

УДК 616-056.52+618.14:616-006

*П.П. Сорочан, І.А. Громакова, Н.Е. Прохач, О.В. Кузьменко, І.С. Громакова*

*ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», м. Харків*

## **ЗМІНИ СУБПОПУЛЯЦІЙНОГО СКЛАДУ ЛІМФОЦИТІВ ПІСЛЯ ПРОМЕНЕВОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК ТІЛА МАТКИ З ОЖИРІННЯМ**

Проаналізовано зміни субпопуляційного складу лімфоцитів у онкологічних хворих з ожирінням після променевого лікування. Ще до лікування в усіх хворих з ожирінням виявлено підвищене співвідношення  $CD4^+/CD8^+$  у порівнянні з хворими з нормальною масою, а хворі з ожирінням 3-го ступеня мали збільшену відносну кількість НКТ-клітин і зменшену відносну кількість  $CD19^+$ -лімфоцитів. Після променевого лікування у хворих з ожирінням відмічено зростання відносної кількості  $CD3^+$ -лімфоцитів і подальше збільшення співвідношення  $CD4^+/CD8^+$ . У хворих з ожирінням після лікування відмічено також більший дефіцит абсолютної кількості НК-клітин, що може впливати на збільшення ризику інфекційних ускладнень протипухлинного лікування у цих хворих.

**Ключові слова:** субпопуляційний склад лімфоцитів, рак тіла матки, ожиріння.

### **Вступ**

В останні десятиріччя встановлено зв'язок між ожирінням і ризиком розвитку та/або прогнозом деяких видів раку, включаючи рак тіла матки. Системні зміни, такі як гіперінсулінемія, гіперглікемія, запалення та зміни локального оточення пухлини внаслідок ожиріння, пов'язані з розвитком і прогресуванням злякисного новоутворення [1–3]. Також є свідчення про збільшення ускладнень протипухлинного лікування у хворих з ожирінням у порівнянні з хворими з нормальною масою тіла [4]. Дані щодо особливостей імунних порушень при променевому лікуванні, які можуть сприяти розвитку інфекційних ускладнень, у хворих з ожирінням вельми обмежені.

**Метою** даного дослідження було визначення особливостей змін субпопуляційного складу лімфоцитів після променевого лікування хворих на рак тіла матки з ожирінням.

### **Матеріал і методи**

Проведено клініко-лабораторне обстеження 45 хворих на рак тіла матки I–II стадій ( $T_{1b-c}N_0M_0 - T_{2a-b}N_0M_0$ ) у віці від 50 до 70 років із гістологічно діагностованою аденокарциномою. Більша частина пацієнток (72%) була у віці від 50 до 60 років. Супутня серцево-судинна патологія у вигляді ішемічної хвороби

серця і гіпертонічної хвороби була відмічена у 34 пацієнток (60%). З дослідження були виключені хворі з важкими формами анемії і гіпотиреозу, пацієнтки, які тривалий час приймали стероїди, нестероїдні протизапальні засоби та заспокійливі препарати. Усім хворим провели пангістеректомію та післяопераційний курс дистанційної гамма-терапії на апараті «РОКУС-АМ» (Україна) методом дробного фракціонування. Сумарна осередкова доза складала 40–45 Гр на точки А та В. Обстеження проводили до лікування та після курсу дистанційної гамма-терапії. Субпопуляційний склад лімфоцитів визначали методом проточної цитометрії на апараті FC-500 «Beckman Coulter» (США). Гематологічні показники визначали за допомогою аналізатора SF-3000 «SYSMEX». Рівень інсуліну в сироватці крові встановлювали за допомогою набору реагентів для імуноферментного визначення «DRG Insulin ELISA (EIA-2935)» (Німеччина, «DRG Instruments GmbH»), рівень глюкози в крові – глюкозооксидазним методом. Індекс інсулінорезистентності (IP) (індекс HOMA) розраховували за формулою  $HOMA = a \cdot b / 22,5$ , де  $a$  – глюкоза крові натще, ммоль/л;  $b$  – інсулін крові натще, мкМО/мл. Індекс HOMA більш ніж 2,77 ум. од. розцінювали як наявність ін-

© П.П. Сорочан, І.А. Громакова, Н.Е. Прохач та ін., 2018

сулінорезистентності. Індекс маси тіла (ІМТ) визначали як відношення маси тіла в кілограмах до квадрату зросту в метрах ( $\text{кг}/\text{м}^2$ ). Дослідження проводили під контролем комітету з біоетики Інституту радіології.

#### Результати та їх обговорення

За індексом маси тіла хворі були розподілені на три групи: 1-ша – з нормальною масою ( $\text{ІМТ} < 25$ ), 2-га – з ожирінням 1-го–2-го ступеня ( $30 < \text{ІМТ} < 40$ ), 3-тя – з ожирінням 3-го ступеня ( $\text{ІМТ} > 40$ ), табл. 1. Рівень інсуліну у хворих 2-ї групи був майже у два рази, а 3-ї – в три рази вищим за визначений у хворих 1-ї групи. Індекс інсулінорезистентності був значно вищим за норму у хворих з ожирінням.

Таблиця 1. Основні характеристики хворих досліджуваних груп

Показник	1-ша група	2-га група	3-тя група
	медіана (нижній квартиль – верхній квартиль)		
Вік, років	57 (53–64)	57 (55–69)	58 (54–63)
Зріст, см	158,5 (153,5–163,5)	157,0 (155,0–164,0)	160,0 (153,5–163,5)
Маса тіла, кг	59 (55–65)	83 (76–88)*	109 (93–136)*^
Індекс маси тіла, $\text{кг}/\text{м}^2$	23,8 (23,3–24,1)	32,7 (31,1–33,3)*	43,4 (41,7–45,9)*^
Глікемія натще, ммоль/л	5,9 (5,6–6,2)	6,1 (5,6–7,4)	6,6 (5,9–8,8)
Інсулін, мкМО/мл	8,1 (4,2–14,8)	15,8 (12,2–20,0)	28,1 (21,7–33,9)*^
НОМА-IR, ум. од.	2,1 (1,1–3,9)	4,8 (3,4–6,0)	9,2 (6,2–10,9)*

Примітка.  $p < 0,05$ ; \* при порівнянні з показниками 1-ї групи, ^ при порівнянні з показниками 2-ї групи.

Тут і в табл. 2.

Аналіз субпопуляційного складу лімфоцитів у хворих на рак тіла матки з нормальною масою тіла та ожирінням до початку лікування не виявив вірогідної різниці абсолютної та відносної кількості лімфоцитів,  $\text{CD}3^+$ -лімфоцитів, НК-клітин та  $\text{CD}3^+\text{HLA-Dr}^+$ -лімфоцитів. Відносна й абсолютна кількість  $\text{CD}3^+\text{CD}19^+$ -клітин була знижена у хворих з ожирінням 3-го ступеня порівняно з визначеними у хворих з нормальною масою та ожирінням 1-го–2-го ступеня. Різниця показників хворих 1-ї та 3-ї груп була статистично значущою. Відносна й абсолютна кількість  $\text{CD}3^+\text{CD}16^+\text{56}^+$ -клітин (натуральних кілерних Т (НКТ)-клітин) була збільшена у хворих 3-ї групи (табл. 2). НК-клітини – субпопуляція Т-клітин, що розпізнають різні ліпідні антигени, які презентуються молекулами  $\text{CD}1\text{d}$  антиген-презентуючих клітин [5]. Є підстави вважати, що зростання антигенного навантаження у хворих з вираженим ожирінням може приводити до антигенкерованої експансії НК-клітин. Багаторазове збільшення НК-клітин спостерігали у відповідь на гліколіпідні антигени в експериментальних тварин [6].

У хворих з розповсюдженим раком експансію та активацію НК-клітин спостерігали при внутрішньовенних ін'єкціях зрілих дендритних клітин, навантажених синтетичним лігандом, – галактозил церамідом [7].

Медіани співвідношення  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  були дещо вищими у хворих з ожирінням обох груп у порівнянні з визначеними у хворих з нормальною масою тіла. Цей показник становив 1,31; 1,64 та 1,84 у хворих відповідно 1-ї, 2-ї та 3-ї груп. У хворих з ожирінням зростання цього показника, як вважають, відбувається за рахунок збільшення субпопуляції  $\text{CD}4^+$ -лімфоцитів. У хворих з морбідним ожирінням спостерігали селективне підвищення в периферичній крові наївних  $\text{CD}4^+$ ,  $\text{CD}4^+$ -клітин

пам'яті,  $\text{CD}4^+\text{CD}25^+\text{FoxP}3^+$  регуляторних Т-клітин та  $\text{Th}2$ -клітин, тоді як кількість  $\text{CD}8^+$ -клітин залишалася незмінною [8]. У нашому дослідженні до лікування відносна й абсолютна кількість  $\text{CD}4^+$ -клітин була вищою за зареєстровану у перших двох групах, але різниця не була статистично підтверджена.

Після променевого лікування абсолютна кількість лімфоцитів і субпопуляцій лімфоцитів знижувалась у 2,6; 3,3 та 3,2 рази у хворих 1-ї, 2-ї та 3-ї груп відповідно. Медіани цього показника в цих групах склали 0,67; 0,52 та  $0,55 \cdot 10^9/\text{л}$ .

Медіана відносної кількості  $\text{CD}3^+$ -лімфоцитів не змінювалась у хворих 1-ї групи, підвищувалась з 73,6 до 80,6 % у хворих 2-ї та з 72,7 до 82,3 % у хворих 3-ї групи. Основний внесок у це підвищення вносили  $\text{CD}4^+$ -лімфоцити, відсоток яких збільшувався більшою мірою, що відбулося на зростанні співвідношення  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  у групах хворих з ожирінням. Найсуттєвішого падіння в усіх групах зазнавали  $\text{CD}19^+$ -клітини, які мають найбільшу радіочутливість. Відмічено зниження як відносно, так і абсолютної кількості цих клітин.

Таблиця 2. Субпопуляційний склад лімфоцитів у хворих на рак тіла матки до та після променевого лікування

Показник	Етапи (до, після) лікування	1-ша група	2-га група	3-тя група
		медіана (нижній кuartиль – верхній кuartиль)		
Лейкоцити, $\cdot 10^9/\text{л}$	До	7,8 (6,9–8,4)	7,5 (5,6–9,0)	7,2 (6,0–7,6)
	Після	4,7 (3,7–5,4) <sup>^</sup>	4,4 (3,5–4,7) <sup>^</sup>	3,9 (3,4–5,0) <sup>^</sup>
Лімфоцити, %	До	23,2 (21,3–25,9)	26,5 (23,6–32,3)	26,9 (23,1–35,1)
	Після	14,5 (11,0–18,1) <sup>^</sup>	12,6 (11,0–15,2) <sup>^</sup>	16,2 (10,8–28,8)
Лімфоцити, $10^9/\text{л}$	До	1,88 (1,65–1,95)	1,84 (1,46–2,20)	1,94 (1,60–2,08)
	Після	0,67 (0,44–1,17) <sup>^</sup>	0,52 (0,38–0,72) <sup>^</sup>	0,55 (0,36–0,77) <sup>^</sup>
Нейтрофіли, %	До	67,2 (66,2–68,5)	61,9 (55,0–68,0)	61,5 (56,6–67,4)
	Після	63,3 (60,6–66,8)	73,4 (66,3–77,1)	65,7 (57,7–72,6)
Нейтрофіли, $10^9/\text{л}$	До	5,29 (4,68–5,64)	4,84 (3,43–5,55)	4,23 (3,56–5,23)
	Після	2,88 (2,35–3,48) <sup>^</sup>	2,96 (2,50–3,58)	2,67 (1,84–2,85) <sup>^</sup>
CD3 <sup>+</sup> , %	До	65,4 (62,4–80,6)	73,6 (70,5–78,5)	72,7 (68,2–77,0)
	Після	65,9 (55,2–79,9)	80,6 (73,9–83,4)	82,3 (77,2–84,4) <sup>*</sup>
CD3 <sup>+</sup> , $10^9/\text{л}$	До	1,27 (1,14–1,40)	1,32 (0,99–1,59)	1,48 (1,16–1,61)
	Після	0,43 (0,29–0,69) <sup>^</sup>	0,37 (0,31–0,53) <sup>^</sup>	0,45 (0,35–0,96) <sup>^</sup>
CD4 <sup>+</sup> , %	До	44,9 (37,0–56,4)	41,3 (37,7–49,7)	49,5 (40,8–53,0)
	Після	33,9 (31,1–39,7)	46,9 (40,7–50,2)	57,9 (53,2–61,3)
CD4 <sup>+</sup> , $10^9/\text{л}$	До	0,71 (0,58–0,88)	0,83 (0,70–0,94)	0,88 (0,78–1,05)
	Після	0,24 (0,19–0,29) <sup>^</sup>	0,26 (0,17–0,31) <sup>^</sup>	0,29 (0,24–0,45) <sup>^</sup>
CD8 <sup>+</sup> , %	До	20,6 (14,0–32,2)	21,6 (18,6–29,5)	25,5 (20,6–31,7)
	Після	25,8 (22,9–39,7)	26,1 (18,2–33,6)	27,7 (21,8–35,4)
CD8 <sup>+</sup> , $10^9/\text{л}$	До	0,53 (0,35–0,65)	0,46 (0,30–0,58)	0,53 (0,35–0,65)
	Після	0,17 (0,10–0,37)	0,12 (0,09–0,17) <sup>^</sup>	0,17 (0,10–0,37)
CD19 <sup>+</sup> , %	До	10,3 (8,1–12,8)	9,9 (8,8–13,7)	6,9 (5,8–7,8) <sup>*</sup>
	Після	1,6 (0,9–2,5) <sup>^</sup>	2,2 (1,3–3,6) <sup>^</sup>	2,2 (1,7–5,0) <sup>^</sup>
CD19 <sup>+</sup> , $10^9/\text{л}$	До	0,196 (0,151–0,221)	0,175 (0,154–0,239)	0,137 (0,107–0,258)
	Після	0,009 (0,008–0,011) <sup>^</sup>	0,0135 (0,008–0,179) <sup>^</sup>	0,0180 (0,008–0,0352) <sup>^</sup>
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> , %	До	13,5 (3,7–16,7)	11,6 (6,7–14,9)	13,4 (11,0–17,9)
	Після	21,4 (17,1–34,8) <sup>^</sup>	13,3 (7,3–21,4)	12,2 (8,3–16,7) <sup>*</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> , $10^9/\text{л}$	До	0,25 (0,06–0,43)	0,20 (0,14–0,30)	0,25 (0,24–0,31)
	Після	0,11 (0,08–0,22)	0,04 (0,03–0,11) <sup>^</sup>	0,06 (0,04–0,13) <sup>^</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>-</sup> , %	До	5,8 (3,8–6,9)	6,3 (3,5–11,1)	8,9 (3,8–12,2)
	Після	6,7 (2,7–10,8)	10,3 (4,7–12,6)	8,8 (4,3–13,7)
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>-</sup> , $10^9/\text{л}$	До	0,09 (0,06–0,13)	0,09 (0,07–0,17)	0,14 (0,07–0,28)
	Після	0,03 (0,02–0,07)	0,04 (0,03–0,09)	0,06 (0,04–0,09)
HLA <sup>-</sup> DR <sup>+</sup> , %	До	3,9 (2,9–9,2)	4,2 (3,0–7,0)	5,4 (2,8–7,7)
	Після	10,3 (7,1–16,2)	11,2 (6,5–20,3)	8,5 (6,0–17,4)
HLA <sup>-</sup> DR <sup>+</sup> , $10^9/\text{л}$	До	0,07 (0,05–0,17)	0,09 (0,06–0,13)	0,09 (0,06–0,15)
	Після	0,06 (0,03–0,16)	0,05 (0,03–0,10)	0,05 (0,03–0,19)
CD4/CD8	До	1,31 (1,18–2,60)	1,64 (1,39–2,72)	1,87 (1,33–2,72)
	Після	1,13 (0,77–1,65)	1,88 (1,41–2,82)	2,10 (1,50–2,86)

Вірогідної міжгрупової різниці цих показників після променевого лікування не спостерігалось (табл. 2).

У той же час медіана відносної кількості НК-клітин вірогідно зросла з 13,5 до 21,4% у хворих з нормальною масою і залишилась незмінною у хворих з ожирінням, внаслідок чого більший дефіцит абсолютної кількості НК-клітин після променевого лікування відмічено у хворих з ожирінням. Кількість НК-клітин після променевого лікування складала 0,11; 0,04 та 0,06  $\cdot 10^9/\text{л}$  у хворих з нормальною масою та у хворих з ожирінням 1, 2 та 3-го

ступеня відповідно. Різниця була вірогідною між показниками 1-ї та 2-ї груп, тобто у значної кількості хворих з ожирінням спостерігали виражений дефіцит НК-клітин.

#### Висновки

1. До лікування у всіх хворих з ожирінням відмічено більше співвідношення CD4/CD8 у порівнянні з хворими з нормальною масою, а хворі з ожирінням 3-го ступеня мають збільшену відносну кількість НК-клітин і зменшену відносну кількість CD19<sup>+</sup>-лімфоцитів.

2. Після променевого лікування у хворих з ожирінням спостерігається більш виражена

лімфопенія у порівнянні з хворими з нормальною масою. Зміни субпопуляційного складу лімфоцитів характеризуються зростанням відносної кількості CD3<sup>+</sup>-лімфоцитів та співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

3. У хворих з ожирінням відносна кількість NK-клітин залишається незмінною відносно їхнього рівня до лікування, тоді як у хворих з нормальною масою частка цих клі-

тин зростає, внаслідок чого у хворих з ожирінням спостерігається більший дефіцит абсолютної кількості вказаних клітин після променевого лікування.

4. Більш виражений дефіцит NK-клітин свідчить про суттєве погіршення протипухлинного імунного захисту у хворих з ожирінням і збільшення у них ризику інфекційних ускладнень.

## References

1. Zhang Y., Liu H., Yang S., Zhang J., Qian L., Chen X. (2014). Overweight, obesity and endometrial cancer risk: results from a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Biol. Markers*, vol. 29, № 1, pp. e21–e29.
2. Iyengar N.M., Gucalp A., Dannenberg A.J., Hudis C.A. (2016). Obesity and cancer mechanisms: tumor microenvironment and inflammation. *J. Clin. Oncol*, vol. 34, № 35, pp. 4270–4276.
3. Himbert C., Delphan M., Scherer D., Bowers L.W., Hursting S., Ulrich C.M. (2017). Signals from the adipose microenvironment and the obesity-cancer link-A systematic review. *Cancer Prev Res (Phila)*, Sept; vol. 10 (9), pp. 494–506.
4. Dandapani S.V., Zhang Y., Jennelle R., Lin Y.G. (2015). Radiation-associated toxicities in obese women with endometrial cancer: more than just BMI? *Scientific World J.*, vol. 2015. Article ID 483208.
5. Satoh M., Iwabuchi K. (2018). Role of natural killer T-cells in the development of obesity and insulin resistance: insights from recent progress. *Front. Immunol*, vol. 9. Article ID 1314.
6. Crowe N.Y., Uldrich A.P., Kyriakopoulos K., Hammond K.J., Hayakawa Y., Sidobre S., Keating R. et al. (2003). Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T-cells. *J. Immunol*, vol. 171, № 8, pp. 4020–4027.
7. Chang D.H., Osman K., Connolly J., Kukreja A., Krasovsky J., Pack M. (2005). Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T-cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J. Exp. Med.*, vol. 201, № 9, pp. 1503–1517.
8. Van der Weerd K., Dik W.A., Schrijver B., Schweitzer D.H., Langerak A.W., Drexhage H.A. et al. (2012). Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4<sup>+</sup> T-cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes*, vol. 61, № 2, pp. 401–408.

**П.П. Сорочан, І.А. Громакова, Н.Э. Прохач, Е.В. Кузьменко, І.С. Громакова**

### ІЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ ЛУЧЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТЕЛА МАТКИ С ОЖИРЕНИЕМ

Проанализированы изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных с ожирением после лучевого лечения. Ещё до лечения у всех больных с ожирением обнаружено повышенное соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> по сравнению с больными с нормальной массой тела, а больные с ожирением 3-й степени имели увеличенное относительное количество NKT-клеток и уменьшенное относительное количество CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов. После лучевого лечения у больных с ожирением отмечен рост относительного количества CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов и дальнейшее увеличение соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. У больных с ожирением после лечения отмечен также больший дефицит абсолютного количества NK-клеток, что может влиять на увеличение риска инфекционных осложнений противоопухолевого лечения у этих больных.

**Ключевые слова:** субпопуляционный состав лимфоцитов, рак тела матки, ожирение.

**P.P. Sorochan, I.A. Gromakova, N.E. Prokhach, E.V. Kuzmenko, I.S. Gromakova**

### CHANGES OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES AFTER RADICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH UTERINE CANCER WITH OBESITY

Changes in the subpopulation composition of lymphocytes in obese cancer patients after radiation treatment are analyzed. Even before treatment, an increased ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was found in all obese patients compared to normal-weight patients, and patients with III degree of obesity had an increased relative number of NKT-cells and a reduced relative number of CD19<sup>+</sup>-lymphocytes. After radiation in obese patients, an increase in the relative amount of CD3<sup>+</sup>-lymphocytes and a further increase in the ratio

of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> is noted. In patients with obesity, after treatment, there was also a greater deficit of absolute quantity of NK-cells, which may be involved in increasing the risk of infectious complications of cancer treatment in these patients.

**Keywords:** *subpopulation composition of lymphocytes, cancer of the uterus, obesity.*

*Надійшла до редакції 27.08.18*

### **Контактна інформація**

*Сорочан Павел Павлович* – кандидат медичних наук, завідувач лабораторії радіаційної імунології ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України».

*Громакова Ірина Андріївна* – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії радіаційної імунології ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України».

Адреса: Україна, 61000, м. Харків, вул. Пушкінська, 82.

Тел.: +380988114254.

E-mail: radimir07@meta.ua.

*Прохач Наталія Едуардівна* – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник лабораторії радіаційної імунології ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України».

*Кузьменко Олена Вікторівна* – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії радіаційної імунології ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України».

Адреса: Україна, 61000, м. Харків, вул. Пушкінська, 82.

Тел.: +380678125006.

E-mail: evkuzmenko@ukr.net.

*Громакова Інна Сергіївна* – молодший науковий співробітник лабораторії радіаційної імунології ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України».