

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РЕЦИДИВА ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА
ЛЕГКОГО НА ОСНОВАНИИ ДИНАМИКИ УРОВНЯ CXCR2 В
ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ**

Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Галуза А.А.

Таганович А.Д.

*Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
ataganovich@gmail.com*

Ковганко Н.Н.

*Кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
KauhankaMM@bsmi.by*

Галуза А.А.

*Студент педиатрического факультета УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь
artemgaluza3@gmail.com*

Представлены результаты исследования, посвящённого оценке возможности использования изменений уровня рецептора CXCR2 в клетках периферической крови для предсказания послеоперационного рецидива у больных плоскоклеточным раком лёгкого I–II стадии. Обследовано 32 пациента. Концентрацию CXCR2 определяли до лечения, а также через 3 недели, 3 и 6 месяцев после хирургического вмешательства. Установлено, что при развитии рецидива наблюдается нарастание уровня CXCR2 на лимфоцитах в первые полгода после операции. У пациентов без возврата заболевания данный показатель после лечения снижался до нормальных значений и оставался стабильным. Диагностическая эффективность метода варьирует от 68 до 86 % в зависимости от сроков забора крови. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования динамики CXCR2 для контроля эффективности лечения.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак лёгкого; рецидив заболевания; биомаркер; CXCR2; лимфоциты; кровь; ROC-анализ

PREDICTION OF SQUAMOUS CELL LUNG CANCER RECURRENCE BASED ON DYNAMICS OF CXCR2 LEVEL ON BLOOD LYMPHOCYTES

Tahanovich A.D.

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Biological Chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
ataganovich@gmail.com*

Kauhanka M.M.

*PhD (Chemistry), Associate Professor, Head of the Department of General Chemis-
try, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
KauhankaMM@bsmu.by*

Galuzza A.A.

*student, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
artemgaluzza3@gmail.com*

The article presents the results of a study evaluating the feasibility of using changes in the CXCR2 receptor level in peripheral blood cells to predict postoperative relapse in patients with stage I–II squamous cell lung carcinoma. A total of 32 patients were examined. CXCR2 levels were measured before treatment, as well as at 3 weeks, 3 months and 6 months after surgery. It was found that in relapsing patients, CXCR2 expression on lymphocytes increased during the first six months after surgery. In relapse-free patients, this parameter decreased to normal values after treatment and remained stable. The diagnostic efficiency of the method ranges from 68 % to 86 % depending on the timing of blood sampling. The obtained data indicate the promise of using CXCR2 dynamics for treatment efficacy monitoring.

Key words: *squamous cell lung cancer; disease recurrence; biomarker; CXCR2; lymphocytes; blood; ROC-analysis*

Рак лёгкого на протяжении последних десятилетий остаётся одной из ведущих причин смертности от злокачественных новообразований в мире [1-3]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируется более 2,2 миллиона новых случаев этого заболевания, а число летальных исходов превышает 1,8 миллиона в год. Несмотря на определённые успехи в ранней диагностике и развитии хирургических методов лечения, прогноз при раке лёгкого остаётся неблагоприятным, что обусловлено высокой агрессивностью опухолевого процесса, склонностью к метастазированию и частым выявлением уже на поздних стадиях [4-7].

Гистологическая структура рака лёгкого неоднородна [8,9]. Приблизительно 85 % всех случаев приходится на немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ). Внутри этой группы наиболее распространёнными подтипами являются плоскоклеточный рак лёгкого (ПКРЛ), который составляет около 40 % случаев, и аденокарцинома (АК), встречающаяся примерно у 50 % пациентов. ПКРЛ характеризуется тесной связью с курением, преобладанием среди мужчин старших возрастных групп и склонностью к центральному росту с ранней обтурацией

бронхов. Эти особенности делают его клинически значимым объектом для поиска специфических биомаркеров.

Ключевым фактором, определяющим успех лечения пациентов с ПКРЛ, является своевременное выявление первичной опухоли. При I–II стадиях заболевания возможно радикальное хирургическое удаление новообразования, что значительно повышает пятилетнюю выживаемость. Однако даже после полного удаления опухоли и проведённой лимфодиссекции сохраняется риск рецидива. Согласно имеющимся данным, при I стадии частота возврата заболевания в течение первого года после операции может достигать 20 %, а при II стадии — ещё выше. Наиболее вероятной причиной этого является наличие скрытых микрометастазов, которые не выявляются при рутинном дооперационном обследовании, но впоследствии обуславливают рост метастатических очагов.

В связи с этим одной из актуальных задач современной онкологии становится поиск надежных лабораторных маркеров, позволяющих не только оценить эффективность проведённого лечения, но и с достаточной точностью предсказать риск развития рецидива в ранние сроки после операции. Идеальный маркер должен определяться минимально инвазивным способом (например, в образце периферической крови), обладать высокой чувствительностью и специфичностью, а также демонстрировать динамику, опережающую клинические и рентгенологические признаки возврата заболевания.

В последние годы внимание исследователей привлекают хемокиновые рецепторы, участвующие в процессах опухолевой прогрессии, ангиогенеза и метастазирования [10-14]. Одним из таких рецепторов является CXCR2 — мембранный белок, ассоциированный с G-белком, который связывается с несколькими хемокинами, включая CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 и CXCL8. Связывание лиганда с CXCR2 запускает внутриклеточные сигнальные каскады, активирующие митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) и другие пути, что в конечном итоге стимулирует пролиферацию, миграцию и выживаемость опухолевых клеток, а также способствует рекрутированию иммунных клеток в микроокружение новообразования.

Данные об экспрессии CXCR2 при злокачественных новообразованиях лёгкого противоречивы. В ряде исследований показано, что повышение уровня CXCR2 в опухолевой ткани коррелирует с распространённостью процесса, метастазированием в регионарные лимфатические узлы и неблагоприятным прогнозом [10,11]. При этом часть работ была выполнена на смешанных популяциях НМРЛ, без отдельного анализа для ПКРЛ и АК. В других публикациях, напротив, не выявлено статистически значимой связи между экспрессией CXCR2 и клинико-патологическими характеристиками при ПКРЛ, либо отмечено, что высокий уровень CXCR2 ассоциирован с лучшей выживаемостью [12-14]. Кроме того, большинство имеющихся работ выполнено на операционном материале (ткани опухоли) и не касается динамического наблюдения за пациентами после лечения. Сведения об изменении уровня CXCR2 в клетках периферической крови у больных ПКРЛ в процессе послеоперационного наблюдения до настоящего времени отсутствовали.

Таким образом, представленное исследование направлено на восполнение этого пробела. Целью работы явилось изучение возможности использования динамики уровня процентного содержания рецептора CXCR2 на различных субпуляциях клеток крови для предсказания возврата заболевания в течение первого года после проведённого лечения у пациентов с I–II стадиями плоскоклеточного рака лёгкого.

Материалы и методы. Исследование проведено на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова» (п. Лесной, Минский район). Включено 32 пациента с впервые диагностированным ПКРЛ I–II стадии. Из них 21 человек — мужчины, 11 — женщины. Средний возраст обследованных составил $58 \pm 20,5$ года. Распределение по стадиям: I стадия — 11 пациентов (34,4 %), II стадия — 21 пациент (65,6 %). Поражение регионарных лимфатических узлов (N1) выявлено у 21 больного (65,6 %), отсутствие метастазов в лимфоузлах (N0) — у 11 (34,4 %). Распространённость первичной опухоли: T1 — 7 (23,4 %), T2a — 12 (34,8 %), T2b — 10 (28,8 %), T3 — 3 (9,4 %). Степень дифференцировки: высокодифференцированные (G1) — 3 (9,4 %), умеренно дифференцированные (G2) — 19 (59,4 %), низкодифференцированные (G3) — 9 (28,1 %). Локализация опухоли: правое лёгкое — у 11 пациентов (34,4 %), левое — у 21 (65,6 %). Информация о рецидивах получена из базы данных Канцер-регистра Республики Беларусь. Все участники подписали письменное информированное согласие.

Измерение уровня рецептора CXCR2 в клетках крови выполняли до начала лечения, через 3 недели, 3 и 6 месяцев после операции. Использовали проточный цитофлуориметр Perlong 2060 (КНР). Образец крови объёмом 100 мкл инкубировали со смесью антител CD45-APC и CXCR2-PE (суммарно 5 мкл) в течение 15 минут в тёмном помещении, после чего добавляли лизирующий раствор для подготовки образца.

Статистическую обработку проводили с помощью программы «Medcalc» (Medcalc Inc., Бельгия). Диагностическую значимость параметров оценивали методом ROC-анализа с расчётом площади под ROC-кривой (AUC). Пороговое значение определяли как точку оптимального сочетания чувствительности и специфичности. Критический уровень значимости принимали равным 5 %.

Результаты исследования. В ходе работы установлено, что у пациентов с ПКРЛ уровень CXCR2 на моноцитах и гранулоцитах не демонстрировал значимых изменений в зависимости от исхода лечения. Статистически значимая динамика выявлена исключительно на лимфоцитах.

У пациентов, у которых впоследствии развился рецидив заболевания, после операции отмечалось первоначальное снижение уровня CXCR2 на лимфоцитах (однако в большинстве случаев оно не достигало порогового значения, характерного для здоровых лиц), а затем постепенное нарастание этого показателя. У пациентов без возврата болезни уровень CXCR2 на лимфоцитах снижался после лечения и в дальнейшем оставался стабильным, не превышая порога 10,5 %.

Был проведён детальный анализ изменений процентного содержания CXCR2-положительных лимфоцитов в трёх временных интервалах: от 3 недель до 3 месяцев, от 3 до 6 месяцев, а также от 3 недель до 6 месяцев после операции.

Наибольшая разница зарегистрирована при сравнении крайних сроков (3 недели — 6 месяцев) и составила 7,10 % [7,01; 7,68] с достоверными отличиями между всеми соседними временными точками.

Для оценки диагностической ценности вычисленных разностей выполнен ROC-анализ. При сравнении показателей через 3 недели и 3 месяца пороговое значение составило 2,82 %, чувствительность — 66,7 %, специфичность — 68,9 %, общая эффективность — 68,4 %. При сопоставлении данных через 3 и 6 месяцев порог — 4,20 %, чувствительность — 75,0 %, специфичность — 71,1 %, эффективность — 71,9 %. Наибольшая диагностическая эффективность (86,0 %) достигнута при сравнении результатов, полученных через 3 недели и 6 месяцев после операции: порог 7,05 %, чувствительность 83,3 %, специфичность 86,7 %.

Обсуждение. Рецептор CXCR2 относится к семейству семитрансмембранных рецепторов, ассоциированных с G-белком (молекулярная масса около 40 кДа). Его структура включает три внутриклеточные и три внеклеточные петли, а также N-концевой и C-концевой домены. При связывании с лигандами CXCR2 активирует внутриклеточные сигнальные каскады (мобилизация кальция, активация митоген-активируемых протеинкиназ, синтез транскрипционных факторов), что приводит к усилению пролиферации, хемотаксиса и дифференцировки клеток.

В литературе имеются противоречивые сведения об экспрессии CXCR2 при злокачественных новообразованиях. В ряде работ показана повышенная концентрация этого рецептора в опухолевой ткани, коррелирующая с распространённостью процесса и метастазированием. В других исследованиях, напротив, выявлена связь высокой экспрессии CXCR2 с лучшей выживаемостью. При аденокарциноме лёгкого увеличение CXCR2 ассоциировано с низкой дифференцировкой и поражением лимфоузлов, тогда как при ПКРЛ подобной закономерности не обнаружено. До настоящего исследования данные об измерении CXCR2 в крови пациентов с ПКРЛ с прогностической целью отсутствовали.

Наше исследование впервые показывает, что динамика уровня CXCR2 в лимфоцитах периферической крови может служить информативным маркером для выявления послеоперационного рецидива при ПКРЛ ранних стадий. Отличительной особенностью работы является проспективный характер наблюдения с серийным взятием крови в четырёх временных точках, что позволило зафиксировать разнонаправленное поведение маркера в группах с рецидивом и без него. Уже через три месяца после лечения (при сопоставлении результатов через 3 недели и 3 месяца) эффективность предсказания достигает 68 %, что даёт потенциальную возможность для более раннего инструментального обследования пациентов из группы риска.

Заключение. На основании полученных данных сформулированы следующие выводы:

1. Уровень процентного содержания рецептора CXCR2 в лимфоцитах периферической крови может быть использован в качестве дополнительного критерия для выявления послеоперационного рецидива у пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого I–II стадии.

2. Диагностическая эффективность данного метода в зависимости от сроков исследования варьирует от 68 до 86 %, что делает его приемлемым для клинического применения на этапе раннего наблюдения.

Список литературы

1. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases / Z. Chen, C. M. Fillmore, P. S. Hammerman [et al.] // *Nature Reviews Cancer*. – 2014. – Vol. 14, № 8. – P. 535-546. – DOI: 10.1038/nrc3775.
2. Ha H. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases / H. Ha, B. Debnath, N. Neamati // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7, № 6. – P. 1543-1588. – DOI: 10.7150/thno.15625 .
3. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- κ B pathway in colorectal cancer / C. Chen, Z. Xu, Y. Zong [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2019. – Vol. 10, № 3. – P. 178. – DOI: 10.1038/s41419-019-1431-6 .
4. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer / M. W. Nasser, S. K. Raghuvanshi, D. J. Grant [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 183, № 5. – P. 3425-3432. – DOI: 10.4049/jimmunol.0901165 .
5. The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue / O. Oladipo, S. Conlon, A. O'Grady [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 104, № 3. – P. 480-487. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6606055 .
6. Expression characteristic of CXCR1 in different breast tissues and the relevance between its expression and efficacy of neo-adjuvant chemotherapy in breast cancer / M. Q. Xue, H. M. Zhao, Z. H. Xu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 30. – P. 48930-48937. – DOI: 10.18632/oncotarget.16893 .
7. Chu H. C-X-C motif chemokine receptor type 2 correlates with higher disease stages and predicts worse prognosis, and its downregulation enhances chemotherapy sensitivity in triple-negative breast cancer / H. Chu, W. Li, H. Li // *Translational Cancer Research*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 840-848. – DOI: 10.21037/tcr.2019.12.49 .
8. Interleukin-8 promotes cell migration via CXCR1 and CXCR2 in liver cancer / H. Bi, Y. Zhang, W. Wang [et al.] // *Oncology Letters*. – 2019. – Vol. 18, № 4. – P. 4176-4184. – DOI: 10.3892/ol.2019.10855 .
9. CXCR1/2 antagonism with CXCL8/Interleukin-8 analogue CXCL8(3-72) K11R/G31P restricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis / M. N. Khan, B. Wang, J. Wei [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 25. – P. 21315-21327. – DOI: 10.18632/oncotarget.4322 .
10. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma / P. Saintigny, L. A. Massarelli, S. Lin [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, № 2. – P. 571-582. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2362 .
11. Association of chemokine and chemokine receptor expression with the invasion and metastasis of lung carcinoma / Y. Liu, K. Sun, G. Chen [et al.] // *Oncology Letters*. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 1315-1322. – DOI: 10.3892/ol.2015.3448 .
12. Loss of β -arrestin-2 and activation of CXCR2 correlate with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer / L. Cong, Y. Liu, Z. Wang [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8, № 14. – P. 2785-2792. – DOI: 10.7150/jca.19968 .
13. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells / Y. M. Zhu, A. D. Lujambio, Y. T. Y. Lui [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2004. – Vol. 91, № 11. – P. 1970-1976. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6602038 .
14. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target / Y. Zhang, H. Wang, M. Sun [et al.] // *Cancer Communications*. – 2020. – Vol. 40, № 2-3. – P. 69-80. – DOI: 10.1002/cac2.12009.