

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМБИНАЦИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОПУХОЛЕВОГО
МЕТАБОЛИЗМА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО**

Мурашко Д. И.,

*ассистент кафедры биологической химии,
УО «Белорусский государственный медицинский
университет»,*

Таганович А. Д.,

*д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии,
УО «Белорусский государственный медицинский
университет»,*

*УО «Белорусский государственный медицинский
университет»,*

Ковганко Н. Н.,

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,
УО «Белорусский государственный медицинский
университет»*

dashaturashkai@mail.ru

Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире. Поздняя его диагностика существенно сказывается на выживаемости пациентов. При этом, в настоящее время не существует доступных и информативных показателей, позволяющих выявить НМКРЛ, в особенности, на ранних его стадиях.

Ключевые слова: *Немелкоклеточный рак легкого; аденокарцинома; плоскоклеточный рак; рецептор; CXCR1; CXCR2; гиалуроновая кислота*

**PROSPECTS OF THE USE OF RELATIVE NUMBER OF
LYMPHOCYTES CONTAINING CXCR2, FLUORESCENCE INTENSIVITY
OF CXCR1 IN GRANULOCYTES AND HIALURONIC ACID SERUM
LEVEL IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER DIAGNOSIS**

Murashka D.I.,

*assistant of the department of biological chemistry,
Belarusian State Medical University,*

Tahanovich A. D.,

*doctor of medical sciences., professor,
head of the department of biological chemistry,
Belarusian State Medical University,*

Kauhanka M. M.,

*candidate of chemical sciences,
associate professor of the department of biological chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most widespread malignant neoplasms all over the world. Late diagnosis of this disease significantly worsens its prognosis. Nevertheless, currently there are no available and informative biomarkers which would allow to identify NSCLC, especially, in its early stages.

Key words. *Non-small cell lung cancer; adenocarcinoma; squamous cell carcinoma; receptor; CXCR1; CXCR2; hyaluronic acid*

В 2018 году зарегистрировано 2.1 млн. новых случаев рака легкого (12% от всех диагностируемых случаев рака) [1]. В структуре заболеваемости раком легкого 85% принадлежит немелкоклеточному раку (НМКРЛ), который, в свою очередь, включает в себя два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) [2].

В сравнении с ПКРЛ, для АК характерно менее агрессивное течение и значительно лучший прогноз. Так, пятилетняя выживаемость пациентов с установленной I стадией АК и ПКРЛ соответственно составляет 79% и 47% соответственно и снижается более, чем на треть, уже на II стадии НМКРЛ обоих гистологических подтипов. У пациентов с IV стадией АК и ПКРЛ выживаемость составляет лишь 6% и 2% соответственно [3].

В настоящее время не существует информативных и специфичных биомаркеров, позволяющих выявить ранние стадии как АК и ПКРЛ. С целью уточнения диагноза определяют уровень CYFRA 21-1 (фрагмента цитокератина 19) и SCC (антигена плоскоклеточной карциномы) в сыворотке крови пациентов. Однако диагностическая чувствительность определения их невысока.

Рост любой злокачественной опухоли сопровождается развитием воспаления в окружающей ее ткани. Клетки воспалительного микроокружения и стромы опухоли продуцируют большое количество цитокинов, хемокинов и транскрипционных факторов, ответственных за жизнеобеспечение опухоли в условиях интенсивной пролиферации опухолевых клеток и связанной с этим гипоксии [4, 5].

CXCL5 и CXCL8 – провоспалительные хемокины, обладающие ангиогенной активностью. Связывание их с рецепторами CXCR1 и CXCR2 способствует привлечению иммунных клеток в зону воспаления, запускают ангиогенез и метастазирование опухоли [4].

HIF-1 α – индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор, ответственный за экспрессию адгезионного рецептора CD44v6. Его основным лигандом является гиалуриновая кислота (ГК). Взаимодействие ГК с CD44v6 приводит к активации фермента матриксной металлопротеиназы 9, играющей существенную роль в опухолевой инвазии [6].

Целью настоящего исследования явилось установление возможности использования компонентов осей CXCL8/CXCR1, CXCL5/CXCR2, HIF-1 α /CD44v6/ГК в диагностике ПКРЛ и АК, в особенности, на его ранних стадиях.

Материалы и методы. Обследовано 107 пациентов с ПКРЛ и 90 пациентов с АК (стадия I по классификации TNM – 21 и 24 пациента

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

соответственно; стадия II – 41 и 27, соответственно; стадия III – 41 и 29, соответственно; IV – 4 и 10, соответственно) при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александра в период 2019-2021 гг. В качестве группы контроля обследовано 40 человек без проявлений заболевания в возрасте 43 - 67 лет.

Определение концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа, измерение уровня ГК -методом иммуноферментного анализа. Относительное количество клеток крови, снабженных рецептором CXCR2, и плотность расположения рецептора CXCR1 в них (MFI) в клетках крови определялись методом проточной цитометрии.

Статистическую обработку данных проводили методами непараметрической статистики с использованием программного пакета MedCalc (США). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25% - 75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни. О взаимосвязи между определяемыми показателями и стадиями заболевания судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью построения характеристических ROC-кривых, вычисления площади под ней (AUC), а также расчета диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и эффективности теста (ДЭ). Пороговое значение диагностического теста определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении ROC-кривых.

Построение диагностической модели осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии.

Результаты. Полученные нами ранее результаты определения компонентов осей CXCL8/CXCR1, CXCL5/CXCR2, HIF-1 α /CD44v6/ГК свидетельствуют о значительном повышении уровня некоторых из них в крови пациентов с АК и ПКРЛ (таблица 1). Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие связи средней силы упомянутых показателей со стадиями заболевания (R > 0,3).

Таблица 1. - Уровень CYFRA 21-1, ГК, CXCR1 и CXCR2 в крови пациентов с НМКРЛ и здоровых людей

Показатель	Контроль	ПКРЛ (стадии)			
		I	II	III-IV	R
MFI CXCR1 гранулоциты	25,5 [20,1;49,0]	32,7 * [18,3;47,2]	47,2 *# [28,9;47,4]	53,9*#† [41,8;87,7]	0,524
CXCR2, лимфоциты %	9,5 [6,3;14,5]	19,2* [16,0;21,2]	24,9*# [15,1;25,9]	31,2*#† [24,0;34,4]	0,689

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

ГК, нг/мл	8,4 [7,1;18,0]	15,1* [10,7;31,1]	22,4 *# [20,7;40,5]	31,7 *#† [29,7;43,3]	0,518
СУFRA-21-1, нг/мл	1,5 [1,2;1,9]	3,1 * [2,2;4,6]	3,6 * [2,1;5,9]	5,6 *#† [4,2;12,3]	0,469
Показатель	Контроль	АК (стадии)			
		I	II	III-IV	R
MFI CXCR1 гранулоцит	25,5 [20,1;49,0]	32,1 * [22,9;50,6]	47,1 *# [41,2;65,7]	56,9 *#† [49,9;66,9]	0,526
CXCR2, лимфоциты	9,5 [6,3;14,5]	16,6* [10,7;21,5]	20,9*# [14,1;34,4]	32,5*#† [24,3;34,3]	0,683
ГК, нг/мл	8,4 [7,1;18,0]	22,4 * [15,0;24,6]	28,7 *# [23,8;32,2]	30,2 *#† [27,0;33,6]	0,567
СУFRA-21-1, нг/мл	1,5 [1,2;1,9]	1,9 * [1,5;4,3]	2,6 * [2,1;3,8]	4,3 *#† [2,8;7,2]	0,329

Примечание: * - достоверность разницы у пациентов с НМКРЛ и здоровых людей; # - достоверность разницы у пациентов со II стадией НМКРЛ и другими его стадиями; † - достоверность разницы у пациентов с III-IV стадией НМКРЛ и I его стадией.

Несмотря на сходные закономерности изменения показателей в крови пациентов с различными гистологическими типами НМКРЛ, результаты проведенного ROC-анализа свидетельствуют о различной диагностической ценности их определения при АК и ПКРЛ. Диагностические параметры их определения в крови пациентов с АК и ПКРЛ указаны в таблице 2.

С целью повышения диагностической ценности показателей для выявления ранних стадий АК и ПКРЛ, дифференцирования их от поздних стадий, а также различия I и II стадий были созданы математические модели, разработанные на основе информативных лабораторных показателей в виде регрессионных уравнений.

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, уровень ГК в сыворотке крови, а также плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах оказались наиболее значимыми факторами, указывающими на наличие у пациента какой-либо из ранних (I - II) стадий ПКРЛ.

$$Y_1 = \frac{\exp(-31,4 + 0,29 * [\text{ГК}] + 1,45 * [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}] + 0,09 * [\text{MFI CXCR1(гранулоциты)}])}{1 + \exp(-31,4 + 0,29 * [\text{ГК}] + 1,45 * [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}] + 0,09 * [\text{MFI CXCR1(гранулоциты)}])}$$

Здесь и далее: Y - вероятность прогнозирования у испытуемого искомого признака, exp – показательная функция, равная e^x, где e - основание натурального логарифма (≈2,718).

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

Диагностическая эффективность регрессионной модели, включающей вышеупомянутые показатели, возрастает на 11,1 – 18,5% в сравнении с таковой определения каждого из них в отдельности (таблица 2). Пороговое значение Y_1 составила 0,59. Это значит, что у испытуемых со значением результирующей переменной более 0,59, с соответствующей чувствительностью прогнозируется ПКРЛ, а при Y_1 менее 0,59 можно исключить ПКРЛ с вероятностью, равной диагностической специфичности модели.

Те же самые показатели также вошли в регрессионную модель, позволяющую со сравнительно высокой эффективностью дифференцировать III-IV стадии ПКРЛ от I-II его стадии (уравнение Y_2 , таблица 2).

$$Y_2 = \frac{\exp(-41,9 + 0,14 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}] + 0,06 * [MFI CXCR1(\text{гранулоциты})])}{1 + \exp(-41,9 + 0,14 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}] + 0,06 * [MFI CXCR1(\text{гранулоциты})])}$$

Совместное определение в крови пациентов уровня ГК и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, позволяет отличить II стадию ПКРЛ от I с чувствительностью 91,3% и специфичностью 95,8% при Y_3 , равном 0,34 (таблица 4.3).

$$Y_3 = \frac{\exp(-23,2 + 0,21 * [ГК] + 0,87 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-23,2 + 0,21 * [ГК] + 0,87 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}$$

В связи со значительными расхождениями в чувствительности и специфичности определяемых показателей при диагностике разных гистологических типов НМКРЛ, были разработаны отдельные диагностические модели для установления у пациентов АК. В регрессионное уравнение Y_4 , позволяющее определить наличие у испытуемых I-II стадий АК, так же, как и в случае ПКРЛ, были включена доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах. и концентрация в сыворотке крови CYFRA 21-1 (таблица 2)

$$Y_4 = \frac{\exp(-22,2 + 4,9 * [CYFRA 21 - 1] + 0,66 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}] + 0,15 * [MFI CXCR1(\text{гранулоциты})])}{1 + \exp(-22,2 + 4,9 * [CYFRA 21 - 1] + 0,66 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}] + 0,15 * [MFI CXCR1(\text{гранулоциты})])}$$

Комбинация уровня CYFRA 21-1 в сыворотке крови испытуемых и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, также продемонстрировала высокую диагностическую эффективность при дифференцировании ранних и поздних стадий АК (уравнение Y_5 , таблица 2).

$$Y_5 = \frac{\exp(-12,3 + 0,37 * [CYFRA 21 - 1] + 0,39 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-12,3 + 0,37 * [CYFRA 21 - 1] + 0,39 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}$$

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

В то же время, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, в сочетании с уровнем ГК в сыворотке крови, так же, как и при ПКРЛ, оказались наиболее информативны при отличии I и II стадий АК (таблица 2).

$$Y_6 = \frac{\exp(-27,3 + 2,41 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-27,3 + 2,41 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}$$

Таблица 2. - Диагностическая значимость индивидуального и комбинированного определения уровня ГК, MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и CYFRA 21-1 в крови здоровых людей и пациентов с НМКРЛ

I-II стадии ПКРЛ/здоровые					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	9,4	77,8	98,4	0,837	83,9
MFI CXCR1, гранулоциты	10,9	98,3	61,1	0,799	76,6
ГК, нг/мл	19,1	76,0	94,7	0,883	84,0
Комбинация (Y1)	0,59	95,7	93,7	0,954	95,1
I-II стадии ПКРЛ/III-IV стадии ПКРЛ					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	22,5	68,9	98,4	0,800	81,1
MFI CXCR1, гранулоциты	44,2	87,5	90,3	0,876	87,0
ГК, нг/мл	23,2	97,6	66,7	0,764	76,2
Комбинация (Y2)	0,64	93,1	93,3	0,956	93,5
I стадия ПКРЛ/II стадия ПКРЛ					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	15,2	80,0	98,7	0,817	82,9
ГК, нг/мл	26,4	90,8	66,7	0,764	81,4
Комбинация (Y3)	0,34	94,4	87,5	0,924	90,3
I-II стадии АК/здоровые					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	9,5	93,2	52,4	0,815	76,8
MFI CXCR1, гранулоциты	10,9	98,3	61,1	0,799	76,6

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

СУFRA 21-1, нг/мл	2,8	72,2	89,7	0,808	82,3
Комбинация (У4)	0,61	91,2	94,7	0,978	93,4
4.5		I-II стадии АК/ III-IV стадии АК			
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
СХСR2 лимфоциты, %	22,1	78,9	79,6	0,780	79,1
СУFRA 21-1, нг/мл	4,1	79,6	63,0	0,737	78,6
Комбинация (У5)	0,15	94,7	91,2	0,923	90,1
4.6		I стадия АК/II стадия АК			
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
СХСR2 лимфоциты, %	11,8	98,2	41,7	0,667	66,8
ГК, нг/мл	25,1	61,5	94,6	0,785	76,2
Комбинация (У6)	0,46	88,2	91,3	0,941	90,2

Полученные результаты свидетельствуют о различной прогностической ценности определяемых показателей при разных гистологических типах НМКРЛ. Так, СУFRA 21-1 в комплексном использовании с другими показателями демонстрирует большую информативность в диагностике ранних стадий АК, в то время как MFI СХСR1 в гранулоцитах – при ПКРЛ.

Уровень ГК в сыворотке крови и MFI СХСR1 в гранулоцитах существенно повышают эффективность определения доли лимфоцитов, снабженных СХСR2, у пациентов с поздними стадиями ПКРЛ, в то время как при III-IV стадиях АК для достижения сопоставимой диагностической ценности достаточно комбинации этого показателя с уровнем в крови СУFRA 21-1.

Комбинация уровня в крови ГК и доли лимфоцитов, снабженных СХСR2, может использоваться в дополнительной оценке распространенности опухолевого процесса на ранних стадиях заболевания при обоих гистологических типах НМКРЛ.

Список литературы

1. Brett C Bade. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology and Prevention // Clin Chest Med. 2020. Vol. 41, № 1. P. 1 – 24.
2. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances // Transl Lung Cancer Res. 2016. Vol. 5, № 3. P. 288-300.
3. Wang B. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients // J Cancer Res Clin Oncol. 2020. Vol 146, №1. P. 43 – 52.

4. Lui Q. The CXCR1/CXCR2 pathways in cancer // Cytokine Growth Factor Rev. 2016.Vol. 31. P. 61–71.

5. Sean Blandin Knight. Progress and prospects of early detection of lung cancer // Open Biol. 2017.Vol. 7, №9. P. 170070.

6. Pirinen R. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small cell lung cancer: increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma // Int J of Cancer, 2001. Vol. 95, №1. P. 2 – 17.