

*И.Е. Бахлаев
Е.К. Олейник
В.М. Олейник
А.И. Агеенко*

*Петрозаводский
государственный университет,
Петрозаводск, Россия*

*Институт биологии
Карельского научного центра
РАН, Петрозаводск, Россия*

Ключевые слова: рак легкого, диагностика, иммунологические методы, скрининг, мониторинг.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В СКРИНИНГЕ, ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ РАКА ЛЕГКОГО

Резюме. Проведена сравнительная оценка иммунологических тестов и маркеров опухолевого роста у больных раком легкого, используемых на этапах диагностики, лечения и последующего наблюдения за пациентами. Установлено, что при проведении первичного скрининга и диагностики рака легкого целесообразно использовать тест на опухолевый рост (РО-тест). РО-тест и кожная реакция с аутологичными модифицированными лимфоцитами эффективны при проведении дифференциальной диагностики рака и неопухолевых заболеваний легких. Одновременное выполнение этих тестов в комбинации с другими методами обследования позволяет в 96,6% наблюдений установить правильный диагноз. Исследованные маркеры можно применять также для послеоперационного мониторинга больных раком легкого и определения прогноза заболевания.

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого (РЛ) занимает первое место как в общей структуре онкологической заболеваемости, так и среди злокачественных опухолей у мужчин [1]. Пятилетняя выживаемость всех больных РЛ не превышает 10–15%, а при мелкоклеточном раке этот показатель составляет лишь 1–3% [2].

Значительный рост числа случаев РЛ, высокий процент запущенных форм, малоудовлетворительные результаты лечения определяют необходимость поиска новых методов диагностики. Несмотря на применение комплекса различных методов обследования, многие вопросы раннего выявления РЛ остаются еще не решенными [3]. В этой связи несомненный интерес представляют возможности использования иммунологических исследований в комплексной диагностике и прогнозировании РЛ [4, 5]. Использование маркеров опухолевого роста считается целесообразным в скрининге опухолей легких [6]. Предполагается, что дальнейшая разработка и внедрение в клиническую практику опухолевых маркеров, выявляемых с помощью моноклональных антител, может открыть в ближайшее время новые перспективы в диагностике и мониторинге онкологических заболеваний [7–9].

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности применения иммунологических методов обследования в скрининге, диагностике и мониторинге РЛ.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Скрининг проведен среди организованного (8435) и неорганизованного (4105) населения в возрасте от 25 до 75 лет. Мужчин было 5930, женщин — 6610. На первом этапе обследования использовали методику автоматизированного анамнестического скрининга. На основании полученных данных

формировали группы повышенного риска онкологических заболеваний, в которые включили 1636 пациентов. На втором этапе наряду с традиционными методами проводили иммунологическое тестирование. В качестве тестов использовали определение уровня раково-эмбрионального антигена (РЭА), кожную реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) с аутологичными модифицированными фитогемагглютинином (ФГА) лимфоцитами и тест на опухолевый рост (РО-тест). Концентрацию РЭА в сыворотке крови определяли с помощью метода радиоиммунологического анализа с использованием набора РИО-РЭА-¹²⁵I-М (ИБОХ, Минск). Кожную реакцию ГЗТ осуществляли путем внутрикожного введения пациентам в предплечье 0,1 мл суспензии аутологичных лимфоцитов крови, обработанных ФГА («Serva», Германия). Кожный тест оценивали путем измерения поперечного по отношению к оси предплечья диаметра зоны гиперемии через 24, 48 и 72 ч после постановки реакции [10]. РО-тест основан на фиксировании изменений параметров гемагглютинации, определяемой в реакции СОЭ с добавлением антисыворотки против эмбрионального дифференцировочного антигена ЭПА-10 (антисыворотка изготовлена в лаборатории вирусологии и клинической иммунологии МНИОИ им. П.А. Герцена, рук. А.И. Агеенко). Авторы теста (Агеенко А.И., Ерхов В.С. Патент от 12.10.92 г. № 183 66 40 «Способ диагностики опухолей») рассчитали коэффициент, который может быть использован как маркер опухолевого процесса, если его величина превышает 1,5 условных единиц (усл. ед.) [11].

Диагностическая эффективность иммунологических методов исследования определена у 384 пациентов с различными заболеваниями легких, по-

Эффективность иммунологического скрининга злокачественных новообразований

Метод исследования	Число обследованных с положительной реакцией	Число выявленных онкологических заболеваний
РЭА	58	3
Кожный тест	248	13
РО-тест	324	41
Всего	630	57

ступивших в хирургическое отделение с подозрением на РЛ. В результате комплексного обследования у 296 больных диагностирован РЛ, у 19 — доброкачественная опухоль легкого (ДОЛ) и у 69 — неопухолевые заболевания легких (НЗЛ). Возраст пациентов — от 30 до 69 лет. Большинство больных с ДОЛ составили мужчины — 17, женщин в этой группе было 2. В группе пациентов с НЗЛ мужчин было 59, женщин — 10. Из 69 больных с НЗЛ у 27 диагностирована острая пневмония, у 8 — хроническая, у 25 — хронический бронхит, у 3 — туберкулез, у 2 — актиномикоз, у 2 — инородное тело бронха и по 1 случаю — саркоидоз Бека и гранулематоз Вегенера. Контрольную группу составили 40 практически здоровых доноров (мужчин — 28, женщин — 12) в возрасте от 30 до 55 лет.

Среди больных РЛ мужчин было 272, женщин — 24. Периферический рак диагностирован у 36,5%, центральный — у 63,5%. Диагноз РЛ I стадии был установлен 65 больным, II стадии — 78, III стадии — 113 и IV стадии — 40 (согласно TNM-классификации злокачественных опухолей, 1997 г.). По данным гистологического исследования плоскоклеточный рак был диагностирован в 60,1%, аденокарцинома — в 21,7% и мелкоклеточный рак — в 18,2% случаев.

Иммунологические исследования выполняли при поступлении больных в стационар. Определяли абсолютное и относительное содержание Т- и В-лимфоцитов, фенотипирование лимфоцитов крови проводили с помощью панели моноклональных антител против CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, CD25, CD71 серии ИКО («Биоскрин», ОНЦ РАМН) в реакции непрямой иммунофлуоресценции [12]. Уровень иммуноглобулинов G, M, A в сыворотке крови исследовали с использованием моноспецифических антисывороток. Пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с ФГА, конканавалином А (Кон А), митогеном лаконоса (МЛ) по включению ³H-тимидина [13]. Кроме того, всем поступившим больным проводили следующие тесты: РЭА, кожной реакции ГЗТ с аутологичными модифицированными ФГА лимфоцитами и РО-тест. Диагностическую значимость маркеров опухолевого роста оценивали по их чувствительности — ИП:ИП + ЛО и специфичности — ИО:ИО + ЛП (где ИП — истинно положительный результат, ЛО — ложноотрицательный, ИО — истинно отрицательный, ЛП — ложноположительный). Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с расчетом уровня достоверности с помощью критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных табл. 1, положительные результаты онкотестов среди 8435 лиц, проходивших скрининговое тестирование, отмечены у 630. Из них у 57 выявлены злокачественные опухоли различной локализации (желудка — у 19, легких — у 14, почек — у 6, гениталий — у 6, толстой кишки — у 5, молочной железы — у 4, дру-

гих органов — у 3). У 17 пациентов из 57 отмечено бессимптомное течение болезни. Среди 14 больных с установленным диагнозом РЛ I и II стадии определены в 10 случаях.

После проведения всех этапов скрининга около 38% пациентов были включены в группу повышенного риска. В нее вошли лица старше 30 лет, работающие на вредных производствах, имеющих наследственные заболевания, злоупотребляющие курением; страдающие хроническими, фоновыми и предраковыми заболеваниями. В группу риска были включены также пациенты с неуточненным диагнозом при повышении температуры тела, с повышенной СОЭ, а также лица с положительным онкотестом. Следует отметить, что при последующем мониторинге у 1 больного с хроническим бронхитом и у 1 — с язвенной болезнью желудка (РО-тест 2,56 и 2,31 усл. ед.) через 11 и 8 мес соответственно диагностирован РЛ и рак желудка.

При сравнительном анализе иммунологических показателей у больных РЛ, НЗЛ и ДОЛ установлено, что в среднем количество лимфоцитов у них существенно не отличалось от такового у здоровых лиц (табл. 2). Общее количество Т-лимфоцитов у больных РЛ II и IV стадий уменьшено на 15–18% по сравнению с таковым в контрольной

Таблица 2

Динамика численности больных РЛ с положительными результатами тестов до и после операции

Характер операции	Число больных	Тест	До операции	После операции (мес)		
				1	3	6
Радикальная	132	РЭА	68	64	62	57
		ГЗТ	114	9	7	9
		РО	112	93	39	12
Нерадикальная	21	РЭА	11	11	11	11
		ГЗТ	18	18	16	16
		РО	17	16	15	14

группе ($p < 0,05$). Нами отмечена тенденция к увеличению количества В-лимфоцитов у больных РЛ и НЗЛ. Достоверного изменения уровня основных классов сывороточных иммуноглобулинов не было.

Изучение у больных РЛ фенотипа лимфоцитов крови показало, что наблюдается тенденция к усилению экспрессии дифференцировочных антигенов CD4, CD8, CD16, CD22. Было выявлено значительно большее количество естественных киллеров (CD16-позитивных лимфоцитов) у больных РЛ по сравнению с таковым у здоровых доноров ($30,9 \pm 2$ и $21,1 \pm 1,3$ соответственно). Количество CD25-позитивных клеток (то есть имеющих рецептор ИЛ-2) у больных РЛ было почти вдвое больше, чем у здоровых лиц ($32,2 \pm 1,6$ и $17,9 \pm 1$ соответственно). Аналогичная картина наблюдалась относительно рецептора трансферрина CD71: у больных РЛ количество CD71-позитивных клеток составляло

31,8 ± 1,7, а у доноров контрольной группы — 16,9 ± 1. Значительные изменения иммунологических показателей у больных РЛ отражают активацию клеток иммунной системы.

Анализ результатов стимулированной митогенами РБТЛ показал, что пролиферативный ответ лимфоцитов у больных РЛ на все использованные нами митогены был ниже, чем лимфоцитов у доноров контрольной группы. Наиболее существенным было различие в ответе на МЛ, хотя на разных стадиях заболевания индексы стимуляции практически не отличались (I–II стадия — 14 ± 1,9, II–IV стадия — 14,4 ± 1,7, контроль — 39,1 ± 3,2). Уровень пролиферации, индуцированной ФГА и Кон А, снижался в динамике заболевания, значительное угнетение включения метки по сравнению с контролем было отмечено у больных с III–IV стадией ($p < 0,01$). Достоверного изменения индекса стимуляции у больных с НЗЛ и ДОЛ в сравнении с таковым у здоровых лиц не было.

Концентрация РЭА в сыворотке крови превышала принятый за норму уровень у 155 (52,4%) из 296 больных РЛ. Уровень РЭА выше верхней границы нормы отмечен у 3 больных с ДОЛ (15,8%), у 24 (34,8%) — с НЗЛ и у 4 (40%) здоровых лиц. Полученные данные свидетельствуют о недостаточной эффективности использования этого метода для диагностических целей.

Результаты исследования кожной реакции ГЗТ с аутологичными лимфоцитами показали, что частота положительного теста у больных с ДОЛ составляет 5,3%, у больных с НЗЛ — 11,6% и у здоровых лиц — 5%. У больных РЛ I–III стадии положительная кожная реакция отмечена в 85,7% наблюдений, IV стадии — в 75%. Чувствительность метода кожной реакции ГЗТ у больных РЛ составила 84,8%. Кроме того, диаметр зоны гиперемии существенно различался в зависимости от характера заболевания. Так, у больных РЛ подавляющее число положительных реакций (более 10 мм в диаметре) было у 216 (84,4%) человек. Среди больных с ДОЛ лишь у одного из них диаметр зоны гиперемии составил 8 мм. Слабоположительная реакция (до 10 мм) отмечена у 5 и слабовыраженная (до 15 мм) — у 3 больных с НЗЛ. В контрольной группе лишь у 2 больных диаметр зоны гиперемии превышал 5 мм.

Анализ результатов РО-теста показал, что его величина, превышающая 1,5 усл. ед., была у 54 (83,1%) больных с РЛ I стадии, у 68 (87,2%) — II, у 101 (89,4%) — III и у 27 (67,5%) — IV стадии. Частота положительного РО-теста отмечена у 5% лиц контрольной группы, у 10,5% больных с ДОЛ и у 15,9% — с НЗЛ. Чувствительность метода составила 84,5%, специфичность — 88,3%.

У больных РЛ показатели РО-теста колебались в пределах от 0,18 до 9,6 усл. ед. В среднем этот показатель составил 2,37 ± 0,63 усл. ед., что достоверно выше, чем у больных с НЗЛ (0,83 ± 0,21 усл. ед.), ДОЛ (0,64 ± 0,11 усл. ед.) и у здоровых лиц (0,59 ± 0,18 усл. ед.), $p < 0,05$. В группе

пациентов с НЗЛ РО-тест был в пределах от 0,12 до 2,57 усл. ед. В 11 (15,9%) случаях его значение превышало 1,5 усл. ед. В процессе дальнейшего наблюдения у 1 пациента с хроническим бронхитом (РО-тест составлял 2,5 усл. ед.) диагностирован РЛ. У 2 из 19 больных с ДОЛ величина РО-теста составляла 1,65 и 1,86 усл. ед. Все пациенты этой группы оперированы, диагноз ДОЛ верифицирован морфологически.

Применение иммунологических методов при комплексном обследовании больных с подозрением на РЛ позволило установить правильный диагноз в 96,6% наблюдений.

У 153 больных РЛ иммунологические показатели изучены в ранний и отдаленный послеоперационный период. Из них радикально оперированы 132 пациента и у 1 произведена пробная торакотомия. Установлено, что нормализации уровня РЭА у больных РЛ не наступало ни после радикальной операции, ни после пробной торакотомии. Снижение содержания антигена до уровня контроля отмечено лишь у 11 пациентов после радикальной операции (табл. 2).

В группе радикально оперированных больных на 14-е сутки кожная реакция ГЗТ оставалась положительной у 60,6% из них, а на 30-е сутки — лишь у 6,8%. После пробной операции она оставалась положительной у 16 из 18 больных.

Проведение иммунологического мониторинга с помощью РО-теста показало, что в группе нерадикально оперированных больных снижение показателей онкотеста до уровня нормы отмечено лишь в 3 случаях. Через 6 мес после радикальной операции тест оставался положительным у 12 (10,7%) пациентов (в 3 случаях отмечен рецидив и в 6 — прогрессирование заболевания в виде появления отдаленных метастазов).

Заслуживают внимания показатели иммунологической реактивности больных РЛ после радикальной операции при безрецидивном и рецидивном течении заболевания (табл. 3). Наблюдается тенденция к уменьшению общего количества лимфоцитов в случае рецидива заболевания. Повышенное содержание РЭА отмечено как у больных с рецидивом, так и при отсутствии рецидива РЛ.

Анализ показателей пролиферативной активности лимфоцитов в реакции РБТЛ показал, что у пациентов с рецидивом заболевания отмечено достоверное снижение индекса стимуляции. В группе пациентов с безрецидивным течением за-

Таблица 3
Показатели иммунологической реактивности больных РЛ после радикальной операции при рецидивном и безрецидивном течении заболевания

Показатель	Контроль (n = 40)	Послеоперационное течение	
		с рецидивом (n = 32)	без рецидива (n = 36)
Лимфоциты, абс. число	1947 ± 247	1375 ± 324	1894 ± 287
РЭА, нг/мл	7,3 ± 0,8	27,4 ± 4,1 ¹	20,1 ± 2,7 ¹
РБТЛ с ФГА (индекс стимуляции)	74,5 ± 8,3	46,3 ± 5,3 ¹	67,9 ± 7,3 ²
Кожная реакция ГЗТ, мм	3,7 ± 0,5	12,1 ± 1,9 ¹	4,1 ± 1 ²
РО-тест, усл. ед.	0,6 ± 0,2	2,5 ± 0,4 ¹	0,8 ± 0,2 ²

Примечание. ¹ Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ² различия достоверны между группами больных ($p < 0,05$).

болевания средние значения индекса стимуляции были близки к контрольным показателям.

В сроки от 6 до 24 мес после радикальной операции у 30 пациентов отмечен рецидив или прогрессирование заболевания. У 22 (73,3%) из них РО-тест вновь становился положительным. В группе больных с безрецидивным течением показатели РО-теста оставались отрицательными.

В случае рецидива или прогрессирования заболевания кожная реакция ГЗТ вновь становилась положительной в 85% наблюдений, причем эту Т-зависимую клеточную реактивность наблюдали за 3–4 мес до клинико-рентгенологических проявлений рецидива опухоли.

Из 39 больных с рецидивом или прогрессированием РЛ у 6 выполнена повторная операция и у 26 — проведена лучевая терапия.

Установлено, что иммунологические параметры у пациентов с заболеваниями легких 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 (рисунок).

ВЫВОДЫ

Иммунологические тесты можно использовать в скрининговых программах по раннему выявлению злокачественных опухолей легких и при формировании групп повышенного риска онкологических заболеваний. Из рассмотренных методов преимущество имеет РО-тест в силу его простоты и доступности, быстроты ответа, высокой чувствительности и специфичности. РО-тест можно проводить в амбулаторных условиях. Иммунологические методы исследования целесообразно использовать для оценки иммунологической реактивности организма больного и для определения показаний к проведению иммунокоррекции. Проведение иммуно-

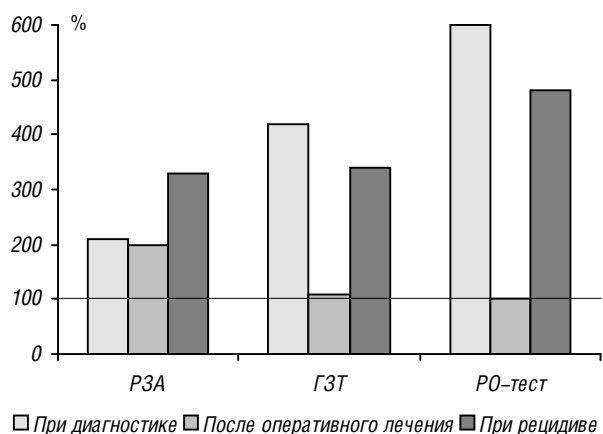


Рисунок. Иммунологическая реактивность у больного Б. на разных этапах обследования

гического мониторинга у оперированных больных РЛ позволяет адекватно оценить радикальность выполненной операции, прогнозировать дальнейшее течение заболевания и обеспечивает своевременную диагностику рецидива опухоли.

Работа поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (грант 98-04-03521).

ЛИТЕРАТУРА

1. Двойрин ВВ, Трапезников НН. Статистика рака легкого в России. Вестн ОНЦ АМН России 1996; (2): 3–12.
2. Eckersberger F. Bronchialcarcinom. Wien Med Wochensh 1994; 144: 545–7.
3. Барчук АС, Вагнер РИ, Лемехов ВИ и др. Современные подходы к диагностике и лечению рака легкого. Вопр онкол 1997; 43 (1): 15–21.
4. Niklinski J, Furman M. Clinical tumour markers in lung cancer. Eur J Cancer Prev 1995; 4: 129–138.
5. Чиссов ВИ, Соколов ВВ, Телегина ЛВ и др. Прогнозирование развития рецидивов и метастатических очагов начального центрального рака легкого с использованием МКАТ ИКО-25. Рос онкол журн 1997; (3): 32–7.
6. Leschke M, Strauer BE. Diagnostik von Bronchialkarzinomen. MTA 1994; 9: 630–5.
7. Lamerz R. Tumormarker. MTA 1993; 8: 1029–30.
8. Pandha HS, Waxman J. Tumour markers. Quart J Med 1995; 38: 233–41.
9. Suresh MR. Classification of tumour markers. Anticancer Res 1996; 16: 2273–8.
10. Агеенко АИ, Ерхов ВС, Бахлаев ИЕ и др. Кожная реакция гиперчувствительности замедленного типа с аутологичными модифицированными лимфоцитами крови больных раком легкого. Эксперим онкол 1994; 16: 367–70.
11. Белоглазова СЕ, Агеенко АИ, Ерхов ВС, Петросян АС. Диагностическое значение РО-теста в оперативной гинекологии. Акушерство и гинекология 1995; (5): 33–4.
12. Кадагидзе ЗГ. Использование моноклональных антител в клинической онкологии. Гематол и трансфузиол 1990; (8): 21–3.
13. Олейник ЕК, Бахлаев ИЕ, Агеенко АИ. Активация лимфоцитов крови больных раком легкого поликлональными митогенами. Вопр онкол 1997; 43: 584–6.

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOLOGICAL METHODS OF INVESTIGATION IN SCREENING, DIAGNOSTICS AND MONITORING OF LUNG CANCER

I.E. Bachlaev, E.K. Oleinik,
V.M. Oleinik, A.I. Ageenko

Summary. The importance of several immunological assays as well as markers of tumor growth in diagnostics, treatment and follow-up of lung cancer patients has been evaluated. RO-test has been shown to be more expedient in primary screening and diagnostics of lung cancer than the carcinoembryonic antigen assay. RO-test and skin reaction with autologous modified lymphocytes could be effective in the differential diagnostics between lung cancer and nontumor lung diseases. The combination of the assays under study with other methods has resulted in 96.6% accuracy of the diagnosis. The assays could also be useful for the prognosis and postoperative monitoring of lung cancer patients.

Key Words: lung cancer, diagnostics, immunological methods, screening, monitoring.