

Наукові огляди

УДК 618.14-006.5-055.26

В.Г.Дубинина

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПАТОЛОГИИ НЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Одесский государственный медицинский университет

Резюме. В статье проведен анализ современных данных литературы относительно возможностей диагностического использования проточной цитометрии и, в частности, методики иммунофенотипирования для раннего выявления онкологической патологии. Несмотря на то, что уже описаны различные сдвиги в субпопуляциях лимфоидных клеток у онкобольных, чётких иммунологических критериев опухолевого роста разработать пока не удалось по причине неспецифичности обнаруженных изменений и возможности сходных нарушений иммунитета при других видах заболеваний.

Введение. Вопросы своевременной диагностики предопухолевой патологии и опухолевых заболеваний до настоящего времени представляют собой актуальную проблему для медицины и медицинской науки [11,16]. Несмотря на наличие рентгенологических, эндоскопических, цитогистологических и лабораторных методов диагностики опухолей, правильный диагноз зачастую ставится слишком поздно. В качестве примера можно рассмотреть рак яичника. По причине нечёткости и неспецифичности его симптомов, этот вид рака обычно диагностируется на поздних стадиях, когда лечение, к сожалению, уже малоэффективно. Так, статистика США свидетельствует, что в 80% случаев первичный диагноз рака яичника ставится, когда процесс уже вышел за пределы органа. Поэтому лишь один пациент из трёх выживает 5 и более лет после постановки указанного диагноза. В то же время, своевременное хирургическое лечение рака яичника на ранних стадиях является эффективным в 90% случаев [4,5]. Другой пример: на сегодняшний день существует два общепринятых метода скрининга рака эндометрия: трансвагинальное ультразвуковое исследование (ультрасонография) и биопсия эндометрия с последующим гистологическим исследованием.

Однако, оба метода могут давать ложноотрицательные либо ложноположительные результаты. Кроме того, биопсия эндометрия может привести к побочным реакциям и осложнениям, таким как кровотечение, перфорация матки и др. [17]. Поэтому ведётся постоянный поиск и разработка новых диагностических критериев и методик. Например, предложен метод диагностики рака легкого путём анализа выдыхаемого воздуха [15]. Активно разрабатываются молекулярно-генетические и иммунологические подходы к диагностике онкозаболеваний [9]. В настоящей

статье будет рассмотрено лишь одно из возможных направлений онкодиагностики, а именно – теоретические предпосылки и прогноз перспективы диагностического использования в онкологии результатов иммунофенотипирования лейкоцитов периферической крови человека.

Ключевые слова: онкология, иммунофенотипирование, ранняя диагностика, иммунология.

статье будет рассмотрено лишь одно из возможных направлений онкодиагностики, а именно – теоретические предпосылки и прогноз перспективы диагностического использования в онкологии результатов иммунофенотипирования лейкоцитов периферической крови человека.

Участие иммунной системы

в реакциях организма на опухолевый рост

Поиск взаимосвязи между развитием определенной патологии и изменениями в иммунной системе человека ведётся со времён зарождения иммунологии. Такая тактика представляется обоснованной и многообещающей, поскольку иммунная система является активным участником большинства патологических процессов в организме, независимо от их генеза. Исторически сложилось так, что само существование иммунной системы и некоторые аспекты её функционирования были открыты в процессе изучения инфекционных болезней. Затем выяснилось, что иммунная система и особенности её функционирования у конкретного индивидуума влияют на возникновение и течение многих других патологических состояний, таких как опухолевый рост, аллергические заболевания, болезни соединительной ткани. Сейчас уже сложно назвать болезнь, при которой иммунная система не была бы задействована тем или иным образом. Отсюда следует, что при многих патологических процессах у человека можно выявить специфические особенности и ответные реакции его иммунной системы, которые либо способствуют развитию заболевания, либо являются проявлением функционирования адаптационно-защитных механизмов. Выявление и изучение структурно-функциональных особенностей иммунной системы при различных заболеваниях может иметь важное значение как для диагностики, так и для выбора тактики лечения.

В последние годы очень интенсивно изучается роль иммунной системы в процессах контроля за атипичными, трансформированными клетками, в процессах сдерживания опухолевого роста и предотвращения метастазирования. Многочисленные данные указывают на то, что в ответ на появление опухоли в организме развивается иммунный ответ, проявляющийся образованием опухоли-специфических антител и Т-клеток, специфичных к опухоли-ассоциированным антигенам. И всё же, до настоящего времени непосредственная роль некоторых факторов иммунитета в процессах контроля над опухолевым ростом остаётся невыясненной. Считается доказанным участие неспецифических факторов иммунитета, включая ЕК (естественные киллеры), клетки и медиаторы воспалительных реакций, макрофаги и часть Т-клеток (не рестриктированных по антигенам главного комплекса гистосовместимости) в развитии противоопухолевых реакций в организме [2]. Кроме того, опухоли и, в особенности, опухолевые метастазы могут угнетать некоторые функции иммунной системы, нарушая местный и системный иммунные ответы. По мере развития опухоли может видоизменяться клеточный иммунный ответ, секреция цитокинов и других биологически активных соединений [8]. Таким образом, опухоль и иммунная система организма хозяина находятся в постоянном взаимодействии, и от результатов этого взаимодействия зависит прогрессия опухоли.

Некоторые аспекты диагностического использования методов проточной цитометрии в онкологии

Совершенно очевидно, что разработка методик, позволяющих зарегистрировать изменения иммунной системы, связанные с наличием/прогрессией опухоли, является очень актуальной задачей. В таких методиках нуждается как клиника – для скрининга, диагностики и оценки эффективности проводимой терапии при опухолевых заболеваниях, так и медицинская наука. К сожалению, большинство предложенных методов являются неспецифическими в том плане, что они не позволяют измерить иммунный ответ конкретного организма на развитие опухоли, а дают возможность лишь оценить общее состояние иммунитета у пациента. Причина заключается в том, что, как правило, развитие опухоли связано с нарушением какого-либо специфического звена иммунной системы, без развития общих, поддающихся регистрации изменений. При этом дефект иммунитета может затрагивать лишь строго ограниченную субпопуляцию иммунных клеток, что не удаётся обнаружить с помощью доступных в клинике иммунологических методик. В частности, для определения специфического иммунного ответа на конкретную опухоль, необходимо для начала располагать аутологичными опухолевыми антигенами, желателно выделенными от данного больного. По многим причинам такая задача является очень сложной. Даже в тех редких слу-

чаях, когда удаётся выделить специфические опухоль-ассоциированные пептиды (как, например, при меланоме), поиск специфических иммунных эффекторных клеток у пациентов крайне затруднён. Это объясняется тем, что в периферическом кровотоке присутствует крайне мало опухоли-специфических Т-клеток (порядка 10^5 – 10^6 клеток на конкретный антиген). Для их обнаружения необходимо предварительное накопление клеток, выделенных из крови пациента, в клеточной культуре. Затем проводится высокочувствительный тест для поиска клеток нужной специфичности. Ещё одна сложность при определении антиопухолевого иммунного ответа заключается в адекватном выборе места забора материала для поиска специфических иммунных клеток. Несмотря на то, что злокачественные опухоли относят к системным заболеваниям, определение функциональной активности лимфоцитов и моноцитов периферической крови зачастую не отражает иммунологического статуса непосредственно в месте опухолевого роста. Например, установлено, что концентрация определённых субпопуляций лимфоцитов значительно выше непосредственно в опухоли, в органе, поражённом опухолью либо в дренирующих лимфоузлах, по сравнению с периферическим кровотоком [8]. Поэтому поиск соответствующих клеток в периферической крови зачастую оказывается неэффективным. И тем не менее, периферическая кровь остаётся на сегодняшний день основным источником материала для иммунологических исследований у онкобольных, поскольку проведение биопсии сопряжено с риском для здоровья пациента и не всегда позволяет получить достаточное количество клеток для анализа. Несмотря на указанные проблемы, в настоящее время разработаны некоторые методики, позволяющие оценивать антиопухолевый иммунный ответ у пациентов в клинике. Эти методы условно делят на фенотипические и функциональные.

При фенотипических исследованиях определяют относительное и абсолютное содержание различных субпопуляций иммунных клеток в крови или других средах организма. В основе этой группы исследований лежит идентификация клеток на основании набора поверхностных антигенов (фенотипических маркеров), которые клетки экспрессируют на своей поверхности. Такие исследования удобно проводить, используя метод проточной цитометрии. Проточная цитометрия начала успешно применяться с 70-х годов XX в. для характеристики лимфоцитов человека и оказалась исключительно эффективной для целей иммунодиагностики. Приготовление антител на различные рецепторы позволило количественно оценить распределение разнообразных рецепторов на клетках иммунной системы, определить факторы, вызывающие их экспрессию или подавление, охарактеризовать систему клеточного иммунитета при разных заболеваниях. В клинике метод с успехом используется для определе-

ния клеточного состава крови, костного мозга и некоторых других тканей. Такое исследование называется иммунофенотипированием.

Другая группа методик – функциональные исследования – подразумевает определение функциональной активности иммунных клеток. Сюда относится определение пролиферативной активности, цитотоксичности, способности продуцировать определенные цитокины и т.п. [18]. Поскольку фенотипическая экспрессия определенных маркеров не всегда коррелирует с функциональной активностью клеток, лишь комплексное использование фенотипических и функциональных методов может дать наиболее достоверную информацию о состоянии противоопухолевого иммунитета у пациента.

Что касается фенотипических исследований, то здесь необходим правильный подбор панели маркеров (моноклональных антител) для исследования конкретных клеточных субпопуляций. Несмотря на понятное желание использовать как можно более широкий набор маркеров, рекомендуется отбирать лишь наиболее информативные, в зависимости от целей исследования. В частности, для оценки иммунитета у онкопациентов рекомендуется использовать маркеры, позволяющие идентифицировать Т-клетки и их субпопуляции, В- и ЕК-клетки, маркеры активации, молекулы клеточной адгезии и ко-стимулирующие молекулы. Для пациентов, получающих курс лечения, рекомендуется иммунологический мониторинг, включающий проведение однотипных тестов до, в течение и после лечения.

Современные методы иммунологического обследования онкобольных можно условно разделить на 2 направления: 1) методы оценки общего состояния иммунной системы (содержание в крови Т- и ЕК-клеток, их способность пролиферировать и секретировать цитокины и пр.) и 2) методы оценки специфического противоопухолевого иммунитета. Вторая группа методов требует наличия опухолевых клеток или антигенов от конкретного больного, и поэтому может выполняться лишь в ограниченном количестве случаев, например – после проведения биопсии или оперативного удаления опухоли, а также у лиц, подвергнутых специфической противоопухолевой вакцинации [18].

Опыт показывает, что выявление диагностически значимых изменений содержания иммунокомпетентных клеток у конкретного человека представляет собой сложную задачу по ряду причин. Во-первых, физиологические границы нормы довольно широки. Во-вторых, содержание большинства субпопуляций лимфоцитов в крови человека в норме существенно колеблется в зависимости от времени суток, приема пищи, физической активности и психоэмоционального состояния человека. Наконец, некоторые исследуемые клеточные субпопуляции относительно малочисленны и составляют всего лишь незначительную часть общего количества лимфоцитов. Измене-

ния в таких «минорных» субпопуляциях, возникшие, например, по причине заболевания либо в результате проведенного лечения иногда не превышают погрешностей измерения используемой методики.

Нередко возникают проблемы и с интерпретацией результатов, полученных методом проточной цитометрии. Например, однотипные изменения абсолютного либо относительного содержания иммунных клеток могут быть обусловлены различными причинами. Так, при лечебном применении интерлейкина-2 (IL-2) увеличение количества циркулирующих ЕК-клеток может происходить как по причине активации защитных реакций иммунитета, так и вследствие повышения проницаемости кровеносных сосудов [18]. Иногда определяются изменения содержания нескольких различных клеточных субпопуляций и необходимо выяснять, какие именно изменения связаны с заболеванием либо проводимым лечением. При этом нередки случаи, когда не удаётся установить четкой корреляции даже при значительных и многочисленных изменениях иммунограммы. По вышеназванным причинам интерпретация результатов, полученных методом проточной цитометрии, нередко представляет существенные трудности для врачей.

Несмотря на существующие сложности, можно предположить, что диагностический потенциал стандартного иммунофенотипирования в онкологии раскрыт ещё не полностью. Так, некоторые закономерности, которые можно использовать при анализе результатов иммунофенотипирования, были выявлены при изучении опухолей дыхательной системы. У больных раком легкого было обнаружено значительное увеличение относительного содержания естественных киллеров (ЕК) в периферическом кровотоке, а также отмечалось некоторое уменьшение общего количества Т-лимфоцитов и тенденция к увеличению количества В-лимфоцитов [1]. Кроме того, авторами было обнаружено усиление экспрессии на лимфоцитах маркеров активации: антигенов CD25 и CD71. Повышение содержания ЕК у пациентов, в организме которых происходит рост опухоли, представляется закономерной защитной реакцией. Ведь ЕК-клетки являются одним из наиболее эффективных компонентов неспецифического иммунитета. Они способны лизировать клетки-мишени и продуцировать цитокины, участвующие в регуляции реакций врожденного иммунитета [19]. В то же время, возникает вопрос: почему казалось бы усиленная за счет повышенного содержания ЕК-клеток иммунная система не останавливает роста опухоли? Ответ, по видимому, заключается в том, что эффекторные клетки, способные защитить организм, у пациентов с онкопатологией могут находиться в функционально угнетённом (инактивированном) состоянии.

Например, на CD8⁺ Т-клетках могут экспрессироваться ингибирующие рецепторы CD158b и

НКВ1. Оказалось, что среди присутствующих в опухоли (опухоль-инфильтрующих) лимфоцитов у больных раком эндометрия процент таких «неактивных» Т-клеток примерно в 5 раз выше, чем в крови здоровых людей [3].

Создаётся впечатление, что иммунная система пытается бороться с опухолью, увеличивая содержание необходимых для этого «клеток-защитников», однако они по какой-то причине оказываются заблокированными в результате экспрессии и тормозящего воздействия ингибирующих рецепторов. Аналогичный феномен описан для больных СПИДом, которые, как известно, имеют повышенный риск развития онкологических заболеваний. Обнаружено, что в крови больных СПИДом можно выявить 2 субпопуляции ЕК клеток: с нормальным фенотипом (CD56⁺CD16⁺) и с резко сниженным содержанием антигена CD56 на клеточной мембране (фенотип CD56-CD16⁺) [14]. Причём количество таких дефектных ЕК значительно возрастает при виремии. Естественные киллеры, утратившие CD56 антиген, обладают резко сниженной функциональной активностью, что проявляется угнетением их цитолитической активности и значительным снижением способности секретировать цитокины, обладающие противовирусной и противоопухолевой активностью [10]. В качестве ещё одного примера угнетения функциональной активности лимфоидных клеток можно привести данные о биологических последствиях диоксиновой интоксикации. Установлено, что острое отравление диоксином не приводит к заметным количественным изменениям основных субпопуляций лимфоцитов у подопытных животных, и в то же время наблюдается существенное снижение их цитолитической активности, что повышает вероятность возникновения опухолей различной локализации [6,12,13]. Перечисленные факты ещё раз подтверждают давно известный тезис о том, что отсутствие количественных нарушений субпопуляционного состава лимфоцитов отнюдь не исключает наличия их качественных особенностей, проявляющихся активацией иммунитета либо иммуносупрессией [7]. Поэтому при иммунофенотипировании материалов от людей с опухолевой патологией и лиц из групп риска необходимо тестировать присутствие на клетках ингибирующих рецепторов, цитокиновых рецепторов, молекул клеточной адгезии и других маркеров, позволяющих оценивать функциональную активность иммунных клеток. В диагностических целях очень информативным могло бы стать обнаружение в крови ЕК-клеток, выполняющих специфические антиопухолевые функции, однако до сих пор не удаётся идентифицировать рецепторный белок или иной поверхностный маркер, который был бы специфичен для функции распознавания и лизиса трансформированных клеток [14].

Подводя итог сказанному, можно заключить, что однократное иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови может оказаться

недостаточно информативным при опухолевой патологии негематологического профиля. Нельзя не согласиться с мнением, что «иммунологические параметры у пациентов целесообразно оценивать индивидуально, на этапе диагностики и последующего наблюдения, так как сравнение со среднестатистическими показателями не отражает реального состояния иммунологической реактивности вследствие широкого диапазона показателей в норме. Поэтому при проведении иммунологических исследований необходимо изучать динамику того или иного показателя у конкретного обследуемого и определять его общие тенденции на разных этапах обследования» [1]. Таким образом, несмотря на большой объём имеющейся научной информации относительно изменений иммунной системы при опухолевом росте, существует необходимость усовершенствования известных и разработки новых иммунологических методик и диагностических критериев, пригодных для скрининговых обследований, а также для мониторинга за течением заболевания и результативностью лечения [2].

Выводы

1. Анализ литературных источников свидетельствует о необходимости разработки новых эффективных и безопасных методов диагностики предопухолевых и опухолевых заболеваний человека.

2. Исследования особенностей популяционного состава лимфоцитов периферической крови (иммунофенотипирование) у разных групп пациентов, судя по литературным данным, пока не позволили разработать достаточно четких диагностических критериев опухолевого роста, пригодных для использования в клинике.

3. Проведенный анализ подтверждает существование нарушений определённых звеньев иммунитета у лиц, предрасположенных либо страдающих онкозаболеваниями, что указывает на перспективность поиска соответствующих диагностических критериев и целесообразность иммунологического обследования больных с опухолями и групп риска с целью решения вопроса о рациональной иммунокорректирующей терапии.

Литература

1. Бахлаев И.Е., Олейник Е.К., Олейник В.М., Агеенко А.И. Сравнительный анализ иммунологических методов исследования в скрининге, диагностике и мониторинге рака легкого // Онкология. – 2000. – Т.2, № 1-2. – С.60-63.
2. Carpenter A.B., Whiteside T.L. Cellular Assays for the Evaluation of Human Tumors // In: Nakamura R.M., Burec C.L., Cook L. et al, eds. Clinical Diagnostic Immunology. Blackwell Science, 1998. – P.322-334.
3. Chang W.C., Huang S.C., Torng P.L., Chang D.Y. et al. Expression of inhibitory natural killer receptors on tumor-infiltrating CD8 T lymphocyte lineage in human endometrial carcinoma //

- Int. J. Gynecol. Cancer. – 2005. – Vol.15(6). – P.1073-1080.
4. Fields A.L., Jones J.G., Thomas G.N., Runowicz C.D. Gynecologic cancer // In: Lenhard RE, Os-teen RT, Gansler T, eds. Clinical Oncology. At-lanta, Ga: American Cancer Society. – 2001. – P.455-496.
 5. Garber, Ken. Spotting Cancer Sooner: Simple but accurate blood tests may soon make it possible to detect cancer while it can still be cured // Techno-logy Review. – 2004. – July/August. – P.62-68.
 6. Kerkvliet N.I., Baecher-Steppan L., Shepherd D.M. et al. Inhibition of TC-1 cytokine produc-tion, effector cytotoxic T lymphocyte develop-ment and alloantibody production by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin // J. Immunol. – 1996. – Vol.157. – P.2310-2319.
 7. Kerkvliet N.I., Brauner J.A. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus of mice exposed to an acute immunosuppressive dose of 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin (TCDD) // Environ Res. – 1990. – Vol.52(2). – P.146-54.
 8. Lai P., Rabinovich H., Crowley-Nowick P.A. et al. Alterations in expression and function of sig-nal transduction proteins in tumor associated NK and T lymphocytes from patients with ovarian carcinoma // Clin. Cancer Res. – 1996. – N.2. – P.161-173.
 9. Lasberg R.G., Tjuvajev J.G. Molecular-genetic imaging: current and future perspectives // J.Clin. Invest. – 2003. – Vol.111. – P.1620-1629.
 10. Mavilio D., Lombardo G., Benjamin J. et al. Characterization of CD56CD16 natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals // PNAS. – 2005. – Vol.102, N8. – P.2886-2891.
 11. Miles A., Cockburn J., Smith R.A., Wardle J. A perspective from countries using organized screening programs // Cancer. – 2004. – N.101(5 Suppl). – P.1201-1213
 12. Moos, A.B., Baecher-Steppan, L., Kerkvliet, N.I. Acute inflammatory response to sheep red blood cells in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin: The role of proinflammatory cyto-kines, IL-1 and TNF // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1994. – Vol.127. – P.331-335.
 13. Moos A.B., Oughton J.A., Kerkvliet N.I. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on tumor necrosis factor (TNF) produc-tion by peritoneal cells // Toxicol.Lett. – 1997. – Vol.90. - P.145-153
 14. O’Gorman M.R.G., Gilman-Sachs A., Baum L.L., Fletcher M.A. Cellular Immune Funktion Tests // In: Nakamura R.M., Burec C.L., Cook L. et al, eds. Clinical Diagnostic Immunology. Blackwell Science, 1998. – P.127-146.
 15. Phillips, Michael, et al. Detection of Lung Cancer With Volatile Markers in the Breath // Chest. – 2003. – Vol.123. – P.2115-2123.
 16. Robert A. Smith, Vilma Cokkinides, Harmon J. Eyre. American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer, 2006 // CA Cancer J. Clin. – 2006. – N.56. – P.11-25.
 17. Walker J.L., Nunez E.R. Endometrial Cancer // In: Kramer, B.S., Gohagan J.K., Prorok P.C., eds. Cancer Screening: Theory and Practice. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. – P.531-566.
 18. Whiteside T.L., Hank J.A. Monitoring of immu-nologic therapies // In: Rose N.R., Conway de Macario E., Folds J.D. et al, eds. Manual of Clini-cal Laboratory Immunology, Fifth Edition. Wash-ington, DC: ASM Press, 1997. – P.1065-1073.

INFORMATION CONTENT OF IMMUNOPHENOTYPING WHEN DIAGNOSING TUMOR PATHOLOGY OF NON-HEMATHOLOGICAL PROFILE

V.G.Dubinina

Abstract. The paper deals with an analysis of recent bibliographical findings concerning possibilities for the diagnos-tic application of flow cytometry and specifically, the immunophenotyping, technique for the detection of oncological pa-thology. Irrespective of the fact that various shifts in the subpopulations of lymphoid cells in oncological patients have already been described, it hasn't been possible to work out clear-cut immunologic criteria in view of nonspecificity of re-vealed changes and a possibility of similar disturbances of immunity in case of other diseases. In order to evaluate antitu-moral immunity by means of flow cytometry techniques it is recommended to determine T-cells and their subpopulations, B and NK –cells, as well as activation markers, inhibiting receptors and molecules and cellular adhesion. Complex testing of phenotypic and functional characteristics of immune cells is the most informative one. A conclusion to the effect of pros-pects and topicality of further studies in this direction has been drawn.

Key words: oncology, immunophenotyping, early diagnostics, immunology.

State Medical University (Odessa)

Рецензент – проф. О.В.Кравченко

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №1.- P.122-126

Надійшла до редакції 24.11.2006 року