

DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-2-31-42

## Ультразвуковая абляция опухоли: иммунные эффекты и перспективы интеграции в современные программы лечения генерализованного рака

Г.Н. Мачак

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н. Н. Приорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме:** Несмотря на революционные открытия последних лет в области молекулярной онкологии и иммунологии, выживаемость при генерализованных формах злокачественных новообразований не превышает 20–30%, поэтому поиск новых терапевтических подходов остается актуальной задачей. Дальнейший прогресс, в частности, связывают с повышением иммуногенности опухолей, индукцией воспалительного фенотипа и блокадой механизмов иммуносупрессии. Решению этих задач может способствовать ультразвуковая абляция (УЗА), которая занимает особое место среди аналогичных методик, поскольку вызывает быстрый иммунный ответ, обладает неинвазивностью и низкой локальной токсичностью, позволяет манипулировать параметрами физического воздействия, допускает многократное применение, относительно недорого и не требует длительной госпитализации. Помимо циторедукции и снижения системных иммуносупрессивных сигналов, УЗА создает в организме депо лизированных клеток и считается способом вакцинирования *in situ*. Постаблативная иммуногенная клеточная смерть стимулирует начальные фазы иммунного цикла и способствует генерации популяций CD4+ и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако инфильтрация зоны соникации и отдаленных метастазов активированными эффекторными клетками в короткие сроки приводит к запуску защитных механизмов со стороны опухоли, в частности экспрессии PD-1L, что не позволяет достичь стойких абскопальных эффектов и контроля заболевания. Поэтому сегодня УЗА чаще рассматривается как один из элементов комбинированных стратегий, влияющих на различные фазы иммунного цикла (агонисты TLR, GM-CSF, цитокины, блокаторы CTLA-4, PD-1/PD-1L, агонисты стимуляторных контрольных точек, адоптивная терапия и др.) Доклинические исследования показали повышение процента абскопальных эффектов и улучшение выживаемости при сочетании УЗА с иммунотерапией, а также предпосылки для снижения доз ингибиторов контрольных точек и частоты нежелательных явлений. В случае прогрессирования на фоне иммунотерапии УЗА может быть способом повторной антигенной стимуляции и расширения клонального репертуара эффекторных клеток. Экспериментальные данные легли в основу дизайна ряда текущих клинических исследований в РФ и за рубежом, которые в ближайшей перспективе должны уточнить ряд методологических аспектов, а также показать роль и место УЗА в комбинированном лечении пациентов с диссеминированным раком.

**Ключевые слова:** злокачественные новообразования, метастазы, ультразвуковая абляция, иммунотерапия, абскопальный эффект

### Введение

Несмотря на недавние революционные открытия в области молекулярной онкологии и иммунологии, выживаемость при генерализованных формах рака в целом продолжает оставаться низкой как в России, так и за рубежом [1–3]. Поиск новых терапевтических подходов по-прежнему актуален, и одним из наиболее активно развивающихся направлений в последние годы по праву считается иммуноонкология. Она получила мощный импульс после открытия ряда механизмов ускользания злокачественных новообразований от иммунного ответа, когда выяснилось, что для своей клональной экспансии опухоли могут использовать локальные и системные иммуносупрессивные механизмы, предотвращающие в обычных условиях ауто-иммунные реакции [4]. На этой теоретической базе был создан новый класс препаратов – ингибиторы контрольных точек (ИКТ), в частности CTLA-4 и PD1/PD-1L, которые показали обнадеживающие результаты при лечении

некоторых фатальных до недавних пор злокачественных опухолей [5–10].

Одним из итогов произошедшей в терапии рака революции стал пересмотр существующих парадигм, смещающий акцент в сторону коррекции нарушений функционирования иммунной системы, восстановления ее способности распознавать и элиминировать трансформированные клетки. Это подход отличается от традиционной концепции лечения рака, которая нацелена на прямое уничтожение опухолевых клеток цитостатиками, таргетными препаратами, ионизирующим излучением или аблацией. Иммунотерапия обладает рядом преимуществ перед этими методами, в частности специфичностью, возможностью генерации поликлонального Т-клеточного ответа, преодолевающего резистентность опухолевых клеток, и развитием иммунологической памяти. Кроме этого, эффекты иммунотерапии более продолжительны и сохраняются в большинстве случаев после окончания лечения, чего не наблюдается при химиотерапии или таргетной терапии, к которым рано или поздно развивается резистентность.

Современная иммунотерапия позволяет контролировать диссеминированный процесс не более чем у 20–30% пациентов, в остальных же случаях опухоли изначально устойчивы к иммунотерапии или становятся таковыми в процессе лечения. В связи с этим сегодня большое внимание уделяется причинам, ограничивающим эффективность метода, и поиску путей их преодоления [4, 11, 12]. В этом контексте можно выделить несколько важных факторов:

- Низкая иммуногенность опухолей, которая может быть изначальной или появиться в процессе иммунного редактирования, придающего новообразованиям признаки толерантности и способность ускользать от иммунного ответа [4, 11, 12].
- Активное, генетически детерминированное противостояние врожденному или адаптивному иммунитету. Создание на уровне микроокружения опухоли щелочной, многокомпонентной защиты, в частности препятствующей инфильтрации и/или физическому контакту иммунных клеток с опухолевыми или приводящей к истощению эффекторных лимфоцитов [4, 11, 12]. На запущенных стадиях опухоль противопоставляет иммунитету и иммунотерапии максимально эффективную и часто непреодолимую систему обороны.
- Активация альтернативных механизмов подавления Т-лимфоцитов, например TIM-3, в ответ на блокаду PD-1/PD-1L [13].
- Отсутствие в течение многих лет концепции разнонаправленного и индивидуализированного влияния на фазы иммунного цикла. Вакцины, Т-клеточная терапия, цитокилотерапия и ИКТ в монорежиме влияют на отдельные звенья иммунной системы, что, как правило, малопродуктивно, особенно при диссеминации процесса [4, 11, 12].

В данном обзоре представлены основные тенденции в современной иммуноонкологии с акцентом на роль ультразвуковой абляции как способа повышения иммуногенности опухолей и составной части комбинированного лечения запущенных форм злокачественных новообразований.

### Пути повышения эффективности иммунотерапии при диссеминированных формах рака

Анализ литературы последних лет позволил выделить несколько направлений, которые потенциально могут привести к дальнейшему прогрессу в иммунотерапии генерализованных форм рака в условиях, когда расширение спектра активности ИКТ замедлилось, а их клиническая эффективность перестала существенно меняться. Эти направления можно обозначить следующим образом:

1. Достижение циторедуктивного эффекта, способствующего более успешной элиминации резидуальных проявлений заболевания.
2. Влияние на иммуногенность опухоли, индукция воспалительного фенотипа микроокружения, более восприимчивого к иммунотерапии ИКТ.
3. Выявление наиболее значимых механизмов иммуносупрессии на системном уровне, в микроокружении первичной опухоли и метастазах.
4. Разработка критериев мониторинга иммунного статуса и клинических проявлений в процессе иммунотерапии, раннее выявление резистентности и ее преодоление.
5. Разнонаправленное влияние на фазы иммунного цикла с целью генерации или восстановления эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

Одной из целей современной иммунотерапии при диссеминированном раке является индукция абскопального эффекта (АЭ) (ab – отдаленный, scopus – цель), который под разными названиями известен уже более ста лет [14, 15]. Напоминающая спонтанную регрессию, этот феномен заключается в иммунологически опосредованной регрессии отдаленных метастазов после физического воздействия на ограниченное количество опухолевых узлов. Их облучение или абляция, помимо циторедукции и подавления иммуносупрессивных сигналов, приводит к иммуногенной клеточной смерти (ИКС). Она характеризуется выбросом антигенов/неоантигенов, воспалительных цитокинов, хемокинов и аларминов или сигналов опасности (белки теплового шока, амфотерин, АТФ, IL-1, белки S-100 и др.), необходимых для последующей активации и созревания антиген-презентирующих клеток (АПК) [16]. После примирования (англ. priming), активации и пролиферации CD4+ и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, их миграции и инфильтрации отдаленных метастатических очагов наступает специфическое уничтожение опухолевых клеток с сохранением иммунологической памяти.

До недавнего времени редкие АЭ описывались преимущественно после паллиативного облучения отдельных метастазов [15]. Дополнение локальных методов физического воздействия возможностями современной иммунотерапии привело к повышению частоты АЭ как в экспериментальных моделях, так и в условиях клиники [17–20]. С учетом новых сведений об иммунологических механизмах АЭ сегодня есть все основания полагать, что этот феномен может перейти из категории редких и плохо объяснимых событий в разряд научно обоснованных и создаваемых в клинических условиях явлений. В этом контексте особое значение придается дальнейшему изучению путей усиления иммуногенности опухолей и преодолению механизмов иммуносупрессии на этапах иммунного цикла. Остановимся подробнее на некоторых аспектах данной проблемы.

Классическим методом индукции собственного противоопухолевого иммунитета является вакцинирование.

Контакт иммунной системы с различными опухоль-ассоциированными факторами способствует развитию специфического гуморального и клеточного иммунитета. Для стимуляции иммунного ответа традиционно используют аутологичные или аллогенные опухолевые клетки, дендритные клетки (ДК), активированные *ex vivo* в присутствии антигенов, опухолевые пептиды, белки семейства раково-тестикулярных антигенов (NY-ESO-1, MAGE-A3, PRAME, LAGE-1 и др.), фрагменты ДНК опухоли, РНК (dsRNA, mRNA), белки теплового шока (БТШ), ганглиозиды и др. В качестве адъювантов, активирующих АПК, применяются BCG+GM-CSF [21], Iscomatrix [22], OPT-821 [23], imiquimod/resiquimod [24], CpG+IL-2 [25], IFN- $\alpha$  [26] и др.

Среди факторов, ограничивающих развитие эффективного противоопухолевого иммунного ответа при вакцинации, ключевыми считаются низкая антигенность вакцинационного материала, узкий репертуар опухоль-ассоциированных факторов, присутствие недоступных для иммунной системы внутриклеточных антигенов, недостаточная активация ДК. В последние годы поиск решений ведется по нескольким направлениям, в частности разрабатываются персонифицированные вакцины, содержащие мутированные неоантигены, гиперэкспрессированные аутоантигены или ткане-специфичные белки [27]. Кроме этого изучаются новые источники иммуногенных белков [28].

Отдельным направлением является применение различных аблативных методик с целью так называемого вакцинирования *in situ*, т.е. создания в организме относительно длительно функционирующего депо антигенов и иммуногенных факторов. Для физического воздействия на опухоль и индукции ИКС используются следующие методы: лучевая терапия в аблативном режиме; гипертермические абляции – радиочастотная (РЧА), микроволновая (МВА), ультразвуковая (УЗА), лазерная; низкотемпературные – криоабляция (КА), фотодинамические эффекты, необратимая электропорация и др.

В этом ряду большой интерес представляет ультразвуковое воздействие на опухолевую ткань, которое в последние годы все чаще рассматривается как составная часть современных программ иммунотерапии и как потенциальный способ улучшения результатов лечения метастатического рака [20, 29, 30].

### Иммунные эффекты ультразвуковой абляции опухолей

УЗА, которая в классическом варианте подразумевает использование высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (англ. HIFU – high intensity focused ultrasound), воздействует на ткани непрерывными волнами, повышая локальную температуру до 60–100 °C [31]. Уже че-

рез несколько секунд в очаге соникации (ультразвукового воздействия) происходит денатурация белков, разрыв и слияние клеточных мембран, пикноз, гиперхроматизация, и в финале наступает коагуляционный некроз опухоли и ее сосудистой сети [32]. На периферии очага абляции (переходная зона) температура не достигает летальных значений, поэтому смерть клеток происходит путем апоптоза, пик которого приходится на второй час после процедуры [33]. Термическому воздействию сопутствует эффект кавитации, возникающий при взаимодействии акустического поля с газовыми тельцами, расположенными на субклеточном уровне, в органеллах и жидкостях. Во время разрушения пузырьков акустическое давление в очаге достигает нескольких тысяч паскаль. При более современных режимах УЗА – механической ультразвуковой абляции или гистотрипсии, когда волны высокой энергии имеют импульсный характер, наступает субклеточная фрагментация тканей без их прогревания [34, 35].

Важным результатом абляции является циторедуктивный эффект и уменьшение системных иммуносупрессивных сигналов со стороны опухоли. Кроме этого, абляция позволяет создать депо лизированных клеток *in situ*. Формирование опухолевого дебриса сопровождается ИКС, т.е. выбросом антигенов в микроокружение опухоли, их попаданием в локально-регионарную лимфатическую систему, высвобождением воспалительных цитокинов, аларминов, притягивающих и активирующих АПК (макрофаги и ДК). Также разрушаются стромальные элементы микроокружения, которые прямо или косвенно препятствуют физическому контакту эффекторных лимфоцитов с опухолевыми клетками. Разрушение этих барьеров облегчает инфильтрацию опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами [36].

Перифокальная апоптотическая смерть опухолевых клеток традиционно считается иммуносупрессивной, поскольку не сопровождается активацией и стимуляцией АПК (сигнал 2), хотя в последние годы эта концепция пересматривается [37]. Репаративные процессы в зоне абляции также носят регуляторный характер и направлены в большей степени на восстановление целостности тканей и в меньшей – на элиминацию иммунологически чужеродных элементов [38].

Таким образом, в зоне термической абляции присутствуют участки коагуляционного некроза, апоптоза, воспаления, а в более поздние сроки – элементы репарации поврежденных тканей. Всем этим процессам соответствуют иммунологические механизмы как стимулирующего, так и регуляторного свойства. Остановимся подробнее на локальных и системных иммунных эффектах УЗА.

### Выделение опухолевых антигенов

Термическая деструкция опухоли приводит к формированию длительно функционирующего источника антигенов для АПК, расположенных в микроокружении

опухоли и/или лимфоузлах, дренирующих опухоль. Хотя в литературе обсуждается проблема денатурации белков и потери их иммуногенности [39], на примере метастазов колоректального рака в печени показано, что после абляции уровень РЭА повышается, а в дальнейшем происходит его медленное снижение, что может свидетельствовать об иммуногенности антигена и его постепенном выделении из депо [40]. Примечательно, что при хирургическом удалении метастазов падение уровня РЭА наступает уже в ближайшие дни после операции.

Кинетика выделения и время процессирования (подготовка к презентации) опухолевых антигенов влияют на силу иммунного ответа. Пролонгированная экспозиция постаблативного клеточного дебриса *in situ* индуцирует более выраженный иммунный эффект, чем стимуляция опухолевым лизатом, приготовленным *in vitro*, или после соникации опухоли *ex vivo* [41, 42]. Об этом же свидетельствуют сравнительные эксперименты с удалением новообразования непосредственно после абляции или через два дня после процедуры. При втором варианте развивается более выраженный вакцинационный эффект и улучшается выживаемость [43].

#### Выделение аларминов

Алармины, выделяющиеся в процессе ИКС, имеют преимущественно иммуностимулирующее влияние на иммунные клетки. Связываясь с TLR-рецепторами на поверхности АПК, они индуцируют синтез этими клетками про-воспалительных цитокинов, хемокинов и интерферонов 1-го типа. Наиболее изученными среди аларминов являются БТШ, которые, попадая во внеклеточное пространство, в основном в периаблативной зоне, притягивают и стимулируют АПК [44, 45]. После УЗА клеток колоректальной карциномы MC-38 *in vitro* наступало быстрое высвобождение HSP-60 и АТФ [46]. У пациентов с раком простаты показано повышение экспрессии HSP-27, HSP-72, HSP-73 [45], в то время как при раке молочной железы обнаружена экспрессия HSP-70, причем больше в центральных зонах некроза [47]. Высокий постаблативный уровень HSP-70 в сыворотке крови ассоциировался с лучшим прогнозом при раке печени, почек или легких [48].

#### Выделение цитокинов

Опухолевое микроокружение часто содержит высокие концентрации IL-10 и TGF- $\beta$ , которые препятствуют активации ДК, ограничивают эффекторные функции лимфоцитов и притягивают в очаг Т-регуляторные и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), также подавляющие иммунный ответ. Термическое повреждение ткани меняет баланс этих сигналов, в частности активирует макрофаги, выделяющие воспалительные цитокины IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  [49–52]. После абляции рака простаты отмечено локальное увеличение экспрессии воспалительных Th1-цитокинов (IL-2, IFN- $\gamma$ ,

TNF- $\alpha$ ) и снижение противовоспалительных Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-10) [45].

#### Инфильтрация, активация и созревание АПК

В эксперименте и клинике получены морфологические и ИГХ-свидетельства обильной инфильтрации периферии зоны соникации активированными АПК. На модели аденокарциномы MC-38 показано, что в течение нескольких часов CD11c+ ДК проникают в опухоль и мигрируют в дренирующие лимфоузлы [53, 54]. Аналогичные наблюдения описаны через два дня после КА и РЧА [41, 55], а также у пациентов, страдающих раком простаты [56].

В более поздние сроки (7–14 дней) также наблюдалась инфильтрация периферии аблативной зоны активированными АПК (HLA-DR+), экспрессирующими костимуляторные молекулы CD80, CD86 и рецепторы к хемокинам. Эти клетки стимулировали пролиферацию CD4+ Т-лимфоцитов, секретировали сравнительно больше цитокинов *in vitro*, при этом ДК выделяли IL-12, а макрофаги – TNF- $\alpha$  [41, 53, 57, 58].

Опухолевый дебрис стимулировал и созревание ДК [59], а также усиливал эффекторную функцию цитотоксических Т-лимфоцитов, секретирующих TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  [54, 60].

Таким образом, термическая абляция, будучи одним из способов индукции ИКС, создает депо из опухолевых антигенов и аларминов, которые притягивают, активируют, стимулируют созревание и функционирование АПК. Все эти процессы являются важным и необходимым этапом для следующей фазы иммунного цикла – примирования, активации и пролиферации CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов.

#### Популяции лимфоцитов периферической крови

Данных о постаблативных изменениях субпопуляций лимфоцитов в периферической крови мало. При увеальной меланоме, гепатоцеллюлярном раке, остеосаркоме и раке почки абляция приводила к повышению количества CD4+ лимфоцитов и нормализации CD4+/CD8+ иммунорегуляторного индекса [61, 62]. При поздних стадиях рака поджелудочной железы соникация опухоли активировала NK, но мало влияла на CD3+ и CD4+ клетки [63].

В небольшой группе из 16 пациентов со злокачественными новообразованиями УЗА приводила к значительному снижению уровня Т-регуляторных и одновременно цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), а также к менее выраженному снижению CD4+, CD8+ и Т-супрессоров (Ts); в то же время наблюдался рост количества NK-клеток [64].

В эксперименте на кроликах, который проводили Wisniewski et al. (2003), получены доказательства специфичности Т-лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови после абляции [65].

В целом клиническая роль и прогностическое значение оценки субпопуляций лимфоцитов крови в постаблативном периоде требуют дальнейшего изучения и анализа.

#### Цитокины и факторы роста в периферической крови

УЗА снижает концентрации иммуносупрессивных факторов (VEGF, TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ) и повышает уровни воспалительных цитокинов, однако роль этих изменений в восстановлении иммунного ответа до конца не установлена [47, 60, 66, 67]. Анализ экспрессии mRNA выявил повышение уровней TGF- $\beta$  и IL-10 после УЗА [64], что свидетельствует о возможных иммуносупрессивных эффектах процедуры.

#### Эффекторная фаза иммунного ответа и микроокружение опухоли

Получены экспериментальные свидетельства повышения в постаблативном периоде количества и цитотоксичности антиген-специфических Т-клеток, секреции ими IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , а также развития вакцинационного эффекта [20, 47, 53, 59, 60, 68, 69]. В некоторых работах показано, что эти эффекты ассоциировались с лучшей выживаемостью [47, 59, 69, 70].

Противоопухолевый иммунитет после абляции связан в большей степени с клеточным звеном. У «наивных» животных защитным эффектом обладала пересадка лимфоцитов селезенки от мышей, перенесших термическую абляцию, в то время как введение сыворотки этих животных не влияло на рост перевиваемых опухолей [71].

В работе (Silverstrini et al., 2017) на модели метастатического рака молочной железы показано, что абляция, помимо временной регрессии опухоли, ИКС с повышением уровня аларминов (амфотерина), приводила к изменениям микроокружения в виде лейкоцитарной инфильтрации, повышения количества CD4+ лимфоцитов, секретирующих IFN- $\gamma$ , CD8+ цитотоксических лимфоцитов, а также уменьшения доли Т-регуляторных лимфоцитов. В течение 48 часов после соникации происходило увеличение сосудистой проницаемости в опухоли, усиленное дренирование ее белков через лимфатическую систему [20].

В модели трансплантируемой карциномы VX2 показано, что через 24 часа периферию зоны абляции инфильтрировали CD3+ лимфоциты и эти клетки обнаруживались в центре очага через две недели после процедуры [65].

У пациенток, страдающих раком молочной железы, в сроки от 7 до 14 дней после УЗА по данным ИГХ выявлена выраженная перифокальная инфильтрация CD3+, CD4+, CD8+ лимфоцитами, В-лимфоцитами и NK, при этом были активны эффекторные механизмы, связанные с FAS-L, гранзимом и перфорином [72].

При гепатоцеллюлярном раке и метастазах в печени после абляции отмечена инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами, NK и макрофагами [73]. Продукция CD4+ и CD8+ лимфоцитами IFN- $\gamma$  возрастала, при этом цитотоксические клетки обладали повышенными эффекторными функциями и специфичностью по отношению к опухоли, но не к нормальным тканям [74, 75].

Также при метастатических опухолях печени описана миграция в аблативную зону «наивных» CD62L+ клеток

и Т-лимфоцитов памяти, которые синтезировали IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию опухоль-ассоциированным антигеном MUC1 [52].

В ответ на усиленную инфильтрацию CD8+ и CD4+ лимфоцитами у пациентов с метастазами колоректального рака в печени отмечена повышенная экспрессия опухолевыми клетками PD-1L, что придавало микроокружению характеристики асептического воспаления [19].

В отношении неспецифических эффектов известно, что через четыре недели после абляции гепатоцеллюлярного рака повышение цитотоксической активности NK и продукция IFN- $\gamma$  ассоциировались с лучшей выживаемостью [76].

Роль антиген-специфических антител в противоопухолевом иммунитете менее понятна [52, 71], хотя описаны случаи их выявления в отдаленные сроки после абляции [77].

Все эти данные говорят о том, что термическая абляция вызывает главным образом специфический клеточный ответ к антигенам опухоли. Прогностическая роль иммунных ответов в этом контексте до конца не установлена [74, 78].

#### Абскопальные эффекты после абляции в режиме монотерапии

Помимо локальных иммунных эффектов, большой практический интерес представляют постаблативные изменения опухолевого микроокружения в отдаленных метастазах. В моделях колоректального рака и меланомы получены доказательства быстрого иммунного ответа в виде усиленной клеточной инфильтрации дистального очага, появления признаков воспаления, однако со временем опухоль начинала экспрессировать PD-L1, истощая тем самым иммунные клетки и подавляя иммунный ответ [19]. Поэтому клинически АЭ были слабо выраженными, непродолжительными и не позволяли контролировать заболевание.

По аналогии у пациентов с метастатическим гепатоцеллюлярным раком наблюдалась усиленная инфильтрация необработанной опухоли Т-лимфоцитами, NK и макрофагами, хотя и в меньшей степени, чем в очаге абляции. Кроме этого, продемонстрирована связь между степенью инфильтрации и прогнозом. [73].

Основываясь на экспериментальных и клинических наблюдениях, большинство исследователей пришло к выводу, что иммунных эффектов УЗА недостаточно для длительного контроля генерализованных форм рака, поэтому в последние годы акцент сделан на комбинированных подходах.

#### Абляция опухоли в комбинации с иммунотерапией

В контексте современных лечебных парадигм постаблативные иммунные эффекты интересны с нескольких позиций. Во-первых, циторедукция создает предпосылки для более успешного проведения иммунотерапии, кото-

рая, как правило, более эффективна при минимальных проявлениях заболевания. Во-вторых, ИКС способствует генерации CD4+ и антиген-специфичных цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, индукции воспалительного микроокружения, в том числе экспрессии PD-1L как в зоне соникации, так и в отдаленных метастазах. Это создает более благоприятные условия для блокады каскада PD-1/PD-1L [19, 79–81]. В-третьих, в случае прогрессирования на фоне проводимой иммунотерапии ИКТ абляция и ИКС могут стать дополнительным источником антигенного материала для запуска нового иммунного цикла и расширения клонального репертуара эффекторных клеток [82, 83]. В-четвертых, синергизм абляции и иммунотерапии в перспективе может привести к снижению доз ИКТ, что важно при их совместном применении, когда существенно возрастает частота нежелательных явлений [84, 85].

Наиболее часто применяемой и активно изучаемой аблативной методикой остается стереотаксическая гипофракционированная лучевая терапия, о чем свидетельствуют текущие протоколы, зарегистрированные на сайте ClinicalTrials.gov. В частности, речь идет о сочетании лучевой абляции с ингибиторами CTLA-4 или PD-1/PD-1L (протоколы NCT02843165, NCT03110978, NCT03399552, NCT02239900, NCT03050060, NCT03050554, NCT02648282, NCT02608385), а также с их комбинацией (NCT03122496, NCT03203304).

Большое внимание приковано и к альтернативным методикам абляции, не связанным с ионизирующим излучением, поскольку последнее обладает повышенной местной токсичностью на фоне терапии ИКТ [86].

Абляция опухоли в комбинации с иммунотерапией оказалась более эффективной в подавлении роста отдаленных метастазов колоректального рака CT 26 и меланомы B16 в экспериментальных моделях, чем каждый из методов по отдельности [19]. Авторы связали наступившие АЭ с усиленной инфильтрацией дистальной опухоли CD8+ и CD4+ лимфоцитами, секретирующими INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , снижением в микроокружении доли Т-регуляторных лимфоцитов в пользу эффекторных CD8+ клеток, а также успешным подавлением каскада PD-1/PD-1L.

В экспериментальной модели рака почки, где использован аналогичный метод иммунотерапии, продемонстрирован синергизм с РЧА, что выразилось в улучшении локального контроля, индукции АЭ, сохранении иммунологической памяти и увеличении выживаемости [87]. Эта комбинация также вызывала более выраженный системный цитокиновый ответ в виде повышения уровней INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 и IL-5.

В качестве примера современного подхода к иммунотерапии можно привести программу лечения экспериментальной гепатомы с использованием тройной комбинации: термической абляции (МВА), GM-CSF для стимуляции ДК и блокады CTLA-4 [88]. Сочетание этих методов обладало наиболее выраженным защитным эффектом при реим-

плантации опухоли, приводило к АЭ у 50% животных и ассоциировалось с лучшей выживаемостью.

Интересные и важные для будущих исследований данные описаны в экспериментальной модели билатерального рака молочной железы, в которой оценивалась УЗА в сочетании с комбинированной иммунотерапией (агонист TLR в качестве стимулятора АПК и ингибитор PD-1/PD-1L) [20]. Иммунотерапия с последующей соникацией одного очага вызывала быстрый локальный и абскопальный эффект в виде выраженной инфильтрации опухоли CD3+, CD4+ и CD8+ лимфоцитами, продуцирующими INF- $\gamma$ , снижения количества макрофагов и супрессорных клеток миелоидного происхождения, повышения в дистальной опухоли количества M1 макрофагов (с противоопухолевой поляризацией). Клинически это сопровождалось полной регрессией первичной и отдаленной опухоли в 80% случаев. Авторами отмечен синергизм абляции с иммунотерапией, что может стать предпосылкой для снижения доз ИКТ с целью уменьшения частоты нежелательных явлений. Наиболее наглядно роль УЗА в этой серии экспериментов продемонстрирована на модели с множественными опухолями, когда последовательная абляция двух очагов в сочетании с иммунотерапией показала преимущества перед одной иммунотерапией. За счет циторедуктивного и абскопального эффектов удалось достичь регрессии отдаленных очагов в 60% случаев по сравнению с 25% в группе, где проводилась только иммунотерапия. Эти результаты могут стать экспериментальной основой для разработки протоколов, предусматривающих полифокальные абляции на этапах лечения с целью циторедукции и иммуностимуляции, что может привести к увеличению частоты АЭ.

Доклинические исследования нашли свое продолжение в текущих протоколах, в которых при метастатическом колоректальном раке термическую абляцию одного узла сочетают с блокадой CTLA-4 и PD-1/PD-1L (протоколы NCT03122509, NCT03101475). При гепатоцеллюлярном раке изучается комбинация МВА (NCT03122509) или РЧА (NCT03124498) с адоптивной иммунотерапией.

## Заключение

Открытия последних десятилетий и очевидные клинические успехи дали новый импульс развитию иммунотерапии рака. Результаты изучения механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы позволили лучше понять причины ограниченной эффективности существующих подходов, а также обозначить направления будущих научно-прикладных исследований.

Дальнейший прогресс в лечении диссеминированных форм рака во многом связывают с подходами разнонаправленного воздействия на фазы иммунного цикла [89, 90], а также с использованием иммунотерапии в комбинации с традиционными методами противоопухолевого

лечения. Арсенал имеющихся способов влияния на иммунную систему сегодня достаточно широк, он продолжает пополняться новыми технологиями, что вселяет оптимизм в отношении успешного развития этого направления.

В данном обзоре акцент был сделан на ультразвуковой абляции опухоли как способе циторедукции, снижения системной иммуносупрессии, достижения ИКС, индукции АЭ, а также на возможности интеграции этих эффектов в современные программы иммунотерапии генерализованного рака.

Создание с помощью аблативных методик депо клеточного дебриса *in situ* обладает рядом преимуществ перед традиционными методами вакцинирования, в частности за счет более широкого спектра опухолевых антигенов, цитокинов, стимуляторов АПК, а также пролонгированного контакта этих факторов с иммунной системой. Среди существующих способов индукции ИКС УЗА занимает особую нишу, поскольку обладает рядом преимуществ: получение быстрого клинического и иммунного эффекта, неинвазивность и низкая локальная токсичность, возможность многократного применения, относительная дешевизна, отсутствие необходимости длительной госпитализации. Современные установки для проведения УЗА позволяют манипулировать физическими параметрами воздействия на опухоль. Тем самым в режиме реального времени под ультразвуковой или МРТ-навигацией можно вызывать структурные изменения тканей, необходимые для достижения тех или иных биологических/иммунных эффектов. Методологические подходы к режимам соникации в конкретных клинических ситуациях находятся на ранних стадиях разработки.

Следует отметить ряд аспектов, которые продолжают обсуждаться среди специалистов, в частности дискуссию об иммуногенности разных видов клеточной смерти в процессе абляции. Как отмечалось выше, апоптотическую смерть традиционно принято считать иммуносупрессивной, в то же время некоторыми авторами высказывается мнение, что апоптоз, в зависимости от уровней выделяемых аларминов, также может индуцировать противоопухолевый иммунный ответ [91–93]. Эта проблема требует дальнейшего изучения.

Кроме этого, обсуждается иммуногенность клеточного дебриса с учетом вероятности денатурации белков. В этом контексте предлагаются новые подходы к режиму соникации, направленные на сохранение целостности внутриклеточных антигенов [29, 94].

Таким образом, можно констатировать, что термическая абляция вызывает циторедуктивный эффект и снижение уровня иммуносупрессивных сигналов. В организ-

ме создается очаг асептического воспаления в виде депо *in situ*, содержащего опухолевые антигены (неоантигены), алармины и воспалительные цитокины, что в целом характеризует этот процесс как ИКС. Наряду с иммуностимулирующим влиянием абляции на врожденный и адаптивный иммунитет существует вероятность появления регуляторных сигналов, особенно на фоне репаративных процессов. От баланса всех этих механизмов во многом зависит, насколько выраженным будет иммунный и клинический ответ. Данные аспекты требуют дальнейшего качественного и количественного анализа.

УЗА способствует более успешному прохождению начальных фаз иммунного цикла и подготовке иммунной системы к примированию и генерации популяции CD4+ и специфических CD8+ эффекторных Т-клеток.

Важными и интересными с точки зрения клиники являются локальные и отдаленные иммунные эффекты, которые способна индуцировать УЗА. Среди них – инфильтрация зоны соникации и отдаленных метастазов активированными иммунными клетками, индукция воспалительного фенотипа, снижение количества иммуносупрессивных клеток и сигналов на уровне микроокружения. В ответ на абскопальные иммунные эффекты в короткие сроки опухоль активирует защитные механизмы, в частности экспрессию PD-1L, истощающей эффекторные Т-лимфоциты. Поэтому в свете современных взглядов УЗА рассматривается преимущественно как один из элементов разнонаправленного воздействия на фазы иммунного цикла. Экспериментально показано, что абляция в комбинации с активацией АПК и блокадой иммуносупрессивных механизмов за счет ИКТ позволили повысить частоту АЭ и увеличить выживаемость. Эти результаты послужили импульсом и научной основой для разработки и активации ряда клинических исследований, направленных не только на проверку самой концепции, но и на уточнение ряда методологических проблем. В частности, речь идет об определении оптимальной последовательности этапов комбинированного лечения, временных интервалов для каждого из них, установлении наиболее информативных методов мониторинга иммунной системы и визуализации опухоли [20, 95]. Не менее актуальным остается выявление предиктивных и прогностических критериев, разработка индивидуализированных программ лечения, адаптированных к характеристикам пациента, клиническим проявлениям заболевания и показателям иммунитета [4, 90, 96].

Таким образом, проводимые сейчас за рубежом, а также планируемые в РФ исследования должны уже в ближайшие годы показать, насколько эффективной окажется интеграция УЗА (HIFU) в современные программы комбинированного лечения диссеминированного рака.

## Информация об авторах:

Геннадий Н. Мачак, д. м. н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н. Н. Приорова» Министерства здравоохранения РФ, e-mail: machak.gennady@mail.ru

DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-2-31-42

**For citation:** Machak G.N. Ultrasound tumor ablation: immune effects and perspectives of integration in the modern treatment of advanced cancer. *Malignant Tumours* 2018; 2:31-42 (In Russ.)

## Ultrasound tumor ablation: immune effects and perspectives of integration in the modern treatment of advanced cancer

G. N. Machak

Central institute of traumatology and orthopedics of N. N. Priorov, Moscow, Russia

**Abstract:** Despite significant progress in molecular oncology and immuno-oncology, only 20-30% of patients with advanced cancer can be cured with modern treatments indicating that new approaches are needed. Further improvements in immunotherapy of cancer are associated with enhanced tumor immunogenicity, induction of inflammatory phenotype and inhibition of immune suppression at the tumor microenvironment level. In this context, high-intensity focused ultrasound (HIFU) ablation have several advantages, particularly it is able to elicits a rapid clinical and immune response, is non-invasive, have low local morbidity, allows repeated sonications, have relative low cost and does not require long hospitalization. In addition to cytoablation and decreasing of systemic immune suppression, HIFU generates a tumor debris depot acting as vaccine in situ. Immunogenic cell death elicits a CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell response, but several regulatory mechanisms, particularly PD-1L expression, are promoted in response to enhanced immune cells infiltration of heated and distal tumors. This results in low rate of durable and clinically relevant abscopal effects. For these reasons HIFU is currently viewed as a part of strategies targeting multiple steps of cancer immune cycle (TLR agonists, GM-CSF, cytokines, CTLA-4, PD-1/PD-1L inhibitors, T-cell co-stimulation agonists, adoptive cell therapy etc). Higher rate of abscopal effects and improved survival have been shown in some preclinical studies using thermal ablations in combination with immunotherapy. In this setting, there is an opportunity to use check-point inhibitors in reduced doses. In addition, tumor ablation after non-effective immunotherapy could induce a new cancer antigens spreading, T-cell repertoire changes and enhance tumor responsiveness to treatment. Based on encouraging preclinical data, this exiting approach is currently explored in some ongoing trials aiming to evaluate the optimal treatment sequences and its clinical efficacy.

**Keywords:** cancer, metastases, ultrasound thermal ablation, immunotherapy, abscopal effect

### Information about the authors:

**Gennady N. Machak**, MD, DSc Med, Central institute of traumatology and orthopedics of N.N. Priorov, e-mail: machak.gennady@mail.ru

### Литература • References

- Joshi S. S., Maron S. B., Catenacci D. V. Pembrolizumab for treatment of advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Future Oncol.* 2018. Vol. 14 (5). P. 417-430. doi: 10.2217/fon-2017-0436.
- Peters S., Kerr K. M., Stahel R. PD-1 blockade in advanced NSCLC: A focus on pembrolizumab. *Cancer Treat. Rev.* 2018. Vol. 62. P. 39-49. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.10.002.
- Schachter J., Ribas A., Long G. V., Arance A., Grob J. J., Mortier L. et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet.* 2017. Vol. 390 (10105). P. 1853-1862. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31601-X.
- Chen D. S., Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017. Vol. 541 (7637). P. 321-330. doi: 10.1038/nature21349.
- Alatrash G., Daver N., Mittendorf E. A. Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. *Pharmacol. Rev.* 2016. Vol. 68 (4). P. 1014-1025.
- Atkins M. B., Larkin J. Immunotherapy Combined or Sequenced With Targeted Therapy in the Treatment of Solid Tumors: Current Perspectives. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016. Vol. 108 (6). djv414. doi: 10.1093/jnci/djv414.

- Motzer R. J., Tannir N. M., McDermott D. F., Aren Frontera O., Melichar B., Choueiri T. K. et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2018. Vol. 378 (14). P. 1277-1290. doi: 10.1056/NEJMoa1712126.
- Powles T., Eder J. P., Fine G. D., Braiteh F. S., Loriot Y., Cruz C. et al. MPDL3280A (anti - PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature.* 2014. Vol. 515. P. 558-562.
- Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., McDermott D. F. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti - PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012. Vol. 366. P. 2443-2454.
- Topalian S. L., Sznol M., McDermott D. F., Kluger H. M., Carvajal R. D., Sharfman W. H. et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol.* 2014. Vol. 32. P. 1020-1030.
- Sharma P., Allison J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015. Vol. 348 (6230). P. 56-61. doi: 10.1126/science.aaa8172
- Ventola C. L. Cancer Immunotherapy, Part 3: Challenges and Future Trends. *P&T.* 2017. Vol. 42 (8). P. 514-521.
- Koyama S., Akbay E. A., Li Y. Y. et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. P. 10501.
- Mothersill C., Rusin A., Fernandez-Palomo C., Seymour C. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. Vol. 29. P. 1-12. doi: 10.1080/09553002.2017.1398436.
- Siva S., MacManus M. P., Martin R. F., Martin O. A. Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist. *Cancer Lett.* 2015. Vol. 356 (1). P. 82-90. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.018. Epub 2013 Oct 12.
- Grass G. D., Krishna N., Kim S. The immune mechanisms of abscopal effect in radiation therapy. *Curr. Probl. Cancer.* 2016. Vol. 40 (1). P. 10-24. doi: 10.1016/j.cup.2015.10.003. Epub 2015 Nov 21.
- Levy A., Chargari C., Marabelle A., Perfettini J. L., Magne N., Deutsch E. Can immunostimulatory agents enhance the abscopal effect of radiotherapy? *Eur. J. Cancer.* 2016. Vol. 62. P. 36-45. doi: 10.1016/j.ejca.2016.03.067. Epub 2016 May 18.
- Postow M. A., Callahan M. K., Barker C. A., Yamada Y., Yuan J., Kitano S. et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2012. Vol. 366 (10). P. 925-931. doi:10.1056/NEJMoa1112824.
- Shi L., Chen L., Wu C., Zhu Y., Xu B., Zheng X. et al. PD-1 blockade boosts radiofrequency ablation-elicited adaptive immuneresponses against tumor. *Clin. Cancer Res.* 2016. Vol. 22. P. 1173-1184.
- Silvestrini M. T., Ingham E. S., Mahakian L. M., Kheirloom A., Liu Y., Fite B. Z. et al. Priming is key to effective incorporation of image-guided thermal ablation into immunotherapy protocols. *JCI Insight.* 2017. Vol. 2 (6). e90521. doi:10.1172/jci.insight.90521.
- Pampena M. B., Barrio M. M., Julia E. P., Blanco P. A., von Euw E. M., Mordoh J. et al. Early Events of the Reaction Elicited by CSF-470 Melanoma Vaccine Plus Adjuvants: An In Vitro Analysis of Immune Recruitment and Cytokine Release. *Front Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 1342. doi: 10.3389/fimmu.2017.01342.
- Silva A., Mount A., Krstevska K., Pejovski D., Hardy M. P., Owczarek C. et al. The combination of ISCOMATRIX adjuvant and TLR agonists induces regression of established solid tumors in vivo. *J. Immunol.* 2015. Vol. 194 (5). P. 2199-2207. doi: 10.4049/jimmunol.1402228.
- Kushner B. H., Cheung I. Y., Modak S., Kramer K., Ragupathi G., Cheung N. K. Phase I trial of a bivalent gangliosides vaccine in combination with  $\beta$ -glucan for high-risk neuroblastoma in second or later remission. *Clin. Cancer Res.* 2014. Vol. 20 (5). P. 1375-1382. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1012.
- Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy.* 2009. Vol. 1 (6). P. 949-964. doi: 10.2217/imt.09.70.
- Liu C., Xie Y., Sun B., Geng F., Zhang F., Guo Q. et al. MUC1- and Survivin-based DNA Vaccine Combining Immunoadjuvants CpG and interleukin-2 in a Bicistronic Expression Plasmid Generates Specific Immune Responses and Antitumor Effects in a Murine Colorectal Carcinoma Model. *Scand. J. Immunol.* 2018. Vol. 87 (2). P. 63-72. doi: 10.1111/sji.12633.
- Shukla N. M., Arimoto K. I., Yao S., Fan J. B., Zhang Y., Sato-Kaneko F. et al. Identification of Compounds That Prolong Type I Interferon Signaling as Potential Vaccine Adjuvants. *SLAS Discov.* 2018. May 11. 2472555218774308. doi: 10.1177/2472555218774308.
- Rammensee H. G., Singh-Jasuja H. HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. *Expert Rev. Vaccines.* 2013. Vol. 12. P. 1211-1217. doi: 10.1586/14760584.2013.836911.
- Kooreman N. G., Kim Y., de Almeida P. E., Termglinchan V., Diecke S., Shao N. Y. et al. Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo. *Cell Stem. Cell.* 2018. Vol. 22 (4). P. 501-513. e7 doi: 10.1016/j.stem.2018.01.016. Epub 2018 Feb 15.
- Bull J. M. C. A review of immune therapy in cancer and a question: can thermal therapy increase tumor response? *Int. J. Hyperthermia.* 2017. Vol. 3. P. 1-13. doi: 10.1080/02656736.2017.1387938.

30. Mauri G., Nicosia L., Xu Z., Di Pietro S., Monfardini L., Bonomo G. et al. Focused ultrasound: tumour ablation and its potential to enhance immunological therapy to cancer. *Br. J. Radiol.* 2018. Vol. 91 (1083). 20170641. doi: 10.1259/bjr.20170641.
31. Wu F. High Intensity Focused Ultrasound (HIFU) Ablation. In: *Keisari Y. (eds). Tumor Ablation. The Tumor Microenvironment.* Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013. Vol 5. P. 61–76. doi: 10.1007/978-94-007-4694-7\_2.
32. Tranberg K.G. Percutaneous ablation of liver tumours. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2004. Vol. 18. P. 125–145.
33. Ohno T., Kawano K., Sasaki A. et al. Expansion of an ablated site and induction of apoptosis after microwave coagulation therapy in rat liver. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2001. Vol. 8. P. 360–366.
34. Canney M. S., Khokhlova V. A., Bessonova O. V., Bailey M. R., Crum L. A. Shock-induced heating and millisecond boiling in gels and tissue due to high intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 2010. Vol. 36. P. 250–267. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2009.09.010.
35. Maxwell A. D., Wang T. Y., Cain C. A., Fowlkes J. B., Sapozhnikov O. A., Bailey M. R., Xu Z. Cavitation clouds created by shock scattering from bubbles during histotripsy. *J. Acoust. Soc. Am.* 2011. Vol. 130. P. 1888–1898. doi:10.1121/1.3625239.
36. Waitz R., Solomon S. B., Petre E. N., Trumble A. E., Fasso M., Norton L. et al. Potent induction of tumor immunity by combining tumor cryoablation with anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res.* 2012. Vol. 72 (2). P. 430–439.
37. Davidovich P., Kearney C. J., Martin S. J. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol. Chem.* 2014. Vol. 395 (10). P. 1163–1171.
38. Julier Z., Park A. J., Briquez P. S., Martino M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater.* 2017. Vol. 53. P. 13–28. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.056.
39. Wu F., Zhou L., Chen W. R. Host antitumor immune responses to HIFU ablation. *Int. J. Hyperthermia.* 2007. Vol. 23. P. 165–171.
40. Ghanamah M., Berber E., Siperstein A. Pattern of carcinoembryonic antigen drop after laparoscopic radiofrequency ablation of liver metastasis from colorectal carcinoma. *Cancer.* 2006. Vol. 107. P. 149–153.
41. den Brok M. H. M. G. M., Suttmuller R. P. M., Nierkens S., Bennink E. J., Frielink C., Toonen L. W. J. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity. *Br. J. Cancer.* 2006. Vol. 95. P. 896–905.
42. Ito F., Ku A. W., Bucsek M. J., Muhitch J. B., Vardam-Kaur T., Kim M. et al. Immune adjuvant activity of pre-resectional radiofrequency ablation protects against local and systemic recurrence in aggressive murine colorectal cancer. *PLoS One.* 2015. Vol. 10. e0143370. doi:10.1371/journal.pone.0143370.
43. Xing Y., Lu X., Pua EC., Zhong P. The effect of high intensity focused ultrasound treatment on metastases in a murine melanoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 375 (4). P. 645–650. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.072.
44. Chu K. F., Dupuy D. E. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2014. Vol. 14 (3). P. 199–208.
45. Kramer G., Steiner G. E., Grobl M., Hrachowitz K., Reithmayr F., Paucz L. et al. Response to sublethal heat treatment of prostatic tumor cells and of prostatic tumor infiltrating T-cells. *Prostate.* 2004. Vol. 58 (2). P. 109–120.
46. Hu Z., Yang X. Y., Liu Y., Morse M. A., Lyster H. K., Clay T. M., Zhong P. Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 335. P. 124–131 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.07.071.
47. Wu F., Wang Z. B., Cao Y. D., Zhou Q., Zhang Y., Xu Z. L., Zhu X. Q. Expression of tumor antigens and heat-shock protein 70 in breast cancer cells after high-intensity focused ultrasound ablation. *Ann. Surg. Oncol.* 2007. Vol. 14. P. 1237–1242. doi:10.1245/s10434-006-9275-6.
48. Haen S. P., Gouttefangeas C., Schmidt D., Boss A., Clasen S., von Herbay A. et al. Elevated serum levels of heat shock protein 70 can be detected after radiofrequency ablation. *Cell Stress Chaperones.* 2011. Vol. 16 (5). P. 495–504. doi: 10.1007/s12192-011-0261-y.
49. Evrard S., Menetrier-Caux C., Biota C., Neaud V., Mathoulin-Pelissier S., Blay J. Y., Rosenbaum J. Cytokines pattern after surgical radiofrequency ablation of liver colorectal metastases. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2007. Vol. 31. P. 141–145.
50. Hori K., Mihich E., Ehrke M. J. Role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in gamma interferon-promoted activation of mouse tumoricidal macrophages. *Cancer Res.* 1989. Vol. 49. P. 2606–2614.
51. Kirn A., Bingen A., Steffan A. M., Wild M. T., Keller F., Cinqualbre J. Endocytic capacities of Kupffer cells isolated from the human adult liver. *Hepatology.* 1982. Vol. 2. P. 216–222.
52. Napoletano C., Taurino F., Biffoni M., De Majo A., Coscarella G., Bellati F. et al. A RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune responses in metastatic liver patients. *Int. J. Oncol.* 2008. Vol. 32. P. 481–490.
53. Hu Z., Yang X. Y., Liu Y., Sankin G. N., Pua E. C., Morse M. A. et al. Investigation of HIFU-induced anti-tumor immunity in a murine tumor model. *J. Transl. Med.* 2007. Vol. 5. P. 34. doi:10.1186/1479-5876-5-34.
54. Xing Y., Lu X., Pua E. C., Zhong P. The effect of high intensity focused ultrasound treatment on metastases in a murine melanoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 375(4). P. 645–650. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.072.
55. Dromi S. A., Walsh M. P., Herby S., Traugbber B., Xie J., Sharma K. V. et al. Radiofrequency ablation induces antigen-presenting cell infiltration and amplification of weak tumor-induced immunity. *Radiology.* 2009. Vol. 251(1). P. 58–66. doi: 10.1148/radiol.2511072175.
56. Huang X., Yuan F., Liang M., Lo H. W., Shinohara M. L., Robertson C., Zhong P. M-HIFU inhibits tumor growth, suppresses STAT3 activity and enhances tumor specific immunity in a transplant tumor model of prostate cancer. *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7. e41632. doi:10.1371/journal.pone.0041632.
57. Xu Z. L., Zhu X. Q., Lu P., Zhou Q., Zhang J., Wu F. Activation of tumor-infiltrating antigen presenting cells by high intensity focused ultrasound ablation of human breast cancer. *Ultrasound Med. Biol.* 2009. Vol. 35. P. 50–57. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2008.08.005.
58. Zerbini A., Pilli M., Fagnoni F., Pelosi G., Pizzi M. G., Schivazappa S. et al. Increased immunostimulatory activity conferred to antigen-presenting cells by exposure to antigen extract from hepatocellular carcinoma after radiofrequency thermal ablation. *J. Immunother.* 2008. Vol. 31(3). P. 271–282. doi: 10.1097/CJI.0b013e318160ff1c.
59. Zhang Y., Deng J., Feng J., Wu F. Enhancement of antitumor vaccine in ablated hepatocellular carcinoma by high-intensity focused ultrasound: a preliminary report. *World J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 16. P. 3584–3591.
60. Deng J., Zhang Y., Feng J., Wu F. Dendritic cells loaded with ultrasound-ablated tumour induce in vivo specific antitumour immune responses. *Ultrasound Med. Biol.* 2010. Vol. 36. P. 441–448.
61. Rosberger D. F., Coleman D. J., Silverman R., Woods S., Rondeau M., Cunningham-Rundles S. Immunomodulation in choroidal melanoma: Reversal of inverted CD4/CD8 ratios following treatment with ultrasonic hyperthermia. *Biotechnol. Ther.* 1994. Vol. 5. P. 59–68.
62. Wu F., Wang Z. B., Lu P., Xu Z. L., Chen W. Z., Zhu H., Jin C. B. Activated anti-tumor immunity in cancer patients after high intensity focused ultrasound ablation. *Ultrasound Med. Biol.* 2004. Vol. 30. P. 1217–1222. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.08.003.
63. Wang X., Sun J. High-intensity focused ultrasound in patients with late-stage pancreatic carcinoma. *Chin. Med. J. (Engl.).* 2002. Vol. 115. P. 1332–1335.
64. Yang W., Wang W., Liu B., Zhu B., Li J., Xu D. et al. Immunomodulation characteristics by thermal ablation therapy in cancer patients. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 2018. Jan 8. doi: 10.1111/ajco.12836.
65. Wissniowski T. T., Hansler J., Neureiter D., Frieser M., Schaber S., Esslinger B. et al. Activation of tumor-specific T lymphocytes by radio-frequency ablation of the VX2 hepatoma in rabbits. *Cancer Res.* 2003. Vol. 63(19). P. 6496–500.
66. van den Bijgaart R. J., Eikelenboom D. C., Hoogenboom M., Futterer J. J., den Brok M. H., Adema G. J. Thermal and mechanical high-intensity focused ultrasound: perspectives on tumor ablation, immune effects and combination strategies. *Cancer Immunol. Immunother.* 2017. Vol. 66(2). P. 247–258. doi: 10.1007/s00262-016-1891-9.
67. Zhou Q., Zhu X. Q., Zhang J., Xu J. L., Lu P., Wu F. Changes in circulating immunosuppressive cytokine levels of cancer patients after high intensity focused ultrasound treatment. *Ultrasound Med. Biol.* 2008. Vol. 34. P. 81–87. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.07.013.
68. Xia J. Z., Xie F. L., Ran L. F., Xie X. P., Fan Y. M., Wu F. High-intensity focused ultrasound tumor ablation activates autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ultrasound Med. Biol.* 2012. Vol. 38(8). P. 1363–1371. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.03.009.
69. Yang R., Reilly C. R., Rescorla F. J., Sanghvi N. T., Fry F. J., Franklin T. D. Jr, Grosfeld J. L. Effects of high-intensity focused ultrasound in the treatment of experimental neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* 1992. Vol. 27. P. 246–250.
70. Ran L. F., Xie X. P., Xia J. Z., Xie F. L., Fan Y. M., Wu F. Specific antitumour immunity of HIFU-activated cytotoxic T lymphocytes after adoptive transfusion in tumour-bearing mice. *Int. J. Hyperthermia.* 2016. Vol. 32(2). P. 204–210. doi: 10.3109/02656736.2015.1112438.
71. den Brok M. H., Suttmuller R. P., van der Voort R., Bennink E. J., Figdor C. G., Ruers T. J., Adema G. J. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2004. Vol. 64(11). P. 4024–4029.
72. Lu P., Zhu X. Q., Xu Z. L., Zhou Q., Zhang J., Wu F. Increased infiltration of activated tumor-infiltrating lymphocytes after high intensity focused ultrasound ablation of human breast cancer. *Surgery.* 2009. Vol. 145. P. 286–293. doi:10.1016/j.surg.2008.10.010.
73. Dong B. W., Zhang J., Liang P., Yu X. L., Su L., Yu D. J. et al. Sequential pathological and immunologic analysis of percutaneous microwave coagulation therapy of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Hyperthermia.* 2003. Vol. 19(2). P. 119–133.
74. Zerbini A., Pilli M., Penna A., Pelosi G., Schianchi C., Molinari 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(2). P. 1139–1146.

75. Hansler J., Wissniewski T.T., Schuppan D., Witte A., Bernatik T., Hahn E.G., Strobel D. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. *World J. Gastroenterol.* 2006. Vol. 12(23). P. 3716–3721.
76. Zerbini A., Pilli M., Laccabue D., Pelosi G., Molinari A., Negri E. et al. Radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma stimulates autologous NK-cell response. *Gastroenterology.* 2010. Vol. 138(5). P. 1931–1942. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.051.
77. Widenmeyer M., Shebzukhov Y., Haen S.P., Schmidt D., Clasen S., Boss A. et al. Analysis of tumor antigen-specific T cells and antibodies in cancer patients treated with radiofrequency ablation. *Int. J. Cancer.* 2011. Vol. 128(11). P. 2653–2662. doi: 10.1002/ijc.25601.
78. Hiroishi K., Eguchi J., Baba T., Shimazaki T., Ishii S., Hiraide A. et al. Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 45(4). P. 451–458. doi: 10.1007/s00535-009-0155-2.
79. Herbst R.S., Soria J.C., Kowanzet M., Fine G.D., Hamid O., Gordon M.S. et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014. Vol. 515. P. 563–567.
80. Taube J.M., Klein A., Brahmer J.R., Xu H., Pan X., Kim J.H. et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res.* 2014. Vol. 20. P. 5064–5074.
81. Tumei P.C., Harview C.L., Yearley J.H., Shintaku I.P., Taylor E.J., Robert L. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014. Vol. 515. P. 568–571.
82. Diab A., McArthur H.L., Solomon S.B., Sacchini V., Comstock C., Maybody M. et al. A pilot study of preoperative (Pre-op), single-dose ipilimumab (Ipi) and/or cryoablation (Cryo) in women (pts) with early-stage/resectable breast cancer (ESBC). *ASCO Meeting Abstracts.* 2014. Vol. 32. P. 1098.
83. Page D.B., Yuan J., Redmond D., Wen Y.H., Durack J.C., Emerson R. et al. Deep Sequencing of T-cell Receptor DNA as a Biomarker of Clonally Expanded TILs in Breast Cancer after Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 2016. Vol. 4(10). P. 835–844.
84. Hodi F.S., Chesney J., Pavlick A.C., Robert C., Grossmann K.F., McDermott D.F. et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016. Vol. 17(11). P. 1558–1568. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30366-7.
85. Sznol M., Ferrucci P.F., Hogg D., Atkins M.B., Wolter P., Guidoboni M. et al. Pooled Analysis Safety Profile of Nivolumab and Ipilimumab Combination Therapy in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2017. Vol. 35(34). P. 3815–3822. doi: 10.1200/JCO.2016.72.1167.
86. Sibaud V., David I., Lamant L., Resseguier S., Radut R., Attal J. et al. Acute skin reaction suggestive of pembrolizumab-induced radiosensitization. *Melanoma Res.* 2015. Vol. 25(6). P. 555–558. doi: 10.1097/CMR.0000000000000191.
87. Chang X. Radiofrequency ablation of primary tumors combined with anti-programmed death-1 (PD-1) antibody results in an enhanced antitumor effect against advanced renal cell carcinoma. *J. Urology.* 2016. Vol. 195. No.4S, Suppl. Abstract MP03-07.
88. Chen Z., Shen S., Peng B., Tao J. Intratumoural GM-CSF microspheres and CTLA-4 blockade enhance the antitumour immunity induced by thermal ablation in a subcutaneous murine hepatoma model. *Int. J. Hyperthermia.* 2009. Vol. 25(5). P. 374–382. doi: 10.1080/02656730902976807.
89. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013. Vol. 39. P. 1–10.
90. Kim J.M., Chen D.S. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Annals of Oncology.* Vol. 27. P. 1492–1504. 2016 doi:10.1093/annonc/mdw217.
91. Ferguson T.A., Choi J., Green D.R. Armed response: how dying cells influence T-cell functions. *Immunity.* 2011. Vol. 24. P. 77–88.
92. Golden E.B., Apetoh L. Radiotherapy and immunogenic cell death. *Semin. Radiat. Oncol.* Vol. 25(1). P. 11–17. doi:10.1016/j.semradonc.2014.07.005.
93. Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza N., Panaretakis T., Kepp O. et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* 2008. Vol. 20. P. 504–511. doi:10.1016/j.coi.2008.05.007.
94. Chalovich J.M., Eisenberg E. NIH Public Access. *Biophys. Chem.* 2012. Vol. 257. P. 2432–2437.
95. Curley C.T., Sheybani N.D., Bullock T.N., Price R.J. Focused Ultrasound Immunotherapy for Central Nervous System Pathologies: Challenges and Opportunities. *Theranostics.* 2017. Vol. 7(15). P. 3608–3623. doi: 10.7150/thno.21225.
96. Blank C.U., Haanen J.B., Ribas A., Schumacher T.N. CANCER IMMUNOLOGY. The “cancer immunogram”. *Science.* 2016. Vol. 352(6286). P. 658–660. doi: 10.1126/science.aaf2834.