

*А.М. Герасименко, С.А. Постоялко*  
**ДИАГНОСТИКА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО  
НА ОСНОВЕ ХЕМОКИНА CXCL5 И ЕГО РЕЦЕПТОРА CXCR2**

*Научный руководитель: канд. хим. наук, доц. Н.Н. Ковганко*

*Кафедра биологической химии*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*A.M. Gerasimenko, S.A. Postoyalko*  
**DIAGNOSTICS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER BASED  
ON CHEMOKINE CXCL5 AND ITS RECEPTOR CXCR2**

*Tutor: associate professor N.N. Kauhanka*

*Department of biological chemistry*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Изыскание новых биомаркеров немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) на основе определения концентрации хемокинов CXCL5 и CXCL8 в сыворотке крови, содержания и плотности их рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках крови пациентов с НМРЛ, гамартомой легкого и здоровых людей.

**Ключевые слова:** хемокин, рецептор, CXCL5, CXCR2, немелкоклеточный рак легкого, гранулоциты, моноциты, лимфоциты.

**Resume.** The search for new biomarkers of non-small cell lung cancer (NSCLC) based on the determination of the serum chemokines CXCL5 and CXCL8, their receptors CXCR1 and CXCR2 in the blood cells of patients with NSCLC, lung hamartoma and healthy people.

**Keywords:** chemokine, receptor, CXCL5, CXCR2, non-small cell lung cancer, granulocytes, monocytes, lymphocytes.

**Актуальность.** Рак легкого является основной причиной смертности вследствие злокачественных новообразований как у мужчин, так и у женщин. В их структуре 85-90% принадлежит немелкоклеточному раку (НМРЛ), который характеризуется плохим прогнозом. Опухоль имеет эпителиальное происхождение, наиболее частыми гистологическими подтипами ее являются аденокарцинома (40% всех форм рака легких), плоскоклеточная карцинома (25-30%) и крупноклеточная карцинома (10-15%) [1]. К важнейшим составляющим процесса формирования НМРЛ относятся проращение опухолевой стромы сосудами и инфильтрация клетками: макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, естественными или натуральными киллерами и нейтрофильными лейкоцитами. Развитие сосудистой сети и инфильтрация растущей опухоли связаны с продукцией хемокинов [2]. Эти функции опосредованы связыванием хемокина со своим рецептором на поверхности клеток. В результате изменяется пространственная структура рецептора и разворачивается путь проведения сигнала внутри клетки, который завершается метаболическим эффектом. Многочисленные исследования материала опухолевой биопсии у человека и на экспериментальных моделях продемонстрировали присущий каждому типу опухоли свой, особенный хемокин-рецепторный профиль, а также связь молекулярных событий роста, развития и метастатической способности опухоли с уровнем экспрессии этих хемокинов и их рецепторов [3].

CXCL5, известный также как нейтрофил-активирующий пептид (ENA-78), мобилизует в зону иммунной реакции Т и В лимфоциты, эозинофилы, а также мезотелиальные клетки, фибробласты. Рецептор для CXCL5 в мембране клеток носит название CXCR2. У пациентов с НМРЛ продемонстрировано хемотактическое действие CXCL5 на сосудистый эндотелий в качестве ангиогенного фактора [4].

Повышенная экспрессия CXCL5 описана для большого количества самых разных опухолей, включая НМРЛ [5]. При раке желудка отмечена связь усиленной экспрессии гена CXCL5 с ранними стадиями заболевания. Сообщается о взаимосвязи усиленной экспрессии этого хемокина со степенью злокачественности и воспалительной инфильтрации опухоли, ее метастатическим потенциалом [5].

Сведения об изменении концентрации CXCL5 в периферической крови при злокачественных новообразованиях весьма немногочисленны. Вместе с тем, определение уровня CXCL5 в сыворотке крови помогает в оценке прогноза развития метастазов при раке желудка. Причем, точность предсказания их формирования превышает таковую при использовании эмбрионального антигена с этой целью. Измерение с этой целью комплекса показателей в сыворотке крови (CXCL5, эмбрионального антигена, матриксного фактора 1) позволило повысить эффективность прогноза метастазирования при раке желудка с диагностической специфичностью 92,8% и чувствительностью 75%.

Экспрессию клетками опухоли рецептора к этому лиганду – CXCR2 рассматривают как неблагоприятный прогностический фактор в качестве плохого прогностического фактора при аденокарциноме легкого. При этом, в модельных исследованиях наблюдали уменьшение интенсивности опухолевого роста и ангиогенеза в результате снижения образования этих рецепторов. Данные об измерении CXCR2 в крови пациентов с раком легкого (как, впрочем, и с другими новообразованиями), в доступной литературе нам не встретились.

**Цель:** поиск биомаркеров НМРЛ в периферической крови пациентов на основе измерения концентрации клеток, снабженных рецепторами CXCR2, оценки плотности их расположения на этих клетках, а также определения концентрации лиганда для этого рецептора – хемокина CXCL5.

**Материал и методы.** Обследовано 110 пациентов (84 мужчины и 26 женщин) при поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, у которых впервые диагностирован НМРЛ. В качестве группы сравнения обследованы 30 человек без проявлений заболеваний по результатам клинического, инструментального и клинико-лабораторного исследования, в возрасте 43 - 67 лет. Дополнительная группа сравнения включала 13 пациентов (8 мужчин и 5 женщин) с доброкачественной опухолью легкого - гамартомой. Средний возраст их составлял 57±9 лет. Определение концентрации антигена Cyfra 21-1 (фрагмента цитокератина-19) в сыворотке крови проводили на анализаторе Cobas e411 (Rosche Diagnostics, США). Определение концентрации хемокина CXCL5 в сыворотке крови пациентов с НМРЛ и здоровых людей проводилось с помощью ИФА-наборов Fine Test (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия). Определение рецепторного аппарата клеток крови осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критериям Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, а также путем построения гистограмм распределения. Поскольку количественные значения показателей не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием пакетов статистического анализа данных IBM SPSS Statistics (IBM, США) и MedCalc («MedCalc Software», Бельгия). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25% - 75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни. О взаимосвязи между показателями судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.

**Результаты и их обсуждение.** Уровень большинства определяемых показателей у пациентов с НМРЛ существенно превышал таковой у здоровых людей (таблица 1). Для CYFRA 21-1 он был, практически, в 2 раза выше контрольного, а для концентрации в сыворотке крови CXCL5 приблизительно, в 3 раза. В такой же степени при НМРЛ выросла доля лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR2. Имело место существенное увеличение интенсивности флюоресценции комплексов антител с рецептором CXCR2 на клетках крови всех исследуемых типов: лимфоцитах, моноцитах и гранулоцитах при НМРЛ, демонстрирующей увеличение плотности соответствующих рецепторов в мембранах этих клеток у пациентов с НМРЛ.

**Табл. 1.** Уровень CYFRA 21-1, хемокинов CXCL5,8 и рецепторов CXCR1,2 в крови пациентов с НМРЛ и гамартомой легкого

| Показатель/Indicator              | Контроль/Control              | НМРЛ/NSCLC                     | P                |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------|
| CYFRA 21-1, г/л, $\times 10^{-6}$ | 1,59 [1,30; 2,06]<br>n=24     | 3,31 [2,21; 5,94]<br>n=82      | <b>&lt;0,001</b> |
| CXCL5, г/л, $\times 10^{-9}$      | 75,30 [57,50; 90,40]<br>n=9   | 227,05 [97,10; 447,30]<br>n=42 | <b>0,004</b>     |
| CXCR2 лимфоциты, %                | 9,50 [6,60; 12,90]<br>n=21    | 21,25 [15,15; 28,40]<br>n=99   | <b>&lt;0,001</b> |
| MFI CXCR2 лимфоциты               | 12,20 [7,20; 14,20]<br>n=21   | 14,30 [11,65; 19,05]<br>n=99   | <b>0,004</b>     |
| CXCR2 моноциты, %                 | 94,20 [93,50; 95,70]<br>n=21  | 97,45 [84,05; 98,20]<br>n=99   | 0,142            |
| MFI CXCR2 моноциты                | 13,40 [12,30; 17,10]<br>n=21  | 20,65 [15,75; 22,50]<br>n=99   | <b>&lt;0,001</b> |
| CXCR2 гранулоциты, %              | 93,30 [91,10; 95,30]<br>n=21  | 95,10 [91,15; 96,90]<br>n=99   | 0,267            |
| MFI CXCR2 гранулоциты             | 92,90 [79,30; 100,50]<br>n=21 | 107,15 [87,60; 120,90]<br>n=99 | <b>0,011</b>     |

*Примечание: CXCR 2 лимфоциты, моноциты, гранулоциты, % - доля соответствующих клеток среди клеток того же типа, несущих на своей поверхности рецептор; MFI – интенсивность флюоресценции комплексов антитело/рецептор, пропорциональная количеству рецепторов на одной соответствующей клетке. P – достоверность разницы уровня определяемого показателя у пациентов с НМРЛ по сравнению со здоровыми людьми; в столбцах с значениями P жирный шрифт обозначает наличие статистической достоверности отличий.*

Изменения уровня CYFRA 21-1 и хемокина CXCL5 в сыворотке крови при НМРЛ демонстрируют связь умеренной силы со стадиями процесса, что следует из оценки величин коэффициентов корреляции (таблица 2). Во-первых, они были более высокими по сравнению с таковыми в «контроле» как в относительно ранний период развития опухоли (I, II стадии), так и в поздний период (III, IV стадии).

**Табл. 2.** Уровень CYFRA 21-1, хемокинов CXCL5,8 и рецепторов CXCR1,2 в крови пациентов с НМРЛ, связь со стадиями заболевания

| Показатель                           | I-II стадии/<br>I-II stages    | III-IV стадии/<br>III-IV stages    | P 1          | P 2              | P 3              | R            |
|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------|------------------|------------------|--------------|
| CYFRA 21-1, г/л,<br>$\times 10^{-6}$ | 3,02 [1,82; 4,11]<br>n=47      | 5,08 [2,30; 10,46]<br>n=35         | <b>0,003</b> | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> | <b>0,558</b> |
| CXCL5, г/л, $\times 10^{-9}$         | 175,90 [96,50; 315,30]<br>n=23 | 238,20 [128,30;<br>463,30]<br>n=19 | <b>0,009</b> | <b>0,007</b>     | <b>0,014</b>     | <b>0,623</b> |
| CXCR2 лимфоциты,<br>%                | 11,75 [10,10; 21,15]<br>n=48   | 22,95 [18,15; 30,85]<br>n=51       | <b>0,002</b> | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> | <b>0,645</b> |
| MFI CXCR2<br>лимфоциты               | 13,25 [11,85; 19,65]<br>n=48   | 16,15 [10,75; 18,00]<br>n=51       | <b>0,004</b> | <b>0,003</b>     | <b>0,036</b>     | <b>0,621</b> |
| CXCR2 моноциты,<br>%                 | 95,70 [87,95; 98,20]<br>n=48   | 97,95 [81,05; 98,15]<br>n=51       | 0,496        | 0,092            | 0,372            | -            |
| MFI CXCR2<br>моноциты                | 15,75 [14,45; 21,70]<br>n=48   | 21,35 [16,55; 22,70]<br>n=51       | <b>0,004</b> | <b>0,002</b>     | <b>&lt;0,001</b> | <b>0,629</b> |
| CXCR2<br>гранулоциты, %              | 94,95 [89,95; 96,55]<br>n=48   | 95,65 [91,50; 97,15]<br>n=51       | 0,216        | 0,568            | 0,168            | -            |
| MFI CXCR2<br>гранулоциты             | 99,35 [88,20; 146,25]<br>n=48  | 112,20 [86,30; 107,85]<br>n=51     | <b>0,010</b> | <b>0,003</b>     | <b>0,008</b>     | <b>0,442</b> |

*Примечание: P 1 – достоверность разницы уровня определяемого показателя у пациентов I-II по сравнению с III-IV стадиями НМРЛ; P 2 - достоверность разницы уровня определяемого показателя у пациентов с I-II стадиями НМРЛ по сравнению с контрольной группой; P 3 - достоверность разницы уровня определяемого показателя у пациентов с III-IV стадиями НМРЛ по сравнению с группой сравнения. R – коэффициент корреляции (Спирмена).*

Во-вторых, имеется статистически достоверная разница значений этих же показателей между I+II и III+IV стадиями. Причем для CXCL5 коэффициент корреляции со стадиями выше (0,623), чем для CYFRA 21-1 (0,558). Уровень показателей клеток крови, в которых измерялась интенсивность флюоресценции комплексов антител с CXCR2, существенно отличается на разных стадиях НМРЛ. При III-IV стадиях она значительно выше, чем при I-II стадиях для лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов. Коэффициенты корреляции со стадиями заболевания для хемокина CXCL5 со своим рецептором за исключением интенсивности флюоресценции комплекса антитело/CXCR2 в гранулоцитах был больше, чем в случае CYFRA 21-1 (таблица 2).

**Выводы:** результаты анализа данных, полученных в ходе исследования, показали, что уровень большинства компонентов системы CXCL5/CXCR2 в периферической крови пациентов с НМРЛ значительно превышает их уровень у

здоровых людей. Это свидетельствует об источнике этих изменений, которым являются молекулярные события злокачественного роста опухоли. Со стадиями заболевания наиболее тесную связь имеют уровень CXCL5, количество лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR2 и плотность рецепторов CXCR2 на лимфоцитах и моноцитах.

### **Литература**

1. Role of Chemokines in Non-Small Cell Lung Cancer: Angiogenesis and Inflammation / S. Rivas-Fuentes [et al] //J. Cancer. – 2015 – Vol. 6, № 10 – P. 938–952.
2. Immunotherapy in non-small-cell lung cancer: A bridge between research and clinical practice / P. Francesco [et al] //Future Oncology. – 2018 – Vol. 14, № 13 – P. 41-60.
3. Marcuzzi E., Angioni R., Molon B., Cali B. Chemokines and chemokine receptors: orchestrating tumor metastaziation //Int. J. Mol. Sci. – 2019- Vol.20, № 96 – P. 27-36.
4. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma / S.L. Zhou [et al] //Hepatology – 2012 – Vol. 56, № 6 – P. 2242–2254.
5. Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and interleukin8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer/ M. Pold [et al] //Cancer Res. – 2004 – Vol. 64, №5 – P. 1853–1860.