13. *Extended* resection of the left atrium, great vessels, or both for lung cancer / R. Tsuchiya, H. Asamura, H. Kondo et al. // Ann. Thorac. Surg. — 1994. — Vol. 57. — P. 960–965.

Резюме. Внедрение современных радиологических методов диагностики позволяет выявить метастазы злокачественных опухолей в сердце до клинических проявлений. Мы представляем случай радиологической диагностики метастазирования рака легкого в перикард и ушко левого предсердия с помощью КТ органов грудной полости.
Ключевые слова: рак легкого, сердечные метастазы, компьютерная томография.

Summary. Implementation of modern radiological diagnostic methods allows to reveal cardiac metastases before clinical manifestation. We represent a case of radiological diagnostics of lung carcinoma metastases to pericardium and left atrial appendage, revealed with CT of thorax.
Keywords: lung carcinoma, cardiac metastases, computed tomography.

Г. А. ЗАМОТАЄВА[1], Ф. В. ФІЛЬЧАКОВ[2], Н. М. СТЕПУРА[1]
К. С. ШУМІЛІНА[2], С. В. ГУЛЕВАТИЙ[1], С. М. КУКУШКІНА[2]
М. Д. ТРОНЬКО[1]

[1]*ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ*
[2]*ДУ «Національний інститут раку МОЗ України», Київ*

ВПЛИВ РАДІЙОДОТЕРАПІЇ НА ІМУНОФЕНОТИП ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНОГО ВІКУ

INFLUENCE OF RADIOIODINE THERAPY ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH THYROID CANCER OF DIFFERENT AGE

Терапія радіоактивним йодом давно і широко використовується в медичній практиці для лікування токсичного зоба та раку щитоподібної залози (РЩЗ), проте інформація щодо побічних наслідків його впливу на інші органи та системи вкрай обмежена і досить суперечлива. До недавнього часу існувала думка, що через високу органотропність ^{131}I його радіаційний вплив на організм в цілому незначний. Дослідження останніх років змінили уявлення про повну безпеку проведення радіойодотерапії (РЙТ).

У попередніх дослідженнях нами встановлено, що лікувальні активності ^{131}I призводять до змін імунологічних та гематологічних показників хворих на тиреоїдну карциному [1, 2]. Показано, що ці порушення залежать від кумулятивної активності радіойоду, наявності віддалених метастазів і максимально проявляються через місяць після РЙТ [3]. Наступний етап нашої роботи був спрямований на з'ясування вікових особливостей імунологічних реакцій на дію радіойоду. Доцільність цих досліджень аргументовано такими основними факторами:

– вік є одним із найважливіших чинників, модифікуючих ефект опромінення на організм;
– стан імунної системи організму змінюється з віком;
– клінічний перебіг тиреоїдного раку у дітей має певні особливості.

Метою нашої роботи було дослідження імунофенотипу лімфоцитів периферичної крові у хворих на диференційований рак щитоподібної залози (ДРЩЗ) різного віку.

Проведено аналіз результатів у трьох вікових групах хворих на ДРЩЗ: I група (діти і підлітки) — 25 осіб, II група (молоді дорослі) — 31 особа та III група (хворі старшого віку) — 30 осіб. Дані, наведені у табл. 1, свідчать, що відсоток хворих з легеневими метастазами, середня кількість курсів РЙТ і розподілення за статтю були приблизно однакові в кожній групі. У переважної більшості хворих діагностовано папілярну карциному. В I групі був 1 випадок фолікулярного раку, в II та III групах — по 2 випадки. Контролем для кожної групи були донори відповідного віку.

© *Г. А. Замотаєва, Ф. В. Фільчаков, Н. М. Степура, К. С. Шуміліна, С. В. Гулеватий, С. М. Кукушкіна, М. Д. Тронько, 2015*

Таблиця 1

Основні характеристики груп порівняння

Група	Середній вік (р.)	Віковий діапазон (рр.)	Середня кількість курсів РЙТ	Легеневі метастази (%)	Жінки (%)	Чоловіки (%)
I	16,00 ± 0,27	13–18	1,80	12,0	88,0	12,0
II	28,14 ± 0,93	19–40	1,71	14,3	85,7	14,3
III	53,69 ± 1,33	43–70	1,78	14,7	87,5	12,5

Дослідження імунофенотипу лімфоцитів периферичної крові у хворих на РЩЗ виконували напередодні РЙТ та на 6-ту добу після прийому ізотопу. Ідентифікацію популяційного та субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові проводили за допомогою методу проточної цитометрії [4]. Для імунофенотипування (визначення експресії поверхневих маркерів) лімфоцитів використовували панель прямо мічених моноклональних антитіл (виробництва «BD Pharmingen», США та «Сорбент», Москва): 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 та CD95. Для визначення Treg (CD4+CD25+^{bright} — регуляторні клітини) проводили оцінку інтенсивності флуоресценції CD25. Моноклональні антитіла проти CD56 і CD4 — мічені фікоеритрином, всі інші — флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом. Підготовку проб здійснювали за стандартним протоколом [4]. Отримані дані статистично опрацьовували методом варіаційної статистики з обчисленням t-критерію Стьюдента. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

До початку роботи була отримана інформована згода від пацієнтів та позитивне рішення Комісії з медичної етики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України».

У табл. 2 представлені результати визначення відносної кількості лімфоцитів основних субпопуляцій у периферичній крові здорових донорів, а також у хворих на РЩЗ трьох вікових груп напередодні проведення РЙТ та на 6-ту добу після прийому ^{131}I.

За результатами дослідження фенотипових особливостей у практично здорових людей виявлено помірні зміни у складі лімфоцитів периферичної крові з віком. У донорів II групи (віком 19–40 років) спостерігалися більш високі відносні показники кількості Т-лімфоцитів (75,93 %) порівняно з контролем I і III груп, вочевидь, за рахунок ефекторних (CD4+) клітин (45,07 %), хоча слід зазначити, що вірогідна різниця відзначена тільки між показниками CD4 I та II груп. У осіб старшого віку (III група) виявлявся дещо вищий вміст природних клітин-кілерів (відповідно, 18,23 проти 14,34 % (I гр.) та 13,00 % (II гр.), $p < 0,05$), і лімфоцитів, що експресують маркер апоптозу — антиген CD95 (48,53 проти 34,45 % (I гр.) та 42,29 % (II гр.), $p < 0,01$) та CD4+CD25^{high}-лімфоцитів (Treg).

Навпаки, кількість клітин з іншим активаційним маркером — HLA-DR — була помірно зниженою.

У дітей і молодих хворих на тиреоїдну карциному (I та II вікові групи) не виникає суттєвих змін з боку популяційного вмісту лімфоцитів у периферичній крові. Проте у людей старшого віку захворювання на рак щитоподібної залози спричиняє вірогідні зміни у складі лімфоцитів крові. Так, у порівнянні з відповідним віковим контролем у хворих III групи зменшується загальна популяція Т-лімфоцитів (68,81 проти 73,67 %, $p < 0,05$) та збільшується субпопуляція CD8+ (27,75 проти 24,09 %, $p < 0,05$). Встановлено також зниження імунорегуляторного індексу (1,56 проти 1,88 %, $p < 0,01$).

Таблиця 2

Відносний вміст основних субпопуляцій лімфоцитів у периферичній крові хворих на РЩЗ різного віку (%)

Фенотип лімфоцитів	Здорові донори 12–17 рр. (14,85 ± 0,43)	Хворі на РЩЗ I вікової групи (13–18 рр.)		Здорові донори 19–36 рр. (29,21 ± 1,40)	Хворі на РЩЗ II вікової групи (19–40 рр.)		Здорові донори 41–70 рр. (52,89 ± 1,18)	Хворі на РЩЗ III вікової групи (43–70 рр.)	
		До РЙТ	Після РЙТ		До РЙТ	Після РЙТ		До РЙТ	Після РЙТ
CD3+	73,32 ± 2,54	72,48 ± 1,27	71,91 ± 1,21	75,93 ± 1,40	72,20 ± 0,92	71,51 ± 1,32^{a}	73,67 ± 2,07	68,81 ± 1,55^{ad}	67,58 ± 1,95^{ac}
CD4+	40,67 ± 1,21	41,64 ± 1,30	37,05 ± 1,^{21ab}	45,07 ± 1,88^{c}	42,60 ± 1,17	41,51 ± 1,36^{ac}	42,64 ± 2,20	40,34 ± 1,76	39,16 ± 1,50
CD8+	25,32 ± 1,72	24,60 ± 1,34	29,77 ± 1,17^{ab}	27,29 ± 1,22	28,89 ± 0,86	32,20 ± 1,21^{ab}	24,09 ± 1,31	27,75 ± 1,14^{ac}	30,10 ± 1,48^{a}
IPI	1,67 ± 0,13	1,87 ± 0,16	1,30 ± 0,08^{ab}	1,73 ± 0,15	1,55 ± 0,08	1,39 ± 0,10^{a}	1,88 ± 0,10	1,56 ± 0,11^{a}	1,45 ± 0,12^{a}
CD19+	10,28 ± 0,14	9,28 ± 0,61	6,09 ± 0,42^{ab}	10,00 ± 0,74	8,74 ± 0,56	5,80 ± 0,44^{ab}	10,42 ± 1,18	9,13 ± 0,79	6,10 ± 0,51^{ab}
CD16+CD56+	14,34 ± 1,12	17,32 ± 1,41	21,36 ± 1,39^{ab}	13,00 ± 1,48	15,94 ± 1,04	19,26 ± 1,29^{ab}	18,23 ± 1,37^{cd}	20,44 ± 1,82^{d}	24,00 ± 1,70^{ad}
HLA-DR+	20,56 ± 1,14	19,36 ± 1,04	15,82 ± 0,^{82ab}	19,93 ± 1,63	20,43 ± 0,95	20,03 ± 0,93^{c}	16,97 ± 1,23^{c}	18,31 ± 2,12	16,07 ± 1,92
CD95+	34,45 ± 1,58	42,44 ± 1,64^{a}	59,14 ± 1,^{61ab}	42,29 ± 1,85^{c}	50,34 ± 1,72^{ac}	63,09 ± 1,61^{ab}	48,53 ± 2,41^{cd}	53,72 ± 1,94^{ac}	68,54 ± 2,14^{abcd}
CD4+CD25+	11,76 ± 1,24	12,56 ± 0,60	13,82 ± 1,15	18,64 ± 1,28^{c}	17,43 ± 0,74^{c}	20,23 ± 1,15^{bc}	16,58 ± 1,16^{c}	16,73 ± 1,02^{c}	20,87 ± 1,13^{abc}

Примітки: a — $p < 0,05$ відносно відповідної групи донорів (контроль); b — $p < 0,05$ відносно вихідних (до проведення радіойодотерапії) показників; c — $p < 0,05$ відносно відповідних показників I вікової групи, d — $p < 0,05$ відносно відповідних показників II вікової групи.

У ранні строки (6-та доба) після приймання терапевтичної дози ^{131}I виявляються різною мірою виражені фенотипові зміни лімфоцитів периферичної крові.

Відносна кількість CD3+-лімфоцитів майже не відрізняється від вихідних показників у хворих усіх вікових груп. Щодо основних субпопуляцій Т-лімфоцитів, то вірогідні зміни обох підтипів Т-клітин: зниження CD4+ і підвищення CD8+ виявлені лише у дітей і підлітків. Як закономірний наслідок, у цій групі також суттєво (в 1,44 разу, $p < 0,001$) зменшується IPI. Після РЙТ у групі молодих дорослих помірно, але вірогідно збільшується вміст CD8-клітин (32,20 проти 28,89 %, $p < 0,05$). У хворих старшого віку кількість Т-хелперів і Т-супресорів під впливом радіойоду достовірно не змінюється, хоча порівняно з віковою нормою вміст CD8+ майже на 25 % вищий ($p < 0,01$). Показники IPI після РЙТ нижчі за вихідні у хворих II і III груп, але різниця є вірогідною лише порівняно з відповідним контролем.

Найбільш істотний вплив опромінення радіойодом чинить на популяцію В-лімфоцитів. Кількість CD19+-клітин знижується майже однаково — у 1,5 разу ($p < 0,001$) в усіх вікових групах.

Вміст природних клітин-кілерів (ПКК) визначали за експресією маркерів CD16 і CD56. У більшості хворих на РЩЗ усіх вікових груп кількість CD16+CD56+-клітин дещо вища за фізіологічну норму, але це підвищення не є статистично вірогідним. У ранні строки після РЙТ вміст ПКК збільшується в середньому на 20 %: I група — 21,36 % проти 17,32 % ($p < 0,05$); II — 19,26 % проти 15,94 % ($p < 0,05$); III — 24,00 % проти 20,44 % ($p > 0,05$).

Кількість клітин, експресуючих маркер активації — HLA-DR, у хворих на РЩЗ усіх вікових груп залишається в межах контрольних значень. На 6-й день після РЙТ зміни кількості клітин з цим фенотипом спостерігаються тільки в групі дітей і підлітків: зменшення на 20 % ($p < 0,05$).

Одним із завдань було визначення експресії CD95-антигену — мембранного глікозильованого білка APO-1/Fas (Fas-рецептор, Fas-R), взаємодія якого зі специфічним лігандом ініціює процес апоптичної загибелі клітини. Результати аналізу рівня експресії CD95-антигену лімфоцитами периферичної крові практично здорових людей показали зростання вмісту цього фенотипу клітин з віком. У дітей і підлітків вміст CD95-позитивних клітин вірогідно нижчий, ніж у молодих дорослих та донорів старшого віку: приблизно на 20 і 30 %, відповідно. Одержані нами дані відповідають даним літератури щодо наявності прямої вікової залежності кількості CD95+-лімфоцитів [5]. Відомо також, що в аналогічний спосіб змінюється з віком сприйнятливість клітин до CD95-опосередкованого апоптозу [6].

Дослідження напередодні лікування радіойодом свідчить, що характерним для всіх хворих на тиреоїдну карциному є помірне, але вірогідне збільшення відносної кількості лімфоцитів, які експресують рецептор апоптозу, порівняно з показниками відповідних за віком контрольних груп: у I групі — 42 проти 34 % ($p < 0,01$), у II групі — 50 проти 42 % ($p < 0,05$), у III групі — 54 проти 48 % ($p < 0,05$). Порівняння між віковими групами виявило статистично значущі відмінності кількості CD95+-лімфоцитів лише між групами I і II та I і III. Попри прогресивне збільшення показника з віком, вірогідна різниця між молодими і старшими дорослими була відсутня.

Після терапії радіойодом вміст CD95+-лімфоцитів у периферичній крові істотно збільшується, принаймні у перші дні після опромінення. Підвищення рівня експресії CD95 відносно вихідних показників виявлено у хворих усіх груп: в 1,4 разу ($p < 0,001$) (I гр.), в 1,25 разу ($p < 0,001$) (II група) та в 1,28 разу ($p < 0,001$) (III група). Найбільш істотне підвищення показника після РЙТ спостерігалося у групі дітей і підлітків, а найбільші значення зареєстровані у хворих старшого віку.

Слід зазначити, що експресія CD95 зрілими лімфоцитами при їх активації і антиген-специфічної відповіді не є обов'язковим критерієм апоптичної загибелі. Результат реакції лімфоцита при лігуванні Fas-R позитивно або негативно модулюється широким спектром цитокінів і залежить від багатьох чинників. Разом з тим, понаднормова експресія CD95 на мембрані лімфоцитів свідчить про збільшення імовірності апоптозу цих клітин. Порушення процесів апоптозу лімфоїдних клітин може призвести до суттєвих розладів у імунній системі і проявитися розвитком автоімунних та лімфопроліферативних захворювань, вторинних імунодефіцитів.

Були проведені спеціальні дослідження щодо визначення субпопуляції регуляторних Т-клітин. Treg-клітини формуються у процесі нормального диференціювання в тимусі, а не під дією антигенної стимуляції, тому їх ще називають природними регуляторними клітинами — nTreg. Чисельність і активність регуляторних Т-клітин контролюється генетично. Біологічна функція цих клітин полягає у запобіганні автоімунним процесам і регуляції імунної відповіді, вони також сприяють нормальному перебігу вагітності та забезпечують захист нормальної мікрофлори кишківника. Негативною стороною супресорних властивостей Treg є допомога малігнізованим клітинам уникнути імунологічного нагляду. Напередодні РЙТ вміст CD4+CD25^{high}-клітин у хворих на РЩЗ усіх вікових груп був у межах фізіологічних значень. На 6-й день після введення радіойоду відносна кількість клітин цього фенотипу помірно збільшується, але статистично значуща різниця спостерігається у групах молодих дорослих та хворих старшого віку: 20,23 проти 17,43 %, $p < 0,05$ (II група); 20,87 проти 16,73 %, $p < 0,01$ (III група). В усі строки досліджень показники CD4+CD25^{high}-клітин у дітей і підлітків були вірогідно нижчими, ніж у більш старших пацієнтів.

Таким чином, проведені нами дослідження субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові хворих на РЩЗ різного віку за умов радіойодотерапії підтверджують думку про вік як важливий чинник, що істотно впливає на результат дії опромінення на організм. Одержані результати переконливо доводять більшу радіочутливість клітин імунної системи

в дитячому і підлітковому віці. Разом із тим представлені дані свідчать, що захворювання на РЩЗ спричиняє більш глибокі порушення у складі лімфоцитів крові у хворих старшого віку порівняно з молодими пацієнтами.

У хворих на ДРЩЗ формуються порушення у складі лімфоцитів периферичної крові. У хворих старшого віку зміни більш суттєві.

Під впливом РЙТ порушення в імунній системі хворих на ДРЩЗ поглиблюються. Найбільш характерними наслідками РЙТ, які спостерігалися у хворих усіх вікових груп, було значне зменшення кількості В-лімфоцитів, підвищення природних клітин-кілерів та CD95+-лімфоцитів.

Найбільш істотний вплив радіойод справляв на імунну систему дітей та підлітків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Стан* імунної системи хворих на рак щитоподібної залози з метастазами в легені після лікування радіойодом / Г. А. Замотаєва, Д. О. Джужа, Н. М. Степура [та ін.] // Укр. радіол. журн. — 2011. — Т. XIX, вип. 3. — С. 279–281.

2. *Замотаєва Г.* Вплив радіойоду на склад лімфоцитів крові хворих на рак щитоподібної залози молодого віку з метастатичними ураженнями легенів / Г. Замотаєва, Н. Степура // Клін. ендокринологія та ендокрин. хірургія. — 2012. — № 4. — С. 28–32.

3. *Стан* системи імунітету хворих на рак щитоподібної залози після лікування радіойодом / Г. А.Замотаєва, Н. М Степура, Д. С.Сидоренко [та ін.] // Ендокринологія. — 2007. — Т. 12, № 2. — С. 218–226.

4. *Применение* проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. — М., 2001. — 53 с.

5. *Age* related changes in Fas (CD95) and Fas ligand gene expression and cytokine profiles in healthy Indians / M. Sawhney, M. Mathew, MT. Valarmathi [et al.] // Asian. Pac. J. Allergy Immunol. — 2006. — Vol. 24, N 1. — P. 47–56.

6. *Age* related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes / K. Schinowski, S. Leutner, W. E. Muller [et al.] // Neurobiology of Aging. — 2000. — N 21. — P. 661–670.

Резюме. Представлены результаты исследования фенотипического состава лимфоцитов периферической крови у больных дифференцированным раком щитовидной железы (РЩЖ) разного возраста накануне и на 6-й день после радиойодтерапии.

Фенотипический профиль клеток периферической крови определяли у больных трех возрастных групп: больные до 18 лет (I группа), пациенты в возрасте 19–40 лет (II группа) и больные старше 41 года (III группа).

Оказалось, что у больных РЩЖ формируются нарушения в составе лимфоцитов периферической крови, которые у лиц старшего возраста были более существенными. Под влиянием радиойода нарушения в иммунной системе больных усугубляются. Наиболее существенными последствиями радиойодтерапии, выявленными у больных всех возрастных групп, было значительное уменьшение количества В-лимфоцитов, увеличение натуральных клеток-киллеров и CD95+-лимфоцитов. Установлено, что наиболее существенное влияние радиойод оказывает на иммунную систему детей и подростков. В этой возрастной группе меняется содержание субпопуляций лимфоцитов: CD4+, CD8+, IPI, CD19+, CD16+CD56+, CD95+ и HLA-DR, это обусловливает необходимость дальнейшего динамического исследования этой возрастной группы больных, как наиболее чувствительной к действию радиойода, с целью определения степени иммунологических нарушений и сроков их восстановления.

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

Summary. The authors present the results of a study of the phenotypic composition of blood lymphocytes in patients with differentiated thyroid cancer of different all age before and on day 6 after radioiodine therapy.

The phenotypic profile of peripheral blood cells was determined in patients of three age groups: patients aged under 18 years (group 1), patients whose age was within the range 19 to 40 years (group 2), and patients older than 41 years (group 3).

The studies have shown that in patients with thyroid cancer, abnormalities developed in the composition of peripheral blood lymphocytes, which were more pronounced in elderly patients. Under the influence of radioiodine, disturbances in the immune system of patients are aggravated.

The most significant after-effects of radioiodine therapy that had been identified in patients of all age groups, were represented by a significant decrease in the number of B-lymphocytes, an increase in natural killer cells and CD95+ lymphocytes. Furthermore, it was found that radioiodine has the most significant effect on the immune system of children and adolescents. In this age group, the content of lymphocyte subpopulations is changing: CD4+, CD8+, IRI, CD19+, CD16+CD56+, CD95+ and HLA-DR, which suggests the need for further dynamic studies in this age group of patients, which is the most sensitive to radioiodine effect in order to determine the extent of immunological disorders and the terms of their recovery.

Keywords: differentiated thyroid cancer, iodine-131, age, radioiodine therapy, lymphocyte phenotype.