффективность. Кроме того, обнаружение новых механизмов активации иммунной системы может привести к возможности использовать РЧА вместе с иммунотерапией в качестве нового комбинированного лечения при ПКР.

Цель исследования — оценка влияния лапароскопической РЧА на субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с ПКР в процессе лечения и наблюдения и сравнение данных с результатами, полученными при выполнении лапароскопической резекции почки. Оценивали следующие показатели периферической крови: *T*-лимфоциты (*CD3+CD19-*), *B*-лимфоциты (*CD3-CD19+*), *T*-хелперы (*CD3+CD4+*), активированные *T*-хелперы (*CD3+CD4+HLA-DR+*), цитотоксические *T*-лимфоциты (*CD3+CD8+*), активированные цитотоксические *T*-лимфоциты (*CD3+CD8+HLA-DR+*), натуральные киллеры, *NK*-клетки (*CD3-CD16+56+*), *T*-регуляторные лимфоциты (*CD4+CD25brightCD127low*) и иммунорегуляторный индекс (*CD4+/CD8+*), снижение которого свидетельствует об иммунодефицитном состоянии.

## Материалы и методы

В настоящем исследовании на базе отделения урологии НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова оценивали изменения иммунного статуса у пациентов с ПКР после РЧА и резекции почки, выполненной лапароскопическим доступом. В исследовании приняли участие 29 больных (16 мужчин и 13 женщин), средний возраст — 60,4±8,5 года. Критериями исключения были анамнестические сведения и данные лабораторных исследований, свидетельствующие об имеющейся гематологической патологии. Все пациенты имели опухоль стадии *T1aN0M0* со средним размером 2±0,9 см. Диагностику во всех случаях производили методом КТ с внутривенным контрастированием и УЗИ. 1-ю группу составили 20 пациентов, которым была выполнена лапароскопическая РЧА. У 5 больных опухоль имела полностью интраренальное расположение, что требовало интраоперационного УЗИ-наведения. У 4 пациентов образование располагалось в единственной почке. Во 2-ю группу вошли 9 пациентов, которым выполняли лапароскопическую резекцию почки. Подсчет иммунокомпетентных клеток ни у одного из пациентов 2-й группы не выявил каких-либо достоверно значимых изменений как по сравнению с исходными значениями, так и с нормой за весь период исследования, поэтому набор пациентов во 2-ю группу был прекращен. Средний размер опухоли у пациентов 2-й группы составил 3±0,7 см. Всем больным за 1 сут до операции, а также на 1-е, 7-е и 30-е сутки после оперативного вмешательства проводили забор крови и выполняли подсчет иммунокомпетентных клеток методом многоцветной проточной цитофлуориметрии на приборе «BD FACS Calibur» (США). Оценивали изменения как *T*-, так и *B*-клеточного иммунитета, полученные параметры сравнивали с нормой и исходным значением.

Операцию проводили лапароскопически чрезбрюшинным доступом под общей анестезией в положении больного на здоровом боку. После мобилизации почки и визуализации опухоли выполняли трепанобиопсию опухоли, у пациентов с интраренальным расположением образования биопсию производили под контролем УЗИ. Непосредственно после биопсии выполняли процедуру РЧА. В своей работе мы использовали аппарат «RITA 1500x» («AngioDynamics», U.S.) с зонтичным зондом серии «star burst», который раскрывается внутри опухоли после позиционирования электрода. Можно регулировать степень раскрытия «зонтика» внутри ткани

от 1 до 5 см. Температурный контроль обеспечивается термодатчиками, встроенными в иглы зонда. В ходе нашей работы средняя температура во время абляции составляла  $105\pm 4^\circ\text{C}$ .

Стоит учитывать, что в ходе РЧА происходят внутритканевые изменения, которые отражаются на визуализации опухоли под УЗИ при интратанальном ее расположении. Среднее время процедуры РЧА составляло  $25\pm 6$  мин (каждый сеанс РЧА по 10 мин, в среднем проводили по 2–3 сеанса в зависимости от размеров опухоли). Среднее время операции —  $105\pm 14$  мин. Длительность госпитализации составила  $6\pm 1$  день. В послеоперационном периоде всем пациентам проводили УЗИ и КТ-диагностику для оценки зоны абляции и выявления послеоперационных осложнений. Следует отметить, что ни у одного из пациентов не было выявлено осложнений, превышающих grade I по шкале осложнений Clavien–Dindo. Все пациенты в настоящее время подлежат тщательному наблюдению для выявления рецидивов.

Резекцию почки осуществляли также лапароскопическим чрезбрюшинным доступом, она не отличалась от стандартной техники выполнения данной операции.

### Результаты и обсуждение

Исследование показателей иммунного статуса, произведенное за 1 сут до РЧА, не выяви-

ло значимых отклонений от референсных значений ( $p>0,05$ ). В послеоперационном периоде ряд показателей за весь период наблюдения достоверно ( $p>0,05$ ) не изменился ( $CD3-CD19+$  (В-лимфоциты),  $CD3-CD16+56+$  (NK-клетки),  $CD4+CD25^{\text{bright}}CD127^{\text{low}}$  (Т-регуляторные лимфоциты)). В то же самое время, наблюдали статистически значимое ( $p<0,05$ ) увеличение количества  $CD3+CD19-$  (Т-лимфоцитов), содержание которых в периферической крови к 30-м суткам наблюдения возросло от  $1,18\pm 0,3\cdot 10^9/\text{л}$  до  $1,9\pm 0,3\cdot 10^9/\text{л}$ , главным образом за счет  $CD3+CD4+$  (Т-хелперов),  $CD3+CD4+HLA-DR+$  (активированных Т-хелперов) и  $CD3+CD8+HLA-DR+$  (активированных цитотоксических Т-лимфоцитов), что, в конечном итоге, привело к достоверному ( $p<0,05$ ) увеличению иммунорегуляторного индекса с  $1,66\pm 0,6\cdot 10^9/\text{л}$  до  $2,95\pm 0,15\cdot 10^9/\text{л}$  на 30-е сутки после РЧА (таблица). Анализ параметров иммунного статуса зарегистрированных у пациентов 2-й группы, не выявил каких-либо достоверно значимых изменений как по сравнению с исходными значениями, так и с нормой за весь период исследования.

В последние годы РЧА стала популярным методом лечения опухолей. Чаще всего ее используют при лечении неоперабельных первичных и метастатических опухолей печени, однако РЧА стали также широко применять в онкоурологии для лечения локализованных форм рака почки

**Изменения субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток у пациентов, которым выполняли РЧА, \* $p<0,05$**

Имунокомпетентные клетки	До операции	1-е сутки	7-е сутки	Через 1 мес	Норма (референсные значения), $\cdot 10^9/\text{л}$
$CD3+CD19-$ (Т-лимфоциты)	$1,18\pm 0,3$	$1,03\pm 0,01$	$1,35\pm 0,1$	$1,9\pm 0,3^*$	1–1,6
$CD3-CD19+$ (В-лимфоциты)	$0,22\pm 0,2$	$0,15\pm 0,03$	$0,19\pm 0,02$	$0,2\pm 0,05$	0,04–0,4
$CD3+CD4+$ (Т-хелперы)	$0,8\pm 0,3$	$0,65\pm 0,2$	$0,88\pm 0,3$	$1,5\pm 0,2^*$	0,6–1,2
$CD3+CD4+HLA-DR+$ (активированные Т-хелперы)	$0,4\pm 0,1$	$0,4\pm 0,1$	$0,5\pm 0,08$	$0,7\pm 0,06^*$	—
$CD3+CD8+$ (цитотоксические Т-лимфоциты)	$0,46\pm 0,05$	$0,38\pm 0,04$	$0,43\pm 0,1$	$0,6\pm 0,1$	0,3–1,0
$CD3+CD8+HLA-DR+$ (активир. цитотоксические Т-лимфоциты)	$0,08\pm 0,02$	$0,04\pm 0,01$	$0,06\pm 0,02$	$0,16\pm 0,02^*$	—
$CD3-CD16+56+$ (NK-клетки)	$0,34\pm 0,09$	$0,19\pm 0,04$	$0,29\pm 0,1$	$0,33\pm 0,09$	0,03–0,5
$CD4+CD25^{\text{bright}}CD127^{\text{low}}$ (Т-регуляторные лимфоциты)	$0,06\pm 0,02$	$0,04\pm 0,01$	$0,07\pm 0,02$	$0,06\pm 0,01$	0,009–0,078
$CD4+/CD8+$ (иммунорегуляторный индекс)	$1,66\pm 0,6$	$2,31\pm 0,5$	$2,42\pm 0,8$	$2,95\pm 0,15^*$	1,5–2,0

небольшого размера. Большинство исследований по изучению термоабляции в онкологии сфокусировано на оценке деструкции тканей и оптимизации физических механизмов процесса, в то время как потенциальные механизмы иммунного ответа при РЧА еще далеки до понимания [1–6, 15, 16].

Первые шаги к изучению этого механизма были предприняты А. Zerbinì и коллегами в 2006 г., которые протестировали группу пациентов с неоперабельной первичной опухолью печени после РЧА. Они установили, что повышенная активация *T*-лимфоцитов периферической крови была у пациентов после РЧА после контакта с аутологичным лизатом опухолевых клеток (у 7 пациентов из 20 — до РЧА и у 16 из 20 — через 4 нед после РЧА). Кроме того, было показано, что иммунный ответ в большей степени обусловлен активацией клеток *CD4+* (*T*-хелперов) и *CD8+* (цитотоксических *T*-лимфоцитов) у отдельных пациентов. С другой стороны, единственным достоверно значимым было увеличение *NK*-клеток, в то время как другие субпопуляции лимфоцитов остались неизменными. То есть, для некоторых пациентов РЧА, возможно, является триггером формирования специфической «иммунной памяти», которая, в свою очередь, имитирует эффект адъювантной иммунотерапии. Авторы не выявили корреляции между повышенной иммунной реакцией и отсутствием рецидивов [9].

J. Hansler с коллегами в 2006 г. представили аналогичное исследование, в которое, наряду с пациентами с первичной гепатоцеллюлярной карциномой, были также включены пациенты с метастазами в печень колоректального рака. В обеих группах было выявлено увеличение в 5 раз *CD4+* и *CD8+* *T*-лимфоцитов [10].

M. Matuszewski с коллегами в 2011 г. опубликовали работу, в которой оценивали состав иммунокомпетентных клеток у 6 пациентов с ПКР до РЧА и в разное время после нее [7]. Согласно представленным данным, наиболее выраженные изменения имели место через 2 нед после РЧА. У одного пациента наблюдали увеличение как *CD4+*, так и *CD8+* *T*-лимфоцитов. У 5 из 6 пациентов в течение всего периода наблюдения увеличивалась концентрация активированных (*DR+*) клеток, причем максимальная концентрация была на 2-й неделе наблюдения. Популяция *CD56+CD16+* клеток была снижена в большинстве случаев.

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

Факт индукции иммунного ответа интересен сам по себе, однако механизмы, ведущие к возникновению этого ответа, выглядят еще более интригующими. В целом, анализ литературных данных дает основание полагать, что во время термоабляции происходит значительное высвобождение опухолевых антигенов. Термически поврежденные и денатурированные антигены захватываются макрофагами и дендритными клетками и презентуются *CD4+* *T*-лимфоцитам. Это, возможно, приводит к преодолению «ускользания» опухолевых клеток от надзора иммунной системы, активации *CD4+* лимфоцитов и формированию специфического противоопухолевого ответа [8–10, 13, 14]. Кроме того, вероятно, белки теплового шока (*HSP*) играют важную роль в индукции иммунного ответа у пациентов после РЧА. Физиологически *HSP* участвуют в регуляции трансмембранного транспорта различных белков и их хранении внутри клеток. Некоторые авторы [17, 18] продемонстрировали увеличение концентрации *HSP70* и *HSP90* в тех областях печени, которые были подвергнуты радиочастотной абляции. Также было продемонстрировано, что *HSP* активируют дендритные клетки, цитотоксические *T*-лимфоциты и *NK*-клетки [19].

### Заключение

Выявлено, что, помимо непосредственного термического воздействия на опухолевые клетки, радиочастотная абляция может служить триггером формирования протективного иммунного ответа. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования роли и значения данной методики в формировании специфического противоопухолевого иммунитета.

## Литература

1. Zlotta A. R., Wildschutz T., Raviv G. et al. Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer: Ex vivo and in vivo experience // *J. Endourol.* 1997. Vol. 11. P. 251–258.
2. McGovern F. J., Wood B. J., Goldberg S. N. et al. Radiofrequency ablation of renal cell carcinoma via image guided needle electrodes // *J. Urol.* 1999. Vol. 161. P. 599–600.
3. Mahnken A. H., Rohde D., Brkovic D. et al. Percutaneous radiofrequency ablation of renal cell carcinoma: Preliminary results // *Acta Radiol.* 2005. Vol. 46. P. 208–214.
4. Veltri A., Calvo A., Tosetti I. et al. Experiences in US-guided percutaneous radiofrequency ablation of 44 renal tumors in 31 patients: Analysis of predictors for complications and technical success // *Cardiovasc. Intervent Radiol.* 2006. Vol. 29. P. 811–818.
5. Mouraviev V., Joniau S., Van Poppel H. et al. Current status of minimally invasive ablative techniques in the treatment of small renal tumours // *Europ. Urol.* 2007. Vol. 51. P. 328–336.
6. Nikfarjam M., Muralidharan V., Christophi C. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors // *J. Surg. Res.* 2005. Vol. 127. P. 208–223.
7. Matuszewski M., Michajłowski J., Michajłowski I., et al. Impact of radiofrequency ablation on PBMC subpopulation in patients with renal cell carcinoma // *Urol. Oncol.* 2011. Vol. 29. P. 724–730.
8. Wisniewski T.T., Hansler J., Neureiter D. et al. Activation of tumorspecific T lymphocytes by radio-frequency ablation of the VX2 hepatoma in rabbits // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63. P. 496–500.
9. Zerbini A., Pilli M., Penna A. et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66. P. 1139–1146.
10. Hansler J., Wisniewski T. T., Schuppan D. et al. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases // *Wld J. Gastroenterol.* 2006. Vol. 12. P. 3716–3721.
11. Ali M.Y., Grimm C.F., Ritter M. et al. Activation of dendritic cells by local ablation of hepatocellular carcinoma // *J. Hepatol.* 2005. Vol. 43. P. 817–822.
12. Napoletano C., Taurino F., Biffoni M. et al. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune response in metastatic liver patients // *Int. J. Oncol.* 2008. Vol. 32. P. 481–490.
13. Rughetti A., Rahimi H., Rossi P. et al. Modulation of blood circulating immune cells by radiofrequency tumor ablation // *J. exp. Clin. Cancer Res.* 2003. Vol. 22. P. 247–250.
14. Yu H. C., Moon J. I., Jin Z. W., et al. Effect of radiofrequency ablation of the liver on cell mediated immunity in rats // *Wld J. Surg.* 2005. Vol. 29. P. 739–743.
15. De Reijke T. M., Bellmunt J., Van Poppel H. et al. EORTC-GU group expert opinion on metastatic renal cancer // *Europ. J. Cancer.* 2009. Vol. 45. P. 765–773.
16. Den Brok M. H., Suttmuller R. P., Van der Voort R. et al. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64. P. 4024–4029.
17. Rai R., Richardson C., Flecknell P. et al. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA) // *J. surg. Res.* 2005. Vol. 129. P. 147–151.
18. Schueller G., Kettenbach J., Sedivy R. et al. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo // *Int. J. Oncol.* 2004. Vol. 24. P. 609–613.
19. Pilla L., Squarcina P., Coppa J. et al. Natural killer and NK-Like T-cell activation in colorectal carcinoma patients treated with autologous tumor-derived heat shock protein 96 // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 3942–3949.

A. K. Nosov, I. A. Baldueva, E. E. Samarceva, S. B. Petrov

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

### The immune response during radiofrequency ablation of kidney tumors

Quantifies the composition of immune cells in the process of treatment and follow 29 patients with renal cell carcinoma. 20 patients had underwent laparoscopic radiofrequency ablation (RFA), 9 — laparoscopic partial nephrectomy. It has been established that the group of patients who underwent RFA, found an increase in individual subpopulations of immunocompetent cells, whereas in patients who underwent partial nephrectomy such changes are absent. This may indicate the formation of a protective immune response in the RFA.

**Key words:** renal cell carcinoma, radiofrequency ablation, tumor antigens, lymphocytes activation, immunotherapy