

Прогнозирование опухолевой прогрессии в дооперационном периоде на ранних стадиях немелкоклеточного рака легкого

Таганович А. Д.¹, Ковганко Н. Н.¹, Прохорова В. И.², Готько О. В.²,
Державец Л. А.², Мурашко Д. И.¹

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение
«РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Цель исследования заключалась в разработке статистического метода анализа клеточного состава и белков крови пациентов с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ) для определения риска опухолевой прогрессии на дооперационном этапе.

Материалом для исследования служила кровь и сыворотка крови пациентов с первично диагностированным НМКРЛ. Исследование лабораторных показателей крови проведено у 65 пациентов (47 мужчин и 18 женщин), у которых впервые диагностирован НМКРЛ I или II стадии. Средний возраст пациентов составил $57 \pm 21,3$ лет. Стадия I была диагностирована у 38 (26 мужчин и 12 женщин). По результатам гистологического исследования высокодифференцированная опухоль (G1) была у 13, средней степени дифференцировки (G2) — у 11 и низкодифференцированная (G3) — у 13 человек. У 27 пациентов (21 мужчина и 6 женщин) была II стадия заболевания. По степени злокачественности опухоли G1 была у 9, G2 — у 10 и G3 — у 8 человек. В образцах крови определяли концентрацию лейкоцитов, рецепторы CXCR1, CXCR2, CD44v6; в сыворотке крови — уровень CYFRA 21-1, альбумина и С-реактивного белка.

Создано регрессионное уравнение, которое включало концентрацию CYFRA 21-1, альбумина, С-реактивного белка в сыворотке крови и рецепторов CXCR1 в гранулоцитах, CXCR2 в лимфоцитах, CD44v6 в моноцитах, отношение лимфоциты/моноциты в крови пациентов с НМКРЛ. На основании графической статистики Каплана — Майера показано, что расчетные величины уравнения соответствуют длительности безрецидивного периода по данным наблюдения за пациентами в первый год после проведенного лечения. Диагностическая чувствительность прогнозирования риска опухолевой прогрессии в экзаменационной группе составила 83,9 %, диагностическая специфичность — 88,2 %, диагностическая эффективность — 86,2 %.

Таким образом, разработанный метод позволяет объективизировать предсказание риска опухолевой прогрессии у пациентов на ранних стадиях НМКРЛ.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, прогноз, прогрессирующее, кровь, клетки, белки.

Введение. Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) остается смертельно опасным заболеванием с плохим прогнозом. Выживаемость на его ранних стадиях существенно отличается. У пациентов с I стадией НМКРЛ 5-летняя выживаемость составляет 60–70 %, а при II стадии она уже снижается до 35–40 % [1]. Одной из причин высокой смертности практически всегда является прогрессирующее раковое заболевание, которое обусловлено наличием скрытых метастазов, несмотря на постановку диагноза в ранней стадии.



Развитие рецидива заболевания можно замедлить или предотвратить выбором оптимальной схемы лечения НМКРЛ. В нее может входить только хирургическое удаление опухоли при низком риске развития рецидива заболевания или дополнительное использование неоадьювантной и адьювантной полихимиотерапии при высоком риске рецидива. В связи с этим актуальной является задача по разработке прогностических показателей, которые бы позволяли предсказывать прогрессирование заболевания у пациентов на ранних стадиях развития опухоли с тем, чтобы правильно построить стратегию и тактику их лечения.

Наименее инвазивным и наиболее доступным материалом для поиска таких биомаркеров является кровь. С развитием технологий протеомики в качестве диагностических и прогностических показателей злокачественного роста, в том числе у пациентов с НМКРЛ, предлагались различные белки, циркулирующие в кровотоке [2]. Они являлись или компонентами опухолевых клеток, или участниками звеньев молекулярных событий развития опухолевой ткани. К ним, в частности, относятся ставшие уже классическими CYFRA 21-1 (фрагмент 19 цитокератина), SCC (антиген плоскоклеточного рака), СЕА (раковый эмбриональный антиген). Позже было показано, что СЕА и CYFRA 21-1, помимо диагностического, имеют прогностическое значение при НМКРЛ [3]. Однако результаты определения в сыворотке крови уровня каждого из них в отдельности не смогли продемонстрировать необходимых для специфичности и чувствительности [4]. Поэтому по итогам ряда исследований появились сообщения о попытках создать мультианалитические панели из этих и некоторых других показателей метаболизма в опухолевой ткани в надежде повысить диагностическую и прогностическую эффективность их использования при раке легкого. Тем не менее, до настоящего времени проблема не решена и попытки предсказания длительности безрецидивного периода при I–II стадиях НМКРЛ до начала лечения носят большей частью субъективный характер.

Обязательным компонентом молекулярных событий, сопутствующих развитию рака, является воспаление. Цитокины CXCL5 и CXCL8, известный также как интерлейкин-8 (ИЛ-8), являются провоспалительными хемокинами. Взаимодействуя со своими рецепторами (CXCR1 и CXCR2) на поверхности клеток, они вызывают направленное перемещение и дегрануляцию нейтрофильных лейкоцитов в микроокружении опухоли, способствуя ангиогенезу и метастазированию. Результаты ранее проведенных нами исследований позволили продемонстрировать изменение уровня этих белков в крови пациентов с НМКРЛ. Установлена их связь с характеристиками опухолевого процесса, рассчитана диагностическая эффективность их определения при этом заболевании, которая в ряде случаев превысила таковую для классических биомаркеров (CYFRA21-1, SCC, ТРА) [6].

Внимание исследователей также все более привлекают системные воспалительные маркеры, к которым относятся лимфоциты, нейтрофилы, тромбоциты, С-реактивный белок (С-РБ) и альбумин, а также соотношение нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов, тромбоцитов и лимфоцитов, уровня С-РБ и альбумина, тромбоцитов и альбумина в качестве диагностических и прогностических маркеров при злокачественных новообразованиях [7]. Интерес к подобным показателям понятен, поскольку количественная и полуколичественная оценка клеток крови — рутинный и относительно недорогой тест, который, как правило, проводится для каждого поступающего в стационар. Использовать его результаты для прогноза выживаемости вообще, в том числе безрецидивной выживаемости, представляется весьма актуальным.

Ранее нами уже были проведены исследования по определению риска прогрессирования опухолевого процесса у пациентов с ранними стадиями НМКРЛ и получена прогностическая модель в виде регрессионного уравнения (рисунок 1) [7].

Цель работы — разработка статистического метода анализа клеточного состава и белков крови пациентов с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ) для определения риска опухолевой прогрессии на дооперационном этапе и проведение проверки соответствия результатов предложенного регрессионного уравнения стратифицирующей способности предсказывать длительность безрецидивного периода в экзаменационной выборке.

Материалы и методы. Исследование лабораторных показателей крови для построения прогностической модели (основная группа) проводили у 103 пациентов (72 мужчины и 31 женщина), у которых впервые диагностирован НМКРЛ I или II стадии и проходивших лечение в стационаре ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в период 2019–2020 гг. При формировании экзаменационной выборки исследование лабораторных показателей крови проводили у 65 пациентов (47 мужчин и 18 женщин), у которых впервые диагностирован НМКРЛ I или II стадии (таблица 1). Средний возраст пациентов составил $57 \pm 21,3$ лет.

Таблица 1 — Сравнительная характеристика обследованных пациентов

Показатель	Основная группа	Экзменационная группа
Всего пациентов	103	65
В том числе:		
мужчин (%)	72 (69,9)	47 (72,3)
женщин (%)	31 (30,1)	18 (27,7)
Стадия I (%)	62 (60,2)	38 (58,4)
G1	20 (32,3)	13 (34,2)
G2	23 (37,1)	12 (31,6)
G3	19 (30,6)	13 (34,2)
Стадия II (%)	41 (39,8)	27 (41,5)
G1	14 (34,1)	9 (33,3)
G2	15 (36,6)	10 (37,0)
G3	12 (29,3)	8 (29,7)

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Кровь из локтевой вены забирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-К2. Анализ клеточного состава крови выполнен на геманализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Group, Япония). Для получения сыворотки кровь забирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем. Определение концентрации С-реактивного белка и концентрации альбумина в сыворотке крови проводили на биохимическом анализаторе AU680 (Beckman Coulter, США) с использованием оригинальных наборов реагентов.

Концентрацию рецепторов CXCR1, CXCR2 и CD44v6 в клетках лейкоцитарного ряда и плотность их расположения в мембране клетки определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США). В пробирку помещали 100 мкл крови, стабилизированной ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта, и смеси растворов соответствующих антител (по 5 мкл), содержащих флуоресцентные метки: CD44v6-FITC (Invitrogen, США), CD181(CXCR1)-PE-Cy5 (BioLegend, США), CD182(CXCR2)-PE (BioLegend, США) и CD45-Pacific Orange (Exbio, Чехия). Через 15 мин инкубации в темноте с антителами, содержащими флуоресцентную метку, к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, Франция). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью фиксирующего раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, Франция).

Результаты и их обсуждение. При проверке модели на работоспособность использовалась экзаменационная выборка, включавшая 65 пациентов (см. таблицу 1). Распределение пациентов по распространенности опухолевого процесса, степени злокачественности, полу и возрасту в основной и экзаменационной группах было сопоставимо.

Оценку риска развития прогрессирования у пациентов экзаменационной выборки проводили с использованием разработанного уравнения логистической регрессии для предсказания развития опухолевой прогрессии у пациентов с ранними НМРЛ [7]:

$$Y = \frac{\exp(-1,247 + 0,097 \cdot X_1 + 0,014 \cdot X_2 + 0,011 \cdot X_3 + 0,004 \cdot X_4 + 5,317 \cdot X_5 - 0,311 \cdot X_6)}{1 + \exp(-1,247 + 0,097 \cdot X_1 + 0,014 \cdot X_2 + 0,011 \cdot X_3 + 0,004 \cdot X_4 + 5,317 \cdot X_5 - 0,311 \cdot X_6)},$$

где X_1 — результат определения концентрации антигена CYFRA 21-1 в сыворотке крови; X_2 — интенсивность флуоресценции рецептора CXCR1 в гранулоцитах; X_3 — относительное количество (%) рецептора CXCR2 в лимфоцитах; X_4 — относительное количество рецептора CD44v6 в моноцитах; X_5 — результат определения отношения С-РБ/альбумин в крови; X_6 — результат определения отношения лимфоциты/моноциты в крови; Y — результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X_1 – X_6 — коэффициенты логистической регрессии; \exp — основание натурального логарифма, равно $\approx 2,718$; $-1,247$ — константа логистического уравнения.

Результаты определения его значения для прогнозирования риска опухолевой прогрессии характеризуются следующими величинами: пороговое значение — 0,507, диагностическая чувствительность — 87,0 %, диагностическая специфичность — 91,2 %, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата — 88,9 % и 89,7 % соответственно, диагностическая эффективность — 89,3 %.

В экзаменационной группе у 31 пациента наблюдалось прогрессирующее опухолевое процесс в течение первого года наблюдения. У остальных 34 пациентов экзаменационной выборки в указанный период отсутствовал рецидив заболевания. Пороговое значение логистической регрессии составило 0,507. Выживаемость пациентов с НМКРЛ иллюстрирует график Каплана – Майера (рисунок 1).

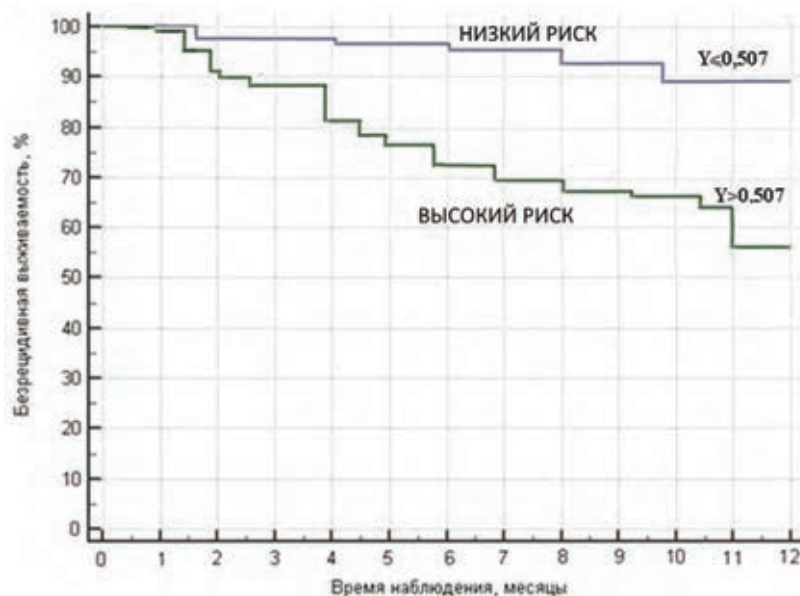


Рисунок 1 — График Каплана – Майера однолетней безрецидивной выживаемости пациентов с ранними стадиями НМКРЛ в зависимости от значений результата регрессионного уравнения Y

Результат уравнения $Y < 0,507$ был у 35 пациентов с НМКРЛ. Из них у 30 прогрессирующего заболевания в течение первого года после проведенного лечения не наблюдалось, т. е. прогностическая ценность отрицательного результата составила 85,7 % (таблица 2). Среди пациентов с результатом $Y > 0,507$ (30 человек) прогрессирующее в течение первого года после проведенного лечения было у 26 человек, т. е. прогностическая ценность положительного результата составила 86,7 %.

На основании результатов расчета регрессионного уравнения, 30 пациентов из 34 (88,2 %) правильно отнесены к группе низкого риска возникновения прогрессирующего. В 26 из 31 случая пациенты экзаменационной группы были правильно отнесены к высокому риску прогрессирующего опухолевого процесса. Тем самым диагностическая чувствительность прогнозирования риска опухолевой прогрессии в экзаменационной группе составила 83,9 %, а диагностическая специфичность — 88,2 %. Общий процент правильно классифицированных случаев на основании результатов уравнения логистической регрессии составил 86,2 %, т. е. для 56 пациентов из группы численностью 65 человек был правильно составлен прогноз.

Таблица 2 — Классификационная таблица проверки логистической регрессионной модели Y_1 на экзаменационной выборке пациентов с НМКРЛ

Группа		Предсказано		ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	ДЭ
		Низкий риск	Высокий риск					
Реально	Низкий риск ($n = 34$)	30	4	83,9	88,2	88,9	85,7	86,2
	Высокий риск ($n = 31$)	5	26					

Заключение. Суммируя результаты проведенного исследования, можно прийти к заключению о том, что риск прогрессирующего НМКРЛ можно предсказывать у пациентов на ранних стадиях заболевания, используя результаты измерения рутинных показателей крови и биомаркеров белковой природы. Экзаменационная выборка позволила установить совпадение реальных результатов с предсказанными на основе пограничного значения $Y = 0,507$ регрессионного уравнения с диагностической эффективностью 86,2 %. То есть, логистическая модель устойчиво работает и соответствует сво-

ими результатами длительности безрецидивной выживаемости пациентов после проведенного лечения. Это обосновывает целесообразность их использования у пациентов при выборе тактики проводимого лечения. В последующих исследованиях целесообразна дальнейшая верификация созданной математической модели на этапах лечения пациентов, чтобы не только прогнозировать развитие опухоли, заболевания в целом, но и оценивать эффективность проводимой терапии.

Литература

1. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Non-Small Cell Lung Cancer Clinical practice guidelines. Version 4. 2017. — Mode of access: http://www.nccn.org/physician_gls/pdf/nscl.pdf. — Date of access: 17.06.2021.
2. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer / M. Katsunari [et al.] // *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* — 2007. — Vol. 3, № 3. — P. 435–439.
3. Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer / T. N. Zamay [et al.] // *Cancers (Basel)*. — 2017. — Vol. 9, № 11. — P. 155.
4. The epidemiology of lung cancer / P. M. de Groot [et al.] // *Trans. Lung. Cancer. Res.* — 2018. — Vol. 7, № 3. — P. 220–233.
5. Greten, F. R. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences / F. R. Greten, S. I. Grivennikov // *Immunity*. — 2019. — Vol. 51, № 1. — P. 27–41.
6. Обоснование комплексного определения уровня CYFRA 21-1 и рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44V6 в крови пациентов с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого для прогнозирования риска опухолевой прогрессии / А. Д. Таганович [и др.] // *Изв. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. Мед. наук.* — 2021 (в печати).
7. Прогнозирование риска опухолевой прогрессии в дотерапевтическом периоде на ранних стадиях немелкоклеточного рака легкого путем анализа концентрации клеток и белков крови / А. Д. Таганович [и др.] // *Здравоохранение.* — 2021 (в печати).

Predicting preoperative cancer progression in early-stage non-small cell lung cancer

*Taganovich A. D.¹, Kauhanka N. N.¹, Prokhorova V. I.², Gotko O. V.²,
Derzhavets L. A.², Murashko D. I.¹*

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

² State Institution «N.N. Alexandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology», Minsk, Republic of Belarus

Objective: to confirm the possibility of using the analysis of the cellular composition and blood proteins of patients with early stages of non-small cell lung cancer (NSCLC) to determine the risk of tumor progression at the preoperative stage.

The material for the study was the blood and serum of patients with initially diagnosed NSCLC. The study of laboratory blood parameters was carried out in 65 patients (47 men and 18 women), who were first diagnosed with stage I or II NSCLC. The average age of the patients was 57 ± 21.3 years. Stage I was diagnosed in 38 (26 men and 12 women). According to the results of histological examination, a highly differentiated tumor (G1) was in 13, an average degree of differentiation (G2) — 11 and a poorly differentiated (G3) — in 13 cases. Stage II was diagnosed in 27 patients (21 men and 6 women). Of these, according to the tumor grade, G1 was in 9, G2 — in 10, and G3 — in 8 cases.

A regression equation was created that included the concentration of CYFRA 21-1, albumin, C-reactive protein in the blood serum and receptors CXCR1 in granulocytes, CXCR2 in lymphocytes, CD44v6 in monocytes, the ratio of lymphocytes / monocytes in the blood of patients with NSCLC. Based on the graphical statistics of Kaplan—Meier, it is shown that the calculated values of the equation correspond to the duration of the relapse-free period according to the observation of patients in the first year after the treatment. The



diagnostic sensitivity of predicting the risk of tumor progression in the examination group was 83.9 %, the diagnostic specificity was 88.2 %, and the diagnostic efficiency was 86.2 %.

The developed method makes it possible to objectify the prediction of the risk of tumor progression in patients with early stages of NSCLC.

Keywords: non-small cell lung cancer, prognosis, progression, blood cells, albumin, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, CD44v6, C-reactive protein.

Поступила 22.07.2021