

©Коллектив авторов

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ CXCR1, CXCR2 И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЁГКОГО

Д.И. Мурашко^{1*}, А.Д. Таганович¹, Н.Н. Ковганко¹, В.И. Прохорова², О.В. Готько²

¹Белорусский государственный медицинский университет,

220116, Республика Беларусь, Минск, просп. Дзержинского, 83; *эл. почта: sherstyanoymurovei@mail.ru

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, 223040, Республика Беларусь, Минский район, аг. Лесной

В структуре заболеваемости раком лёгкого большая часть принадлежит немелкоклеточному раку (НМКРЛ), который подразделяется на два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ). Пятилетняя выживаемость пациентов с I стадией НМКРЛ практически в два раза выше, чем со II стадией, и более чем в пять раз выше в сравнении с III-IV стадиями. В настоящее время нет информативных биомаркеров в крови, позволяющих диагностировать НМКРЛ на ранних стадиях. Целью исследования была оценка комплексного определения в крови пациентов уровня гиалуроновой кислоты (ГК), рецепторов CXCR2 на лимфоцитах и CXCR1 на гранулоцитах в диагностике АК и ПКРЛ. Материалом служила кровь 107 пациентов с ПКРЛ, 90 пациентов с АК и 40 здоровых людей. Концентрацию ГК в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Об уровне CXCR2 и CXCR1 судили по результатам измерения относительного количества клеток лейкоцитарного ряда, снабженных этими рецепторами, и интенсивности флуоресценции комплекса рецептора с соответствующими антителами (MFI) методом проточной цитометрии. Диагностические параметры определяли при помощи построения математических моделей в виде регрессионных уравнений с использованием метода пошагового включения предикторов и последующим ROC-анализом. Результаты исследования свидетельствуют, что MFI CXCR1 в гранулоцитах, доля лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, и концентрация ГК в сыворотке крови при I стадии АК и ПКРЛ значительно выше, чем у здоровых людей. Уровень этих показателей существенно возрастает на II стадии заболевания по сравнению с I и демонстрирует дальнейший рост на поздних его стадиях. На основании полученных результатов созданы следующие регрессионные уравнения: (1) включающее MFI CXCR1 в гранулоцитах, долю лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, и концентрацию ГК в сыворотке крови, которое позволяет выявить I-II стадии ПКРЛ (диагностическая чувствительность — 95,7%, специфичность — 93,7%, пороговое значение — 0,59) и III-IV стадии ПКРЛ (диагностическая чувствительность — 93,1%, специфичность — 93,3%, пороговое значение — 0,64); (2) включающее долю лимфоцитов, снабжённых CXCR2, MFI CXCR1 в гранулоцитах и уровень в крови CYFRA 21-1, которое позволяет выявить I-II стадии АК (чувствительность — 91,3%, специфичность — 94,7%, пороговое значение — 0,61); (3) включающее долю лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, и уровень CYFRA 21-1, которое позволяет выявить III-IV стадии АК (чувствительность — 94,6%, специфичность — 91,3%, пороговое значение — 0,15); (4) включающее долю лимфоцитов, снабжённых CXCR2, и уровень ГК в сыворотке крови, которое позволяет дифференцировать II стадию ПКРЛ с I (чувствительность — 94,4%, специфичность — 87,5%, пороговое значение — 0,44) и II стадию АК с I (чувствительность — 88,5%, специфичность — 91,2%, пороговое значение — 0,46).

Ключевые слова: немелкоклеточный рак лёгкого; CXCR1; CXCR2; гиалуроновая кислота; кровь

DOI: 10.18097/PBMC20216705434

ВВЕДЕНИЕ

Рак лёгкого занимает второе место в структуре онкологической заболеваемости, уступая лишь раку молочной железы. Он является наиболее распространённой причиной летального исхода злокачественных новообразований (1,8 млн. в год). При этом, в 2020 г. в мире выявлено 2,2 млн. новых случаев рака лёгкого [1].

В структуре заболеваемости раком лёгкого большая часть (85%) принадлежит немелкоклеточному раку (НМКРЛ). Основными гистологическими подтипами НМКРЛ является аденокарцинома (АК, 40% случаев НМКРЛ) и плоскоклеточный рак лёгкого (ПКРЛ, 30%) [2].

Первые симптомы НМКРЛ проявляются в поздний период заболевания при значительном поражении лимфатических узлов и внутренних

органов (III-IV стадии заболевания по классификации TNM) [3, 4]. Поэтому диагностика ранних (I-II) стадий НМКРЛ затруднена. ПКРЛ протекает более агрессивно. Пятилетняя выживаемость пациентов с I стадией ПКРЛ составляет 47%, в то время как при АК она равна 79%. На II стадии при обоих гистологических подтипах она снижается более чем на треть [4].

Информативных и специфичных биомаркеров в крови, позволяющих выявить АК или ПКРЛ, не существует. С этой целью нередко измеряют уровень CYFRA 21-1 (фрагмент цитокератина 19) и SCC (антиген плоскоклеточной карциномы) в сыворотке крови. Однако сравнительно низкая диагностическая чувствительность (66,5% и 32,0% соответственно) не позволяет судить с высокой степенью надёжности о наличии или распространённости опухолевого процесса [5].

Инвазивный рост любого злокачественного новообразования сопровождается развитием воспаления в активно растущей опухолевой ткани. Клетки воспалительного микроокружения и стромы опухоли продуцируют большое количество цитокинов, хемокинов и факторов роста, способствующих распространению опухоли. CXCL5 и CXCL8 — провоспалительные хемокины, обладающие ангиогенной активностью. Взаимодействие их с рецепторами CXCR1 (связывается только с CXCL8) и CXCR2 (связывается с обоими упомянутыми хемокинами) опосредует привлечение иммунных клеток в зону воспаления, индуцирует процессы ангиогенеза и метастазирования [6, 7].

Интенсивная пролиферация злокачественных клеток приводит к гипоксии в опухолевой ткани и активации факторов транскрипции, которые, в свою очередь, регулируют экспрессию генов, ответственных за жизнеобеспечение опухоли в этих условиях. HIF-1 α — фактор транскрипции, индуцируемый гипоксией. Он стимулирует экспрессию рецептора CD44v6. Основным лигандом этого рецептора является гиалуроновая кислота (ГК). Взаимодействие ГК с CD44v6 приводит к активации матриксной металлопротеиназы 9, играющей существенную роль в клеточной инвазии [8].

Возможность использования показателей опухолевого метаболизма в качестве потенциальных биомаркеров рака, в том числе, НМКРЛ, является предметом многочисленных научных изысканий [9, 10]. Было обнаружено существенное увеличение уровня CXCR1, CXCR2 и ГК в клетках злокачественных новообразований, в том числе НМКРЛ, по сравнению со здоровыми людьми и установлена его связь со стадиями заболевания и дескрипторами опухоли [11–13]. Однако исследование уровня этих показателей в крови пациентов с НМКРЛ не проводилось.

Перспективным направлением, позволяющим улучшить диагностические характеристики биомаркеров, является использование их комбинации и определение суммарного порогового значения бинарной классификации. Так, комбинированное измерение в сыворотке крови и CYFRA 21-1, и SCC при выявлении НМКРЛ позволяет увеличить диагностическую чувствительность каждого из них на 6–30% [5].

Целью настоящего исследования было установление возможности комплексного использования лабораторных показателей, являющихся патогенетическими звеньями опухолевого роста, в диагностике ПКРЛ и АК, в особенности на ранних стадиях заболевания.

МЕТОДИКА

Обследовано 107 пациентов с ПКРЛ (21 — с I стадией заболевания, 41 — со II стадией, 41 — с III стадией, 4 — с IV стадией в соответствии с классификацией TNM) и 90 пациентов с АК (24 — с I стадией заболевания, 27 — со II стадией, 29 — с III стадией, 10 — с IV стадией) при первом

поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019–2021 гг. В качестве группы контроля обследовано 40 человек без проявлений заболевания в возрасте 43–67 лет.

Кровь из локтевой вены пациентов и здоровых людей собирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-K2 (“Improvacuter”, Китай). Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем (“Improvacuter”).

Определение концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) с помощью наборов реагентов на ИХЛА-анализаторе Cobas e411 (“Roche Diagnostics”, США).

Для измерения уровня гиалуроновой кислоты (ГК) в сыворотке крови пациентов и здоровых людей использовали ИФА-набор “Fine Test” (Китай), автоматический ИФА-анализатор Brio (“Seac”, Италия) и планшетный фотометр Sirio (“Seac”). Измерение оптической плотности стандартных разведений и образцов проводили при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм.

Определение рецепторного аппарата клеток крови проводили методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Navios (“Beckman Coulter”, США). В пробирку помещали 100 мкл крови, стабилизированной ЭДТА-K2, и 10 мкл соответствующих антител, содержащих флуоресцентные метки: CD181(CXCR1)-PE/Cy5 (“BioLegend”, США), CD182(CXCR2)-PE (“BioLegend”), CD45-Pacific Orange (“Exbio”, Чехия). Через 15 мин инкубации в темноте к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (“Beckman Coulter”). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью фиксирующего раствора IQTest 3 (“Beckman Coulter”).

Для всех выборок проверяли гипотезу нормальности распределения по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Поскольку значения показателей не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программных пакетов IBM SPSS Statistics 23 и MedCalc, рассчитывая медиану (Me) и интерквартильный размах (25%–75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни. О взаимосвязи между определяемыми показателями и дескрипторами опухоли судили на основании расчёта коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью характеристических кривых (ROC-анализ). В последующем вычисляли площадь под ROC-кривой (AUC, area under curve), на основании которой оценивали надёжность потенциального биомаркера.

О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании показателей диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и эффективности теста (ДЭ).

СХСR1, СХСR2, ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА В КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЁГКОГО

Пороговое значение диагностического теста определяли при построении ROC-кривых как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности.

Построение диагностических моделей осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии, используя метод пошагового включения предикторов, который ранжирует признаки в соответствии с их вкладом в модель. Относительный вклад отдельных предикторов выражали величиной стандартизованного коэффициента регрессии. Мерой качества приближения регрессионной модели служило отрицательное удвоенное значение логарифма функции правдоподобия ($-2LL$). Согласованность полученной модели (регрессионного уравнения) проверяли, используя тест Хосмера-Лемешев.

Оценку интегральной диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением AUC.

При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов уже на I стадии АК и ПКРЛ увеличена более чем на 20% по сравнению со здоровыми людьми. Уровень этого показателя у пациентов со II стадией также существенно превышает контрольный и

возрастает на 30% по сравнению с I стадией. При III-IV стадии уровень MFI CXCR1 в гранулоцитах ещё более высок и на 15% превосходит таковой при II стадии (табл. 1).

Относительное количество лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, у пациентов с I стадией АК и ПКРЛ увеличено практически вдвое по сравнению со здоровыми людьми. Уровень этого показателя при II стадии на 30% выше, чем при I, и ещё более существенно возрастает у пациентов с III-IV стадиями заболевания (табл. 1).

У пациентов с АК концентрация ГК увеличена в 3 раза по сравнению со здоровыми людьми уже на I стадии (табл. 1). У пациентов со II стадией она на 20% выше, чем на I, и ещё сильнее возрастает в поздний период заболевания (III-IV стадии). Уровень этого показателя у пациентов с I стадией ПКРЛ в 2 раза выше, чем у здоровых людей. Так же, как и при АК, в крови пациентов с ПКРЛ он возрастает на II стадии по сравнению с I более чем на 30%. В поздний период заболевания уровень ГК в крови пациентов с ПКРЛ и АК практически в 4 раза превышает контрольный и значительно увеличен по сравнению с таковым при I и II стадиях.

Концентрация в крови CYFRA 21-1 также увеличена у пациентов с I стадией НМКРЛ по сравнению со здоровыми людьми независимо от гистологического подтипа заболевания. При этом, отсутствует существенная разница по сравнению со II стадией (табл. 1). Для поздних (III-IV) стадий характерен дальнейший её рост.

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

Показатель	Me [25%; 75%]				
	Контроль	ПКРЛ			R
		I стадия	II стадия	III-IV стадии	
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]	0,586
CXCR2, лимфоциты, %	9,5 [6,1; 15,2]	19,2* [17,3; 22,8]	24,9*# [15,1; 25,9]	31,2*## [24,0; 34,4]	0,650
ГК, нг/мл	8,4 [7,2; 17,4]	15,1* [12,5; 19,8]	22,1*# [20,4; 28,2]	31,7*## [29,7; 35,9]	0,577
CYFRA-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]	0,541
	Контроль	АК			R
		I стадия	II стадия	III-IV стадии	
MFI CXCR1, гранулоциты	25,5 [20,1; 49,0]	32,1* [23,7; 32,4]	47,2*# [42,5; 65,7]	56,9*## [49,9; 66,9]	0,698
CXCR2, лимфоциты, %	9,5 [6,1; 15,2]	16,6* [16,4; 16,6]	20,9*# [20,9; 23,6]	32,5*## [24,3; 32,5]	0,656
ГК, нг/мл	8,4 [7,1; 18,0]	22,4* [19,7; 24,7]	26,0*# [23,7; 27,4]	30,2*## [27,0; 32,0]	0,562
CYFRA-21-1, нг/мл	1,5 [1,2; 1,9]	1,9* [1,5; 4,3]	2,6* [2,1; 3,1]	4,8*## [3,1; 7,3]	0,405

Примечание. Здесь и в таблице 2 приведены показатели, которые подверглись наиболее существенным изменениям при АК и ПКРЛ. * — 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. R — коэффициент корреляции Спирмена.

Проведённый корреляционный анализ подтвердил наличие связи средней силы всех упомянутых показателей со стадиями заболевания ($R>0,3$) (табл. 1).

Несмотря на схожие изменения показателей в крови пациентов с различными гистологическими типами НМКРЛ, результаты ROC-анализа свидетельствуют о различной диагностической ценности их определения при АК и ПКРЛ. Уровень MFI CXCR1 в гранулоцитах выше порогового значения выявляют при I-II стадиях ПКРЛ с более высокой чувствительностью (96,6%), чем при АК (74,4%) (табл. 2). Специфичность значений этого показателя, превышающих пороговое, у пациентов с I-II стадиями заболевания, напротив, существенно выше при АК (89,3%), чем при ПКРЛ (57,1%). Высокая чувствительность свидетельствует о низкой вероятности ложноотрицательного результата, в то время как высокая специфичность имеет место при низкой вероятности ложноположительного результата. Поэтому высокая чувствительность считается более ценной в случаях, когда тест направлен на выявление тяжёлых заболеваний [14].

Оценка диагностических характеристик использования этого показателя для дифференцирования I и II стадий ПКРЛ показывает, что среди пациентов

со II стадией превышение соответствующего порогового значения 22,7 имело место в 94,1% случаев (чувствительность). Это больше, чем у пациентов со II стадией АК (88,9%). Поэтому диагностическая эффективность измерения этого показателя при дифференцировании I и II стадий ПКРЛ также выше, чем при АК (табл. 2).

У 68% пациентов с III-IV стадиями ПКРЛ определялось превышение порогового значения MFI CXCR1 в гранулоцитах (47,2), в то время как у 92,9% пациентов, у которых были диагностированы I или II стадии заболевания, медиана MFI CXCR1 была меньше этого порогового уровня. Соответствующие параметры при АК составили 85,7% и 82,1%.

Определение доли лимфоцитов, снабжённых CXCR2, также демонстрирует разную чувствительность и специфичность у пациентов с АК и ПКРЛ. Так, уровень этого показателя больше порогового значения (19,0%) был у 70% пациентов с ранними стадиями ПКРЛ, а вероятность истинно отрицательного результата (доля лимфоцитов, снабжённых CXCR2, ниже порогового значения) составила 94,7%. У 78% пациентов с ранними стадиями АК уровень этого показателя больше порогового значения (16,0%). Вероятность ложноположительного результата

Таблица 2. Результаты ROC-анализа для существенно изменённых показателей при НМКРЛ, коррелятивно связанных со стадиями ПКРЛ и АК

ПКРЛ					
Показатель	I-II ст. / здоровые				
	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
MFI CXCR1, гранулоциты	10,9	96,6	57,1	0,774	80,5
CXCR2, лимфоциты, %	19,0	80,8	95,5	0,837	86,4
ГК, нг/мл	19,1	70,0	94,7	0,883	80,5
CYFRA 21-1, нг/мл	2,8	66,7	96,6	0,856	79,6
I-II ст. / III-IV ст.					
MFI CXCR1, гранулоциты	47,2	68,0	92,9	0,801	82,9
CXCR2, лимфоциты, %	25,9	79,3	96,2	0,853	89,5
ГК, нг/мл	23,2	96,6	73,3	0,792	83,8
CYFRA 21-1, нг/мл	3,7	83,3	66,7	0,786	74,3
I ст. / II ст.					
MFI CXCR1, гранулоциты	22,7	94,1	66,7	0,833	85,2
CXCR2, лимфоциты, %	21,2	88,9	87,5	0,799	86,8
ГК, нг/мл	16,4	90,0	75,0	0,783	81,9
АК					
Показатель	I-II ст. / здоровые				
	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
MFI CXCR1, гранулоциты	29,3	74,4	89,3	0,849	81,7
CXCR2, лимфоциты, %	16,0	78,0	85,7	0,860	81,7
ГК, нг/мл	19,1	88,4	94,7	0,919	89,3
CYFRA 21-1, нг/мл	2,8	62,2	85,7	0,808	73,1
I-II ст. / III-IV ст.					
MFI CXCR1, гранулоциты	47,2	85,7	82,1	0,829	84,0
CXCR2, лимфоциты, %	22,3	88,9	88,1	0,883	88,6
ГК, нг/мл	26,0	77,1	88,4	0,846	84,0
CYFRA 21-1, нг/мл	3,1	76,2	73,0	0,739	73,8
I ст. / II ст.					
MFI CXCR1, гранулоциты	35,8	88,9	85,7	0,862	80,3
CXCR2, лимфоциты, %	16,8	76,5	87,5	0,754	82,3
ГК, нг/мл	25,1	55,0	95,8	0,754	74,5

его оценки на ранних стадиях заболевания существенно выше, чем при ПКРЛ. Специфичность теста для I-II стадий АК составила 85,7%.

68% пациентов с долей лимфоцитов, экспрессирующих СХСR2, которая превышала соответствующее пороговое значение, имеют III-IV стадии ПКРЛ с вероятностью истинно отрицательного результата 92,9%. В случае АК этот показатель демонстрировал более высокую чувствительность (у 88,9% пациентов с поздними стадиями АК относительное количество лимфоцитов, экспрессирующих СХСR2, превышала пороговое значение); однако специфичность теста значительно снижена (88,1%). Расхождения в диагностических параметрах определения относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих СХСR2, была отмечена и при дифференцировании I и II стадий заболевания. Вероятность II стадии ПКРЛ при уровне этого показателя выше соответствующего порогового составляла 88,9%, а при II стадии АК — 76,5%. При этом, у 87,5% пациентов с долей экспрессирующих СХСR2 лимфоцитов, меньшей, чем пороговое значение, была диагностирована I стадия ПКРЛ и АК (табл. 2).

Вероятность истинно положительного результата определения ГК у пациентов с ранними стадиями ПКРЛ (70%) для рассчитанного порогового значения (19,1 нг/мл) несколько ниже диагностической чувствительности измерения этого показателя у пациентов с ранними стадиями АК (78%). При этом, вероятность истинно отрицательного результата или специфичность определения ГК не отличалась при АК и ПКРЛ. Поэтому диагностическая эффективность использования данного показателя при ПКРЛ в целом значительно ниже, чем при АК (80,5% и 89,3% соответственно).

66,7% с ПКРЛ, у которых на момент обследования были диагностированы ранние стадии, уровень этого антигена выше порогового (специфичность составила 85,7% и 96,6% соответственно). Доля пациентов с поздними стадиями ПКРЛ и АК, имеющих концентрацию в крови CYFRA 21-1 более порогового значения была выше при ПКРЛ, чем при АК (чувствительность — 83,3% и 76,2% соответственно). Однако вероятность ложноположительного обнаружения поздних стадий ПКРЛ была более высока (специфичность — 66,7%), чем при АК (специфичность — 73,8%) (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что диагностические параметры определяемых в крови MFI СХСR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, экспрессирующих СХСR2, и концентрации ГК при НМКРЛ лучше, чем у используемых в настоящее время CYFRA 21-1 и SCC [4]. Тем не менее, эффективность их использования для диагностики этого заболевания варьирует от 74,5% до 89,5%. Одним из подходов, позволяющих повысить чувствительность и специфичность маркеров, является комбинированное определение нескольких показателей [15, 16]. Поэтому на основании полученных результатов были созданы регрессионные модели, включающие уровень рецепторов СХСR1, СХСR2, ГК и CYFRA 21-1. Из предполагаемых факторных признаков были выбраны лишь те, которые оказывают существенное влияние на результат уравнения.

Доля лимфоцитов, экспрессирующих СХСR2, уровень ГК в сыворотке крови, а также плотность расположения СХСR1 в гранулоцитах оказались наиболее значимыми факторами, указывающими на наличие у пациента ранних стадий ПКРЛ (формула 1):

$$Y1 = \frac{\exp(-31,4 + 0,29*[ГК] + 1,45*[СХСR2, \text{ лимфоциты, \%}] + 0,09*[MFI \text{ СХСR1, гранулоциты}])}{1 + \exp(-31,4 + 0,29*[ГК] + 1,45*[СХСR2, \text{ лимфоциты, \%}] + 0,09*[MFI \text{ СХСR1, гранулоциты}])} \quad (1),$$

96,6% пациентов с поздними стадиями ПКРЛ имеют уровень ГК в сыворотке крови выше порогового значения 23,2 нг/мл. Вероятность получения истинно отрицательного результата при её концентрации в сыворотке крови меньше пороговой (специфичность) составляла 73,3%. При АК пороговое значение 26 нг/мл позволяет выявить III-IV стадии заболевания с меньшей чувствительностью (77,1%) и большей специфичностью (88,4%). Схожие различия этих диагностических параметров наблюдаются при использовании определения концентрации ГК для дифференцирования I со II стадией заболевания. В частности, вероятность наличия у пациентов II стадии ПКРЛ (90,0%) при превышении порогового значения 16,4 нг/мл существенно выше, чем при АК (55%). Наоборот, специфичность теста значительно выше при АК (95,8%), чем при ПКРЛ (75,0%).

Уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови пациентов был практически одинаков у пациентов с I и II стадиями обоих гистологических типов НМКРЛ. В то же время, у 62,2% обследованных с АК и

где [ГК], [CYFRA 21-1], [MFI СХСR1, гранулоциты], [СХСR2, лимфоциты, %], — уровень соответствующих показателей в крови обследуемых; \exp — показательная функция, равная e^x , где e — основание натурального логарифма ($\approx 2,718$).

Для оценки эффективности регрессионной модели был проведён ROC-анализ. Площадь под кривой зависимости чувствительности от вероятности ложноположительного результата составила 0,954 (рисунк, А). Установлено оптимальное значение порога бинарной классификации (0,59), то есть, наличие у обследуемого I-II стадий ПКРЛ считается наиболее вероятным, если $Y1 > 0,59$. При $Y1 < 0,59$ у обследуемого диагностируется отсутствие заболевания. У 95,7% пациентов с ранними стадиями ПКРЛ значение результативной переменной превышало оптимум порога классификации (чувствительность). Среди всех здоровых людей у 93,7% результат регрессионного уравнения был меньше, чем 0,59 (специфичность). Диагностическая эффективность созданной модели составила 95,1%. При этом, прогностическая ценность

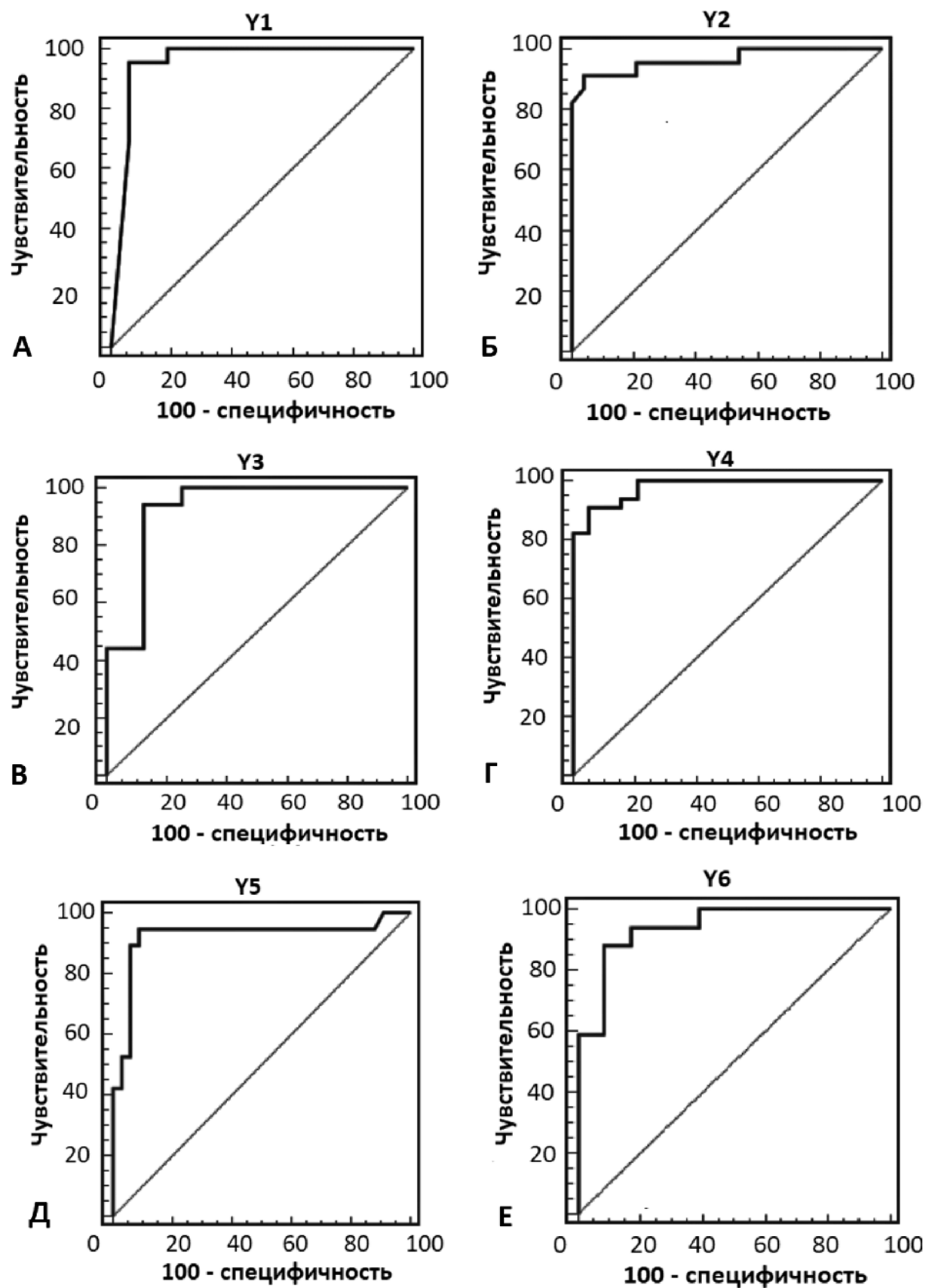


Рисунок. Графики ROC-кривой для оценки моделей логистической регрессии: А — Y1; Б — Y2; В — Y3; Г — Y4; Д — Y5; Е — Y6.

положительного результата (ПЦПР — вероятность того, что у обследуемого пациента с результатом уравнения $>0,59$ действительно имеется I или II стадия ПКРЛ) составила 95,6%. Прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР — вероятность того, что у обследуемого с результатом уравнения $<0,59$ отсутствует ПКРЛ) составила 93,8%.

Таким образом, использование комбинации маркеров позволило увеличить диагностическую эффективность выявления ранних стадий ПКРЛ по сравнению с эффективностью определения каждого из них в отдельности на 8,7-14,6%.

Для диагностики III-IV стадий ПКРЛ в регрессионное уравнение были отобраны те же показатели (формула 2).

Оптимум порогового значения бинарной классификации (Y_2) равен 0,64. У 93,1% пациентов с результатом уравнения $Y_2 > 0,64$ были диагностированы III-IV стадии ПКРЛ. 93,3% пациентов со значением результативной переменной менее 0,64 не имеют поздних стадий заболевания. Таким образом, регрессионная модель Y_2 позволяет выявить III или IV стадии ПКРЛ с диагностической эффективностью 95,8% (ПЦПР — 95,5%, ПЦОР — 91,6%). Модель оказалась чрезвычайно надёжной, о чём свидетельствует $AUC=0,966$ (рисунок, Б).

Ввиду важности отличия I стадии ПКРЛ от II, была создана регрессионная модель в виде уравнения 3. В неё был отобран уровень ГК в сыворотке крови и относительное содержание лимфоцитов, снабженных CXCR2 (формула 3).

У 94,4% пациентов со II стадией заболевания результаты регрессионного уравнения Y_3 превышали пороговое значение 0,34, а у 87,5% обследуемых с $Y_3 < 0,34$ II стадия ПКРЛ отсутствовала. AUC составила 0,924 (рисунок, В). Вероятность того, что у пациента с результатом $Y_3 > 0,44$ действительно имеется II стадия ПКРЛ (ПЦПР) составила 94,7%. У обследуемого с результатом уравнения $Y_3 < 0,44$ II стадия ПКРЛ отсутствовала с вероятностью 100% (ПЦОР).

Для повышения эффективности диагностики АК также разработаны 3 диагностические модели. В регрессионное уравнение, позволяющее выявить

у обследуемых I-II стадии АК, была включена доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах и уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови (формула 4).

ROC-анализ позволил определить пороговое значение результатов регрессионного уравнения — 0,61. У 91,3% пациентов с ранними стадиями АК значение результативной переменной превысило 0,61. Среди обследованных пациентов и здоровых людей, у которых значение Y_4 было меньше 0,61, заболевание отсутствовало у 94,7%. Диагностическая эффективность регрессионной модели Y_4 составила 93,4%. Вероятность того, что обследуемый с результатом уравнения $Y_4 > 0,61$ действительно имеет I-II стадии АК, составляет 93,9% (ПЦПР). У пациента с $Y_4 < 0,61$ заболевание отсутствовало с вероятностью 85,0% (ПЦОР). $AUC=0,978$ (рисунок, Г) свидетельствует о её высокой надёжности.

Для дифференцирования ранних и поздних стадий АК высокую диагностическую эффективность продемонстрировала комбинация уровня CYFRA 21-1 в сыворотке крови и доли лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2 (формула 5).

Значение порога бинарной классификации регрессионной модели Y_5 составило 0,15. Превышение этой величины было у всех (100%) пациентов с диагностированными III-IV стадиями АК (специфичность — 91,3%). Регрессионная модель позволяет выявить поздние стадии АК с эффективностью 90,1%. Вероятность наличия III или IV стадии АК у пациента с результатом регрессионного уравнения 5 (Y_5) более 0,15 составила 88,2% (ПЦПР). Если же величина Y_5 у пациента была меньше 0,15, с вероятностью 91,4% III-IV стадии АК у него отсутствовали (ПЦОР). Данные ROC-анализа свидетельствуют о высокой надёжности модели (AUC — 0,969) (рисунок, Д).

Для дифференцирования II стадии АК с I, в регрессионное уравнение были включены те же предикторы, которые были использованы с той же целью при ПКРЛ (доля лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, и уровень ГК в сыворотке крови). Оптимальное значение порога бинарной классификации при дифференцировании I от II стадии АК оказалось большим (0,46), чем при ПКРЛ (0,44) (формула 6).

$$Y_2 = \frac{\exp(-41,9 + 0,14 \cdot [\text{ГК}] + 1,35 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}] + 0,06 \cdot [\text{MFI CXCR1, гранулоциты}])}{1 + \exp(-41,9 + 0,14 \cdot [\text{ГК}] + 1,35 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}] + 0,06 \cdot [\text{MFI CXCR1, гранулоциты}])} \quad (2).$$

$$Y_3 = \frac{\exp(-23,2 + 0,21 \cdot [\text{ГК}] + 0,87 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-23,2 + 0,21 \cdot [\text{ГК}] + 0,87 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}])} \quad (3).$$

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

$$Y_5 = \frac{\exp(-12,3 + 0,37 \cdot [\text{CYFRA 21-1}] + 0,39 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-12,3 + 0,37 \cdot [\text{CYFRA 21-1}] + 0,39 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}])} \quad (5).$$

$$Y_6 = \frac{\exp(-27,3 + 0,88 \cdot [\text{ГК}] + 0,30 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-27,3 + 0,88 \cdot [\text{ГК}] + 0,30 \cdot [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}])} \quad (6).$$

Среди пациентов с диагностированной по результатам клинического обследования пациентов II стадией АК у 88,2% значение Y6 превышало пограничное. В то же время, у пациентов с I стадией заболевания величина Y6 была меньше 0,46 в 91,2% случаев. Диагностическая эффективность модели Y6 составила 90,2%, а AUC по результатам ROC-анализа — 0,941 (рисунок, E). Вероятность правильного диагностирования II стадии АК у пациента, для которого результат уравнения был больше 0,46, не менее 88,2% (ПЦПР), ПЦОР — 91,3%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования указывают на сравнительно высокую диагностическую чувствительность, специфичность и эффективность определения MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, и уровня ГК в крови при НМКРЛ. Другие исследователи ранее также обнаружили повышенный уровень ГК в сыворотке крови пациентов с этим заболеванием. При этом диагностическую чувствительность её определения при АК не оценивали в связи с малым количеством обследованных, а у пациентов с ПКРЛ она составила 44% [17].

Оценку диагностических параметров определения MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, экспрессирующих CXCR2, при НМКРЛ не проводили. Отсутствуют данные об определении уровня всех вышеперечисленных показателей и у пациентов с разными гистологическими подтипами этого заболевания.

Использование комбинации их определения в крови, согласно результатам настоящего исследования, позволило достичь более чем 90% эффективности для оценки распространённости этого заболевания. В частности, созданная диагностическая модель для выявления I-II стадий ПКРЛ имеет диагностическую эффективность 95,1%, а ранних стадий АК — 93,4%. Используя предложенную комбинацию параметров, можно отличать I стадию ПКРЛ и АК от II с диагностической эффективностью 90,3% и 90,2% соответственно.

К настоящему времени вовлечение нескольких показателей в диагностику НМКРЛ является принятым приёмом. Так, обнаружено, что комбинация определения уровня в крови карциноэмбрионального антигена (СЕА), нейрон-специфической енолазы (NSE), углеводного антигена СА 19-9 и CYFRA 21-1 позволяет выявить пациентов с ПКРЛ с чувствительностью 94,1%. Однако в случае АК чувствительность этой модели значительно ниже (80%) [16]. В другом исследовании установлена высокая чувствительность (90,1%) определения комбинации уровня в крови пролактина, СЕА и CYFRA 21-1 при диагностике НМКРЛ безотносительно гистологического подтипа заболевания [15]. Возможность комбинированного определения нескольких параметров в крови пациентов на раннем этапе развития АК и ПКРЛ ранее не изучалась.

Данные проведенного исследования позволяют сформулировать алгоритм определений в крови пациентов для оценки распространённости у них НМКРЛ. Прежде всего, при обследовании пациента целесообразно определить MFI CXCR1 в гранулоцитах, долю лимфоцитов, имеющих CXCR2, уровень ГК и CYFRA 21-1 в сыворотке крови. Для каждого гистологического подтипа рассчитывают результативные переменные трёх предложенных регрессионных уравнений. Зная пограничные значения для каждого из них, можно судить: 1) о наличии у пациента АК или ПКРЛ; 2) о распространённости опухолевого процесса — I, II, III-IV стадии.

Полученные результаты расчёта созданных регрессионных уравнений позволяют в ближайшей перспективе провести проверку правильности рассчитанных пороговых значений на экзаменационной выборке пациентов. После этого можно будет рекомендовать их практическое использование в лабораторной диагностике АК и ПКРЛ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансовая поддержка осуществлялась за счёт средств республиканского бюджета РБ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования с использованием биологических сред организма пациентов были проведены с учётом “Правил и норм гуманного обращения с биологическими объектами исследований” Белорусского государственного медицинского университета на заседании комитета по биомедицинской этике (протокол №2 от 04.10.2021 г.). Все участники исследования дали информированное согласие на участие в исследовании и использование в нём их биопроб.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I. (2020) CA Cancer J. Clin., **71**(3), 209-249.
2. Raso M.G., Wistuba I.I. (2007) J. Thoracic Oncol., **2**(7), 128-135.
3. Rosen R.D., Sapra A. (2021) TNM Classification, StatPearls Publishing [Internet].
4. Wang B.Y., Huang J.Y., Chen H.C., Lin C.H., Lin S.H., Hung W.H., Cheng Y.F. (2020) J. Cancer Res. Clin. Oncol., **146**(1), 43-52.
5. Kulpa J., Wójcik E., Reinfuss M., Kołodziejewski L. (2002) Clin. Chem., **48**(11), 1931-1937.
6. Liu Q., Li A., Tian Y., Wu J.D., Liu Y., Li T., Chen Y., Han X., Wu K. (2016) Cytokine Growth Factor Rev., **31**, 61-71.
7. Wang L., Shi L., Gu J., Zhan C., Xi J., Ding J., Ge D. (2018) J. Physiol. Biochem., **74**(2), 313-324.

8. Pirinen R., Tammi R., Tammi M., Hirvikoski P., Parkkinen J.J., Johansson R., Böhm J., Hollmén S., Kosma V.M. (2001) *Int. J. Cancer*, **95**(1), 12-17.
9. Bamji-Stocke S., van Berkel V., Frieboes B.H. (2018) *Metabolomics*, **14**(6), 81. DOI: 10.1007/s11306-018-1376-2
10. Zhenyu S., Chen X., Wang X. (2016) *Biomarker Res.*, **4**, 11. DOI: 10.1186/s40364-016-0065-4
11. Liu Y., Wu B., Geng H., Xu M., Zhong H. (2015) *Oncol. Lett.*, **10**(3), 1315-1322.
12. Rangel M.P., de Sá V.K., Martins V., Martins J.R.M., Parra E.R., Mendes A., Andrade P.S., Reis R.M., Longatto-Filho A., Oliveira C.Z., Takagaki T., Carraro D.M., Nader H.B., Capelozzi V.L. (2015) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **48**(6), 557-567.
13. Lin W., Yugang L., Yuefeng M., Chao D., Huijun Z., Zhenghui L., Zhenning G., Changsheng Z. (2019) *Cell Cycle*, **18**(24), 3456-3471.
14. Rajul P., Mathai A., Shefali S., Chandra S., Ravi T. (2008) *Indian J. Ophthalmol.*, **56**(1), 45-50.
15. Fang R., Zhu Y., Khadka V.S., Zhang F., Jiang B., Deng Y. (2018) *Front. Physiol.*, **9**, 1710. DOI: 10.3389/fphys.2018.01710
16. Li X., Asmitananda T., Gao L., Gai D., Song Z., Zhang Y., Ren H., Yang T., Chen T., Chen M. (2012) *Neoplasma*, **59**(5), 500-507.
17. Hernandez-Hernandez J.R., Garcia-Garcia J.M., Martinez M.T. (1995) *Int. J. Biol. Markers*, **10**(3), 149-155.

Поступила в редакцию: 10. 09. 2021.
После доработки: 24. 09. 2021.
Принята к печати: 04. 10. 2021.

DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF DETERMINING CXCR1, CXCR2 AND HYALURONIC ACID BLOOD LEVEL IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

D.I. Murashka^{1*}, A.D. Tahanovich¹, M.M. Kauhanka¹, V.I. Prokhorova², O.V. Gotko²

¹Belarusian State Medical University,
83 Dzerzhinskogo ave., Minsk, 220116 Belarus, *e-mail: sherstyanoyurovei@mail.ru
²N.N. Aleksandrov RSPC of Oncology and Medical Radiology,
at. Lyasnoy, Minsk, 223040 Belarus

In the structure of lung cancer incidence most cases belong to non-small cell lung cancer (NSCLC) which is subdivided into two histological subtypes: adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC). A five-year survival rate of patients with stage I NSCLC is two times higher than in patients with stage II and more than five times higher than in stages III-IV. Currently, there are no informative blood biomarkers to diagnose early stages of NSCLC. The aim of the study was to evaluate complex determination of hyaluronic acid (HA), CXCR2 and CXCR1 levels blood of patients with AC and SCC. Blood samples from of 107 patients with SCC, 90 patients with AC, and 40 healthy people were used in this study. Concentration of HA in blood serum was determined by enzyme linked immunoassay. The level of CXCR2 and CXCR1 was determined by flow cytometry. Diagnostic parameters were determined by constructing mathematical models in the form of regression equations using the method of stepwise inclusion of predictors and subsequent ROC-analysis. Results of the study indicate that MFI CXCR1 in granulocytes, proportion of lymphocytes containing CXCR2 and concentration of HA in blood serum in stage I AC and SCC are significantly higher than in healthy people. The level of these parameter significantly increases at stage II of the disease compared to stage I and demonstrates further growth at its later stages. Based on the obtained results, regression equations were created: (i) including MFI CXCR1 in granulocytes, proportion of lymphocytes supplied with CXCR2 and HA concentration in the serum to detect stages I-II SCC (diagnostic sensitivity — 95.7%, specificity — 93.7%, threshold value — 0.59) and stages III-IV SCC (diagnostic sensitivity — 93.1%, specificity — 93.3%, threshold value — 0.64); (ii) including the proportion of lymphocytes supplied with CXCR2 MFI CXCR1 in granulocytes and CYFRA 21-1 blood level, which allows the detection of I-II stages of AC (sensitivity — 91.3%, specificity — 94.7%, threshold value — 0.61); (iii) including the proportion of lymphocytes supplied with CXCR2 and CYFRA 21-1 blood level, which allows the detection of AC stages III-IV (sensitivity — 94.6%, specificity — 91.3%, threshold value — 0.15); (iv) including the proportion of lymphocytes supplied with CXCR2 and HA level in the serum to differentiate stage II SCC from stage I (sensitivity — 94.4%, specificity — 87.5%, threshold value — 0.44) and II stage AC from stage I (sensitivity — 88.5%, specificity — 91.2%, threshold value — 0.46).

Key words: non-small cell lung cancer; CXCR1; CXCR2; hyaluronic acid; blood

Funding. Financial support was carried out at the expense of the budget of the Republic of Belarus.

Received: 10.09.2021, revised: 24.09.2021, accepted: 04.10.2021.