

Г.А. Замотасєва, Н.М. Степура

ВПЛИВ РАДІОЙОДУ НА СКЛАД ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ МОЛОДОГО ВІКУ З ВІДДАЛЕНИМИ МЕТАСТАЗАМИ

ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України", Київ

ВСТУП

У комплексному лікуванні диференційованих форм раку щитоподібної залози (РЩЗ) застосовується радіойодтерапія (РЙТ), яка проводиться з метою руйнування залишкової тканини ЩЗ і виявлення та лікування метастазів [1, 2].

Якщо раніше радіоактивний йод застосовували переважно для рутинної діагностики, терапії легеневих метастазів, а також у хворих із високим ризиком розвитку рецидиву хвороби, то сьогодні у багатьох клінічних закладах РЙТ є обов'язковим компонентом протоколу лікування диференційованого тиреоїдного раку. Перегляд традиційних підходів до лікування РЩЗ і пов'язане з цим широке застосування РЙТ, у тому числі у хворих молодого віку, привернули увагу клініцистів до ретельного дослідження безпосередніх і віддалених наслідків дії великих доз радіойоду на різні органи та системи організму, зокрема на імунну, стан якої належить до чинників, що значною мірою впливають на прогноз захворювання та якість життя хворих на рак. Хоча йод-131 давно використовується в медичній практиці для лікування токсичного зоба та РЩЗ, інформація щодо його побічних дій на інші органи і системи є вкрай обмеженою та досить суперечливою. Вважається, що концентрація йоду в крові у декілька разів менша, ніж у щитоподібній залозі та високодиференційованих пухлинах і їх метастазах через властивість їх клітин вибірково його поглинати. Тому до недавнього часу існувала думка, що радіаційний вплив на організм у цілому незначний. Проте дослідження останніх років поставили під сумнів уявлення про цілковиту безпеку РЙТ. Розрахунками, у тому числі з використанням біологічних методів дозиметрії, встановлено, що середні еквівалентні дози опромінення клітин кісткового мозку та периферичної крові внаслідок введення терапевтичних доз ^{131}I складають від 0,32 Гр до 0,54 Гр. З кожним наступним курсом РЙТ відбувається акумуляція

поглинутих доз, які за 6-7 ін'єкцій ^{131}I можуть досягати 3-3,5 Гр [3, 4].

Отже, застосування йоду-131 у лікуванні РЩЗ із беззаперечним превалюванням терапевтичного ефекту може справляти негативний вплив на інші органи та системи організму. Імунна система є однією з найбільш чутливих до опромінення, а деякі типи лімфоцитів – ранніми індикаторами радіаційного ураження. Променева терапія часто спричинює лімфоїдне спорожнення, тяжкість якого залежить від дози та типу опромінення, шляхів введення та розподілення ізотопу в організмі.

Вміст у периферичній крові лімфоцитів різного фенотипу, що вказує на належність клітин до тієї чи іншої популяції або субпопуляції, є одним з найбільш інформативних і важливих показників стану імунної системи. Адекватна та ефективна імунна відповідь вимагає взаємодії різних типів імунокомпетентних клітин. За умов терапії радіонуклідами частіше виявляють різною мірою виражену кількісну та/або функціональну недостатність тих чи інших субпопуляцій клітин, що може реалізуватися на рівні організму у вигляді соматичної патології – захворювань травної, нервової, серцево-судинної, дихальної систем, автоімунних та інфекційних хвороб.

Наявні в науковій літературі результати дослідження лімфопоезу та субпопуляційного складу лімфоцитів крові за умов дії ізотопів йоду отримано головним чином в осіб, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи [5-8]. Так, у перші місяці після опромінення у постраждалих внаслідок аварії спостерігалось різке зниження числа В-лімфоцитів, $\text{CD}3^+$ і $\text{CD}4^+$ -лімфоцитів, а кількість $\text{CD}8^+$ -клітин перевищувала таку $\text{CD}4^+$ [9, 10]. Через 4-6 років після аварії виявляли зниження вмісту Т-лімфоцитів і зміни їх субпопуляційного складу [11, 12]. У віддалені терміни після катастрофи у ліквідаторів діагностували Т-імунодефіцит із вираженим пригнічен-

ням популяції хелперів/індукторів (CD4⁺) [13, 14]. Крім того, у дітей і підлітків, які зазнали іонізуючого опромінення радіоактивними ізотопами цезію та йоду внаслідок аварії на ЧАЕС, виявлено суттєві зміни у субпопуляційному складі лімфоцитів [15]. Проте результати цих досліджень вкрай обмежено можна екстраполювати на умови радіоїодтерапії, оскільки, по-перше, впливу йоду-131 зазнають хворі з тяжкою онкопатологією з уже наявними змінами в імунній системі, по-друге, дози та умови опромінення суттєво різняться.

Публікації, що стосуються впливу РЙТ на фенотипові показники лімфоцитів у хворих на РЩЗ, є поодинокими та неоднозначними [16, 17].

Одним із найважливіших чинників, що модифікують ефект опромінення на організм, є наявність метастатичного ураження органів. З огляду на це мета роботи полягала у визначенні впливу йоду-131 на склад лімфоцитів різного фенотипу залежно від наявності віддалених метастазів у хворих молодого віку.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Обстежено 50 хворих на диференційований РЩЗ віком від 19 до 39 років, які проходили лікування у відділенні клінічної радіології ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України".

Пацієнтів розподілили на дві групи. Група А – 24 хворі на РЩЗ без віддалених метастазів, середній вік – 29,4±1,1 року. Серед обстежених було 20 жінок і 4 чоловіки. Доза радіоїоду складала від 3815 кБк до 5000 кБк. Група Б налічувала 26 хворих на РЩЗ (18 жінок і 8 чоловіків) із віддаленими метастазами, середній вік – 27,8±1,2 року. Доза йоду-131 у цій групі складала від 4000 кБк до 6570 кБк. Контрольну групу склали 22 донори (15 жінок і 7 чоловіків), середній вік – 29,2±1,4 року.

Дослідження спектра лімфоцитів периферичної крові проводили напередодні РЙТ і на 6-ту добу після приймання ізотопу методом проточної цитометрії [18]. Для визначення експресії поверхневих маркерів лімфоцитів використовували панель прямо мічених моноклональних антитіл (BD Pharmingen, США; Сорбент, РФ): CD19 (В-лімфоцити); CD3 (загальна популяція Т-лімфоцитів); CD4 (хелпери/індуктори); CD8 (цитотоксичні супресори); CD16 і CD56 (природні клітини-кілери), а також маркери активації лімфоцитів HLA-DR і CD95. Моноклональні антитіла

проти CD56 – мічені фікоеритрином (ФЕ), решта – флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом (ФІТЦ). Для виділення Трег проводили оцінку інтенсивності флуоресценції CD25. Серед CD4⁺CD25⁺-клітин вирізняють клітини з високою експресією CD25 (власне Трег – CD25^{bright}) і клітини з низькою експресією CD25 – нещодавно активовані Т-клітини (CD25^{dim}). Підготовку проб здійснювали за стандартним протоколом [18]. Вимірювання проводили 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 складала 100 мВт. Аналіз клітин у зразку крові проводили у гейті лімфоцитів.

Отримані дані опрацьовували методом варіаційної статистики з обчисленням t-критерію Стьюдента. Різницю вважали вірогідною за $p < 0,05$.

Перед початком роботи було отримано інформовану згоду від пацієнтів і позитивне рішення комісії з медичної етики ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Результати визначення відносної кількості лімфоцитів основних субпопуляцій у периферичній крові донорів і хворих на тиреоїдний рак напередодні проведення радіоїодтерапії та на 6-ту добу після приймання I-131 наведено у таблиці.

Як видно з наведених даних, ще перед початком РЙТ між групами спостерігалася деяка різниця. Спільним для обох груп хворих на РЩЗ було зниження вмісту популяції Т-лімфоцитів (CD3⁺). Але якщо для групи А це було єдиною статистично значущою відмінністю від контролю, то у хворих із легеневидами метастазами (група Б) виявлено також вірогідне зменшення CD4⁺-клітин (Т-хелпери) і CD4⁺CD25⁺-клітин (регуляторні лімфоцити, Трег) на 20% і 25% відповідно та збільшення в 1,3 разу CD16⁺CD56⁺-клітин (природні клітини-кілери).

На 6-ту добу після приймання терапевтичної дози ¹³¹I у хворих без і з наявністю віддалених метастазів збільшувався вміст CD8⁺-лімфоцитів на 14% і 16% відповідно ($p < 0,05$). Кількість Т-хелперів у цей термін дещо знижувала-

Таблиця

Вміст лімфоцитів різного фенотипу у периферичній крові хворих на РЩЗ молодого віку залежно від наявності віддалених метастазів (%) ($M \pm m$)

Фенотип лімфоцитів	Контрольна група (донори)	Хворі на РЩЗ без віддалених метастазів (А)		Хворі на РЩЗ із віддаленими метастазами (Б)	
		перед РЙТ	після РЙТ	перед РЙТ	після РЙТ
CD3 ⁺	76,64±1,61	72,44±1,01 ^a	72,04±1,28 ^a	69,85±0,96 ^a	68,89±1,88 ^a
CD4 ⁺	46,50±1,86	43,04±1,29	41,40±1,23 ^a	39,12±1,24 ^{ac}	36,89±1,30 ^{ac}
CD8 ⁺	26,57±1,39	28,92±0,91	33,04±1,19 ^{ab}	27,54±1,01	31,95±1,54 ^{ab}
IPI	1,86±0,17	1,54±0,08	1,31±0,07 ^{ab}	1,50±0,09	1,22±0,09 ^{ab}
CD19 ⁺	10,00±0,74	8,68±0,69	5,64±0,51 ^{ab}	9,62±0,59	6,72±0,59 ^{ab}
CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,00±1,48	14,68±1,13	15,88±1,20	17,08±1,08 ^a	22,00±1,86 ^{abc}
HLA-DR ⁺	19,93±1,63	20,52±1,05	20,48±1,09	22,85±1,19	19,37±1,30
CD95 ⁺	45,14±1,70	50,00±1,51 ^a	62,92±2,03 ^{ab}	47,69±2,07	62,00±2,48 ^{ab}
CD4 ⁺ CD25 ⁺	19,36±1,51	18,88±0,75	21,40±0,86 ^b	15,58±0,90 ^{ac}	18,53±1,15 ^{bc}

Примітка: ^a – $p < 0,05$ відносно групи донорів; ^b – $p < 0,05$ відносно показників перед проведенням радіойодтерапії; ^c – $p < 0,05$ відносно показників хворих без віддалених метастазів.

ся. Разом із тим слід зазначити, що хоча кількість CD4⁺-клітин після РЙТ була нижчою за вихідну в обох групах хворих, різниця була вірогідною лише відносно показника у контролі.

Як наслідок дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів змінювався імунорегуляторний індекс (IPI). В усіх хворих на тиреоїдний рак напередодні РЙТ виявлено помірне зменшення IPI відносно контрольної групи, яке після введення йоду-131 у пацієнтів обох груп набуло статистичної значущості. Між групами вірогідної різниці у цьому показнику як перед, так і після приймання радіойоду не відзначено.

Вміст природних клітин-кілерів (ПКК) визначали за експресією маркерів CD16 і CD56. У більшості хворих із віддаленими метастазами кількість CD16⁺CD56⁺-клітин перевищувала норму. На 6-ту добу після РЙТ вміст ПКК у цій групі збільшувався на 30% від вихідного ($p < 0,01$) і на 70% ($p < 0,001$) від контрольного показника. У хворих без метастазів, попри тенденцію до збільшення, вірогідних змін вмісту ПКК не виявлено.

Рівень експресії Fas-рецептора (CD95) клітинами периферичної крові у хворих на тиреоїдний рак суттєво не різнився між групами. Після терапії радіойодом вміст CD95⁺-лімфоцитів істотно збільшувався в обох групах хворих: в групі А – на 26% ($p < 0,001$), у групі Б – на 30% ($p < 0,001$). Понаднормова експресія CD95 на мембрані лімфоцитів свідчить про збільшення імовірності апоптозу цих клітин. Порушення процесів апоптозу лімфоїдних клітин може призвес-

ти до суттєвих розладів в імунній системі та проявитися розвитком аутоімунних та лімфопроліферативних захворювань, вторинних імунodefіцитів.

Найбільших змін після введення радіойоду зазнавала кількість В-лімфоцитів (CD19⁺), що підтверджує дані наукової літератури про високу радіочутливість цієї популяції клітин. Після РЙТ відносна кількість CD19⁺-лімфоцитів знижувалась майже однаковою мірою: у 1,5 разу у групі А ($p < 0,001$) і в 1,4 разу у групі Б ($p < 0,001$).

Кількість клітин, що експресують маркер активації – HLA-DR, у хворих молодого віку була не зміненою і в процесі радіойодтерапії залишалася в межах норми.

Було проведено визначення субпопуляції регуляторних Т-клітин. Treg-клітини формуються у процесі нормального диференціювання в тимусі, а не внаслідок антигенної стимуляції, тому їх ще називають природними регуляторними клітинами – nTreg. Вважається, що функції регуляторних клітин виконують не всі CD4⁺CD25⁺-клітини, а лише фракція з високим рівнем експресії CD25 (CD4⁺CD25^{high}). Їх вміст у людини складає від 2% до 3% загального вмісту периферичних CD4⁺-клітин. Чисельність та активність регуляторних Т-клітин контролюється генетично. Біологічна функція цих клітин полягає у запобіганні аутоімунним процесам і регуляції імунної відповіді, вони також сприяють нормальному перебігу вагітності та забезпечують захист нормальної мікрофлори кишечника. Негативним проявом супресорних властивостей

Treg є допомога малігнізованим клітинам уникнути імунного нагляду. Слід зазначити, що оскільки молекула CD25 експресується як на активованих ефекторних клітинах, так і на Treg, популяція CD4⁺CD25⁺-клітин включає два різних типи клітин, що вимагає обережної інтерпретації отриманих даних.

Порівняльний аналіз отриманих даних виявив, що вміст CD4⁺CD25⁺-клітин в осіб групи А не відрізнявся від контрольних значень, у той час як у хворих із легеневидами метастазами він був зниженим ($p < 0,05$). На 6-й день після введення радіоїоду відносна кількість клітин цього фенотипу помірно збільшувалася ($p < 0,05$). Такий напрямок змін спостерігався в обох групах хворих.

ВИСНОВКИ

1. У молодих хворих на РЩЗ із віддаленими метастазами зміни спектра лімфоцитів периферичної крові є більш значними, ніж у пацієнтів без метастазів.

2. Радіоїодотерапія у хворих на РЩЗ молодого віку призводить до значного зниження кількості В-лімфоцитів та імунорегуляторного індексу, помірного збільшення вмісту субпопуляції супресорних/цитотоксичних лімфоцитів і регуляторних Т-клітин, клітин-кілерів та до підвищення рівня експресії CD95 незалежно від наявності або відсутності віддалених метастазів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Follow-up and management of differentiated thyroid carcinoma: a European perspective in clinical practice* / M. Schlumberger, F. Pacini, W. Wiersinga [et al.] // *Eur. J. Endocrinology*. – 2004. – Vol. 151. – P. 539-548.
2. *Post surgical use of radioiodine (131I) in patients with papillary and follicular thyroid cancer and the issue of remnant ablation: a consensus report* / M.J. Robbins, F. Pacini, M. Schlumberger [et al.] // *Eur. J. Endocrinology*. – 2005. – Vol. 153. – P. 651-659.
3. *Biological dosimetry in patients treated with iodine 131 for differentiated thyroid carcinoma* / R. M.Kacher, J.D. Legal, M. Schlumberger [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 1996. – №37. – P. 1860-1864.
4. *Biological dosimetry in thyroid cancer patients after repeated treatments with iodine-131* / R. M.Kacher, M. Schlumberger, J.D. Legal [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 1998. – №39(5). – P. 825-929.
5. *Immunologic Status of Children with Thyroid Cancer Living near Chernobyl (flow cytometric and electron microscopic study)* / K.P. Zak, M.A. Gruzov, E.V. Bolshova [et al.] // *The radiological consequences of the Chernobyl accident: abstr.* – 1996. – P. 821-823.
6. *Зубрихина Г. 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* / Г. Зубрихина, Р. Ленская, В. Блиндарь // *Гематология и трансфузиология*. – 1995. – Т. 40, №2. – С. 32.
7. *Чумак А.А. Субпопуляции иммунокомпетентных клеток у участников ликвидации последствий Чернобыльской катастрофы* / А.А. Чумак, Д.А. Базыка, Н.В. Беляева // *Иммунология*. – 1992. – №2. – С. 52-55.
8. *Чернишов А.В. Особенности субпопуляционного склада лимфоцитов участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС у віддалені терміни* / А.В. Чернишов // *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. Зб. наукових праць*. – вип. 9. Київ: ІВЦ "Алкон". – С. 133-136.
9. *Петров Р. Итоги трехлетнего иммунологического мониторинга за контингентом лиц, участвующих в ликвидации последствий аварии (ЛПА) на ЧАЭС* / Р. Петров, Н. Орадовская. – М., 1990. – 206 с.
10. *Калинин Н. Характеристика изменений пула лимфоцитов периферической крови после тотального облучения* / Н. Калинин, А. Баранов // *Радиобиология*. – 1990. – вып. 4, №30. – С. 563.
11. *Михеенко Т.В. Отдаленные последствия воздействия факторов аварии на ЧАЭС на иммунную систему человека* / Т.В. Михеенко, П.П. Набиуллин, В.П. Лозовой // *Тез. Всесоюз. научн. конф. "Иммунный статус человека и радиация"*. – 1991. – Гомель. – С.125.
12. *Савина Н. Нарушение функции тимуса и эндокринного контроля как одна из основ развития позднего пострадационного иммунодефицита* / Н. Савина, С. Хоптынская // *Радиац. биол. радиоэкол.* – 1995. – Т.35, вып. 4. – С. 463-480.
13. *Оценка состояния Т-клеточного и моноцитарного звеньев у ликвидаторов аварии на ЧАЭС через 11 лет* / С.М. Потапова, О.И. Кузьменюк, М.П. Потапнев [и др.] // *Иммунология*. – 1999. – №3. – С. 59-62.
14. *Состояние клеточного и цитокинового звеньев иммунитета у участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС через 10-12 лет после выхода из зоны повышенной радиационной опасности* / А.А. Тимошевский, А.Н. Гребенюк, Н.В. Калинина [и др.] // *Мед. радиол. и радиац. безопасность*. – 2001. – Т. 46, №4. – С. 23-27.
15. *Ионизирующее излучение и иммунная система у детей* / Е.М. Лукьянова, Ю. Антипкин, В.П. Чернышов [и др.] // *Київ: Експерт*, 2003. – С. 111-175.
16. *Radioiodine-induced changes in lymphocyte subsets in patients with differentiated thyroid carcinoma* / A. Tofani, R. Sciuto, R.P. Cioffi [et al.] //

- Eur. J. Nucl. Med. – 1999. – Vol. 26, №8. – P. 824-829.
17. *Воронцова Т.В.* Состояние иммунной системы детей, больных раком щитовидной железы, получающих гормональное лечение и радиойодотерапию / Т.В. Воронцова, О.О. Янович, Е.П. Демидчик // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2001. – №2. – С. 38-45.
 18. *Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека.* – М., 2001. – 53 с.

РЕЗЮМЕ

Влияние радиойода на состав лимфоцитов крови больных раком щитовидной железы молодого возраста с отдаленными метастазами

Г.А. Замотаева, Н.Н. Степура

В статье представлены результаты исследования спектра лимфоцитов крови у больных дифференцированным раком щитовидной железы молодого возраста до и после радиойодотерапии. Обследованы 50 больных с тиреоидной карциномой: 26 пациентов с отдаленными метастазами и 24 – без них. Активность радиойода, которую получали больные, была в пределах от 3205 кБк до 6570 кБк. Контрольную группу составили 22 человека соответствующего возраста. Фенотип лимфоцитов периферической крови определяли накануне и через 6 дней после приема йода-131. У больных в ранние сроки после введения терапевтических активностей радиойода наблюдались следующие изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови: значительное снижение В-лимфоцитов и иммунорегуляторного индекса, умеренный рост содержания субпопуляций супрессорных/цитотоксических лимфоцитов и регуляторных Т-клеток, клеток-киллеров,

а также увеличение уровня экспрессии CD95. Показано, что в процессе радиойодотерапии наличие отдаленных метастазов существенно не влияет на степень иммунных нарушений.

Ключевые слова: дифференцированный рак щитовидной железы, йод-131, радиойодотерапия, фенотип лимфоцитов.

SUMMARY

Effect of radioiodine on blood lymphocytes in young patients with thyroid cancer and distant metastases

G. Zamotaeva, N. Stepura

The authors present the results of a study of phenotypic composition of blood lymphocytes in patients with differentiated thyroid cancer of young age before and after radioiodine therapy. A total of 50 patients with thyroid carcinoma have been followed up: 24 patients without distant metastases, 26 with distant metastases. Radioiodine activity received by the patients ranged from 3205 kBq to 6570 kBq. The control group consisted of 22 age-matched persons. Immunophenotype of peripheral blood lymphocytes was defined on the eve and 6 days after iodine-131 administration. The following changes in subpopulations' composition of peripheral blood lymphocytes at early periods after administration of therapeutic doses of radioiodine were noted in study patients: a significant decrease in B-lymphocytes and immunoregulation index, a moderate growth in the content of subpopulations of suppressor/cytotoxic lymphocytes and regulatory T-cells, as well as an increased expression level of CD95+ and killer cells. It has also been demonstrated that in the course of radioiodine therapy the presence of distant metastases did not affect significantly subpopulations composition of peripheral blood lymphocytes the degree of immunologic disturbances.

Key words: differentiated thyroid cancer, iodine-131, radioiodine therapy, lymphocytes phenotype.

Дата надходження до редакції 14.09.2012 р.