

Г.А. Замотаєва, Н.М. Степура

ФЕНОТИПОВИЙ ПРОФІЛЬ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У РАННІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ РАДІОЙОДТЕРАПІЇ

ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин імені В.П. Комісаренка АМН України", Київ

ВСТУП

Наразі у лікуванні диференційованих форм раку щитоподібної залози (ЩЗ) застосовується комплексний підхід, що включає хірургічне лікування, радіойодтерапію (РЙТ) та супресивну гормонотерапію [1]. РЙТ є найефективнішим засобом променевої терапії за наявності залишкової тканини ЩЗ і регіонарних метастазів, а за наявності віддалених метастазів найчастіше виявляється єдиним методом лікування [2].

Інформація щодо побічних наслідків впливу РЙТ на інші органи та системи вкрай обмежена і досить суперечлива. До недавнього часу існувала думка, що через високу органотропність і селективне накопичення йоду-131 у ЩЗ його радіаційний вплив на організм у цілому незначний. Проте в лімфоцитах крові хворих, які пройшли лікування радіоактивним йодом, виявлено різноманітні хромосомні пошкодження, що зберігаються протягом багатьох років [3-6].

Загальновідомо, що чутливість клітини до радіаційного впливу залежить від її метаболічної активності, стадії (ступеня) диференціації та швидкості поділу. Лімфоцити, попри невеликі темпи проліферації, мають високу радіочутливість. Тяжкість і тривалість порушень клітинного складу периферичної крові залежить від масштабів опромінення кровотворної тканини кісткового мозку: дози опромінення, розподілення її в часі, а також від типу іонізуючої радіації.

Переважає кількість публікацій з питань радіаційної імунології стосується ефекту рентгенівського та гамма-випромінювання. Дослідженню стану імунної системи за умов дії радіоактивних ізотопів йоду присвячено небагато праць. Наявні в науковій літературі дані головним чином стосуються дослідження лімфопоезу та субпопуляційного складу лімфоцитів крові в осіб, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи [7-9]. Так, тривалий моніторинг стану клітинного імунітету та гіпофізарно-ти-

реоїдної системи у дітей і підлітків, які зазнали іонізуючого опромінення від радіоактивних ізотопів цезію та йоду внаслідок аварії на ЧАЕС, виявив суттєві зміни у субпопуляційному складі лімфоцитів, а також встановив зв'язок між ступенем імунних порушень і поглинутою дозою на ЩЗ [10]. Показано, що наслідки впливу випромінювання на імунну систему можуть зберігатися тривалий час: 5-10 і більше років.

Разом із тим, слід зазначити, що результати цих досліджень вкрай обмежено можуть бути екстрапольовані на умови радіойодтерапії, оскільки, по-перше, впливу ^{131}I зазнають хворі з тяжкою онкологічною патологією і часто вже наявними змінами у системі імунітету, по-друге, спектр, дози й умови радіаційного опромінення суттєво різні. Публікації, що прямо стосуються впливу радіойодтерапії на фенотипові показники лімфоцитів у хворих на РЩЗ, — поодинокі [11, 12], проте такі дослідження мають суттєве практичне й наукове значення. Система імунітету є однією з головних мішеней негативного впливу іонізуючого опромінення на організм, а її стан — важливим чинником прогнозу онкологічних захворювань і якості життя хворих.

З огляду на це метою нашої роботи було вивчення впливу йоду-131, застосованого в терапевтичних дозах, на фенотиповий склад лімфоцитів периферичної крові у хворих на диференційовану форму раку ЩЗ.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Обстежено 26 хворих на рак ЩЗ (у 24 пацієнтів діагностовано папілярну карциному, у 2 — фолікулярний рак). Вік хворих був у межах від 38 до 70 років ($52,4 \pm 1,7$ року). За статтю розподіл хворих був таким: жінки — 18 (69%) і чоловіки — 8 (31%). 16 пацієнтів (61,5%) мали метастатичні ураження легенів, лімфовузлів ший та середостіння, 7 (26,9%) — легенів, кісток і лімфовузлів ший, 3 особи (11,5%) — лімфовузлів середостіння, легенів і головного мозку. У 7

хворих розмір пухлини відповідав T2-3, у решти осіб виявлено екстратиреоїдне поширення пухлини (T4). Приймання лікувальних (4130-4730 МБк) активностей йоду-131 проводилося перорально натще у вигляді 20-30 мл ізотонічного розчину йодиду натрію ("Радіофармпрепарат", Узбекистан) або у формі капсул виробництва фірми "Polatom" (Польща).

Контролем була група донорів відповідної вікової категорії у кількості 29 осіб.

Підготування проб здійснювали за стандартним протоколом [13]. До кожної пробірки, куди попередньо додавали 20 мкл відповідного моноклонального антитіла, вносили по 100 мкл гепаринізованої венозної крові (20 Од гепарину на 1 мл крові). Зразки перемішували на вортексі та інкубували у темряві 15-30 хв. за температури 20-25°C.

Наступним етапом був лізис еритроцитів. Для цього концентрований лізуючий розчин розводили дистильованою водою у 10 разів, вносили до кожної пробірки по 2 мл готового розчину, струшували на вортексі та інкубували у темряві 10-12 хв. за температури 20-25°C (до прозорості розчину).

Лейкоцити осаджували центрифугуванням за 1000 об./хв. (200-300 g) протягом 5 хв. Осад струшували на вортексі та двічі відмивали 2 мл ЗФР із 0,1% натрію азиду. Після осаджування лейкоцитів шляхом центрифугування за 1000 об./хв. 5 хв. до кожної пробірки вносили 500 мкл ЗФР із 0,1% натрію азиду. Для фіксації лімфоцитів додавали по 500 мкл 1% розчину параформальдегіду та знову струшували на вортексі. До аналізу препарати зберігали за температури 2-8°C щонайбільше 24 години. Вимірювання здійснювали на проточному цитофлуориметрі "FACScan", оснащеному аргонним лазером, із довжиною хвилі 488 нм, із використанням комерційної програми "CellQuest". Для вимірювання флуоресценції за ФІТЦ використовували вузькосмугові фільтри розміром 530/30 нм, ФЕ — 650/30 нм, потужність лазера — 100 мВт. Аналіз клітин у зразку крові проводили у гейті лімфоцитів.

У дослідженнях субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові використовували таку панель моноклональних антитіл: CD19 (В-лімфоцити); CD3 (загальна популяція Т-лімфоцитів); CD4 (хелпери/індуктори); CD8 (цитотоксичні/супресори); CD16 і D56 (при-

родні клітини-кілери), а також маркери активації лімфоцитів — HLA-DR і CD95. Моноклональні антитіла проти CD56 мічені фікоеритрином, решта — флуоресцеїнізотіоціанатом.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження імунотипу лімфоцитів периферичної крові у хворих на РЩЗ проводили напередодні радіойодтерапії та на 6-у добу після приймання ізотопу.

Результати визначення наведено у таблиці.

Вміст у периферичній крові лімфоцитів різного фенотипу, що вказує на належність клітин до тієї або іншої популяції та субпопуляції, є одним із найбільш інформативних і важливих показників стану імунної системи. Адекватна та ефективна імунна відповідь вимагає взаємодії різних типів імунокомпетентних клітин. Як свідчать наведені дані, у хворих на РЩЗ ще до початку радіотерапії спостерігаються дещо змінні відносно норми імунотипові показники: вірогідно знижено відносний вміст Т- і В-популяцій лімфоцитів ($p < 0,05$ і $p < 0,001$ відповідно) та підвищено експресію молекули CD95 ($p < 0,01$).

Через тиждень після введення терапевтичної дози ^{131}I спостерігалось ще більше зниження загальної кількості Т-лімфоцитів (CD3+). Діапазон значень вмісту CD3+-клітин у межах кожної групи був таким: донори — 64-88% (середнє значення — $74,67 \pm 2,07\%$); перед радіойодтерапією — 56-88% ($68,28 \pm 2,09\%$); після приймання ^{131}I — 34-72% ($61,08 \pm 2,82\%$). Аналіз індивідуальних значень вмісту Т-лімфоцитів показав, що серед донорів лише у 7% рівень CD3+ був нижчим від 65%. Вміст CD3+, нижчий від 65%, відзначено у 42% (11 із 26) хворих перед РЙТ і у 69% (18 із 26) хворих після РЙТ. Кількість пацієнтів зі зниженим вмістом Т-лімфоцитів у ранні терміни після приймання ^{131}I була вірогідно ($p < 0,05$) вища, ніж у групах порівняння.

Визначення вмісту основних Т-клітинних субпопуляцій — CD4+ і CD8+ у периферичній крові хворих у ранній термін після приймання радіойоду виявило кількісний перерозподіл субпопуляційного складу Т-лімфоцитів: вміст CD8+-лімфоцитів (супресорів/цитотоксичних клітин) змінювався незначно, а кількість хелперних клітин ставала вірогідно меншою, ніж перед РЙТ: $34,93 \pm 1,07\%$ і $40,69 \pm 1,42\%$ відповідно ($p < 0,05$).

Таблиця

Кількість лімфоцитів (%) різного фенотипу у периферичній крові хворих на диференційований РЩЗ у ранні терміни після приймання терапевтичних доз ^{131}I ($M \pm m$)

Фенотип лімфоцитів	Здорові донори	Перед радіойодтерапією	На 6-у добу після приймання ^{131}I
CD3+	74,67 ± 2,07	68,28 ± 2,09 ^a	61,08 ± 2,82 ^{ab}
CD4+	43,67 ± 1,54	40,69 ± 1,42	34,93 ± 1,07 ^{ab}
CD8+	26,76 ± 1,05	28,87 ± 1,94	31,69 ± 1,98 ^a
IPI	1,88 ± 0,10	1,65 ± 0,20	1,27 ± 0,15 ^a
CD19+	11,76 ± 0,79	8,89 ± 0,83 ^a	5,82 ± 0,56 ^{ab}
CD16+	15,68 ± 2,02	20,58 ± 3,76	21,25 ± 3,39
CD56+	20,13 ± 2,41	21,42 ± 2,17	27,36 ± 2,69 ^a
HLA-DR+	11,12 ± 0,97	12,88 ± 1,26	8,39 ± 0,71 ^{ab}
CD95+	37,28 ± 3,24	47,01 ± 3,27 ^a	62,34 ± 5,83 ^{ab}

Примітки: ^a — різниця вірогідна відносно групи практично здорових осіб; ^b — різниця вірогідна відносно вихідних показників (напередодні проведення радіойодтерапії).

Зменшення загальної кількості Т-лімфоцитів у периферичній крові хворих на РЩЗ у поєднанні зі значним зниженням вмісту CD4+-клітин може свідчити про функціональну недостатність Т-клітинної ланки імунітету.

Наслідком дисбалансу субпопуляційного складу лімфоцитів є порушення імунорегуляторного індексу (IPI) — співвідношення CD4/CD8. В усіх обстежених хворих на тиреоїдний рак виявлено помірне зменшення IPI. Слід зазначити, що хоча показники IPI після РЙТ були нижчими від вихідних, різниця була вірогідною лише із контрольними значеннями.

Вміст природних клітин-кілерів (ПКК) визначали за експресією маркерів CD16 і CD56. Зрілі циркулюючі ПКК мають фенотип CD3-CD16+CD56+ і відрізняються від Т-клітин відсутністю Т-клітинного рецептора. Серед ПКК трапляються підкласи CD16-CD56+ і CD16+CD56-. Вважається, що молекула CD16 бере участь у клітинній цитотоксичності, опосередкованій ПКК. CD56 — адгезійна молекула, друга назва NCAM — neutral cell adhe-

sion molecule. У більшості хворих кількість CD16+-і CD56+-клітин вища за норму. Попри тенденцію до збільшення ПКК у ранні терміни після РЙТ через значні коливання індивідуальних значень статистично значущих відмінностей не встановлено.

Найбільших змін зазнали В-лімфоцити, що підтверджує дані наукової літератури про високу радіочутливість цієї популяції. Зниження кількості CD19+-лімфоцитів після РЙТ спостерігалось у 70% хворих, а у деяких із них вміст цих клітин падав у 2-3 рази.

Характерним наслідком раннього ефекту радіойоду було суттєве (більше, ніж у 1,5 разу) зменшення вмісту HLA-DR+-клітин. HLA-DR — мембранний білок, що бере участь у презентації антигенів та експресується на В-лімфоцитах, моноцитах й активованих Т-клітинах. Наслідком зниження експресії цього активційного маркера на клітинах імунної системи може бути неповноцінність формування імунної відповіді.

Встановлено, що ^{131}I , застосований у тера-

певтичних дозах, спричиняє значне збільшення вмісту CD95-лімфоцитів у периферичній крові хворих, принаймні у перші дні після опромінення. Підвищення рівня спонтанної експресії Fas-рецептора (CD95) на мембрані лімфоцитів свідчить про збільшення ймовірності апоптозу цих клітин. Порушення процесів апоптозу призводить до суттєвих розладів в імунній системі, що може проявитися розвитком аутоімунних і лімфопроліферативних захворювань, вторинних імунодефіцитів.

Отже, дослідження фенотипу клітин периферичної крові хворих на рак щитоподібної залози у процесі радіойодтерапії виявило, що вже на 6-у добу після введення радіоїоду в лікувальних дозах вірогідно змінюється популяційний склад лімфоцитів, а також експресія маркерів активації та апоптозу.

Подальший імунологічний моніторинг хворих, яким проведено лікування радіоактивним йодом, дасть можливість визначити тривалість порушень, терміни та повноту відновлення системи імунітету.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на рак щитоподібної залози на 6-у добу після приймання радіоїоду в терапевтичних дозах відбуваються суттєві зміни популяційного складу лімфоцитів периферичної крові.
2. Радіойодтерапія призводить до зниження вмісту Т-лімфоцитів, головним чином за рахунок субпопуляції хелперних клітин.
3. Кількість супресорів/цитотоксичних лімфоцитів і клітин-кілерів у хворих на РЩЗ у ранні терміни після радіойодтерапії вірогідно не змінюється.
4. Найбільш радіочутливими виявилися В-лімфоцити, вміст яких після радіойодтерапії знижувався більше, ніж у 1,5 разу.
5. Наслідком дії радіоїоду є зниження кількості активованих HLA-DR+-клітин і збільшення кількості лімфоцитів, що експресують Fas-рецептор.

ЛІТЕРАТУРА

1. Schlumberger M., Pacini F. Wiersinga W. et al. Follow-up and management of differentiated thyroid carcinoma: a European perspective in clinical practice // *Eur. J. Endocrinology*. — 2004. — V.151. — P. 539-548.

2. Robbins M.J., Pacini F., Schlumberger M., Harmer C. et al. Post surgical use of radioiodine (^{131}I) in patients with papillary and follicular thyroid cancer and the issue of remnant ablation: a consensus report // *Eur. J. Endocrinology*. — 2005. — V.153. — P. 651-659.
3. Gutierrez S., Carbonell E., Galofre P. Et al. Cytogenetic damage after ^{131}I -iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test // *Eur. J. Nucl. Med.* — 1999. — V.26, №12. — P. 1589-1596.
4. Ballard M., Gemignani F., Bodei L., Ferdeghini M., Rossi A.M., Migliore L., Barale R. Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine- ^{131}I // *Mutat. Res.* — 2002. — V.514, №1-2. — P. 77-85.
5. Watanabe N., Kanegane H., Kinuya S. et al. The radiotoxicity of ^{131}I therapy of thyroid cancer: assessment by micronucleus assay of B lymphocytes // *J. Nucl. Med.* — 2004. — V.45, №4. — P. 608-611.
6. Erselcan T., Sungu S., Ozdemir S., Turgut B., Dogan D., Ozdemir O. Iodine- ^{131}I treatment and chromosomal damage: in vivo dose-effect relationship // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. — 2004. — V.31, №5. — P. 676-684.
7. Комиссаренко С.В., Зак К.П., Хоменко Б.М., Лукинов Д.И., Карлова Н.П., Черняк С.И. Содержание, ультраструктура и функция основных популяций лимфоцитов крови человека / Радиация и иммунитет человека. Влияние малых доз излучения, возникших в результате аварии на ЧАЭС, на клетки кроветворной и иммунной систем человека / Под ред. С.В.Комиссаренко и К.П.Зака. — К.: Наукова думка, 1994. — 110 с.
8. Зубрихина Г., Ленская Р., Блиндарь В. Лимфопенические реакции со снижением числа CD2, CD4, CD8, CD19 субпопуляций в крови у детей 7-15 лет, проживающих в селах Красногорского района Брянской области с загрязнением почвы свыше 15 Ки/км² // *Гематология и трансфузиология*. — 1995. — №40(2). — С. 32.
9. Чумак А.А., Базыка Д.А., Беляева Н.В. Субпопуляции иммунокомпетентных клеток у участников ликвидации последствий Чернобыльской катастрофы // *Иммунология*. — 1992. — №2. — С. 52-55.
10. Лукьянова Е.М., Антипкин Ю., Чернишов

- В.П., Выхованец Е.В. Ионизирующее излучение и иммунная система у детей. — Киев: Эксперт, 2003. — С. 111-175.
11. Tofani A., Sciuto R., Cioffi R.P., Pasqualoni R., Rea S., Festa A., Gandolfo G.M., Arista M.C., Maini C.L. Radioiodine-induced changes in lymphocyte subsets in patients with differentiated thyroid carcinoma. // Eur. J. Nucl. Med. — 1999. — V.26, №8. — P. 824-829.
 12. Воронцова Т.В., Шаврова Е.Н., Кучинская Э.А. и др. Состояние иммунной системы детей, больных раком щитовидной железы, получающих гормональное лечение и радиойодтерапию // Иммунология, аллергология, инфектология. — 2001. — №2. — С. 38-45.
 13. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. — М. — 2001. — 53 с.
 14. Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина. — 1999. — С. 479-486.

РЕЗЮМЕ

Фенотипический профиль лимфоцитов периферической крови у больных раком щитовидной железы в ранние сроки после радиойодтерапии

Г.А. Замотаева, Н.Н. Степура

Проведено исследование фенотипа лимфоцитов периферической крови у 26 больных с дифференцированной формой рака щитовидной железы в ранние сроки (6 дней) после приема терапевтических доз радиойода (4130-4730 МБк). Результаты сравнивались с исходными показателями до радиойодтерапии, а также с показателями доноров. Обнаружены существенные изменения в популяционном составе лимфоцитов крови через неделю после

введения ^{131}I : снижение содержания CD19+, CD3+ и активированных HLA-DR+-клеток, дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, увеличение числа клеток, экспрессирующих CD95. Необходим дальнейший иммунологический мониторинг больных, которым проводится радиойодтерапия, для оценки иммуногематологических последствий воздействия ^{131}I , определения степени и длительности нарушений.

Ключевые слова: радиойодтерапия, рак щитовидной железы, фенотип лимфоцитов.

SUMMARY

Phenotypic profile of peripheral blood lymphocytes in thyroid cancer patients in early terms after radioiodine therapy

G. Zamotayeva, N. Stepura

The authors have carried out a study of the phenotype of peripheral blood lymphocytes in 26 patients with differentiated form of thyroid cancer in early terms (6 days) after administration of therapeutic doses of radioiodine (4130-4730 MBq). The results were compared with baseline indicators in patients before radioiodine therapy, and in donors. Significant changes have been revealed in blood lymphocyte phenotype in one week after I-131 administration: a decrease in CD19+, CD3+ content and activated HLA-DR+-cells, an unbalance of T-lymphocyte subpopulations, an increase in the number of cells expressing CD95. Further immunological monitoring of patients receiving radioiodine therapy is needed for an estimation of immuno-hematological after-effects of radioiodine, for determining their degree and duration.

Key words: radioiodine therapy, thyroid cancer, lymphocyte phenotype.