

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ СТАДИЯМИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО НА ОСНОВЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

А.Д. Таганович^{1}, Н.Н. Ковганко¹, В.И. Прохорова², Д.И. Мурашко¹, О.В. Готько²*

¹Белорусский государственный медицинский университет,
220116, Республика Беларусь, Минск, просп. Дзержинского, 83; *эл. почта: ataganovich@gmail.com
²РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова,
223040, Республика Беларусь, аг. Лесной, Минская область

В структуре заболеваемости раком лёгкого преобладает немелкоклеточный рак (НМКРЛ). При I стадии НМКРЛ 5-летний барьер выживаемости преодолевают только 60-70% пациентов, а при II стадии выживаемость снижается до 35-40%. Причиной столь высокой смертности практически всегда является рецидив заболевания. Основные гистологические формы НМКРЛ — аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ) — отличаются течением, протоколами и эффективностью проводимого лечения. Сравнительные данные выживаемости при АК и ПКРЛ противоречивы, а надёжные биомаркеры для определения риска прогрессирования опухоли отсутствуют. Цель исследования — обосновать возможность использования лабораторных показателей, характеризующих уровень некоторых белков крови — участников канцерогенеза у пациентов с ранними стадиями АК и ПКРЛ для определения риска прогрессирования заболевания. Ретроспективно проанализирована длительность безрецидивного периода после проведённого хирургического лечения в течение одного года у 1250 пациентов (816 — с I и II стадиями аденокарциномы, G1-3 и 434 — с ранними стадиями ПКРЛ, G1-3). У 117 пациентов (81 — с I-II стадиями АК, G1-3, 36 — с I-II стадиями ПКРЛ, G1-3) определяли уровень CYFRA 21-1 и SCC, концентрацию хемокинов CXCL5, CXCL8, TPA, M2 пируваткиназы, HIF-1 α , гиалуроновой кислоты, а также рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6. Посредством графического анализа Каплана-Майера определены группы низкого (I ст. G1-2 + II ст. G1) и высокого (I ст. G3 + II ст. G2-3) риска прогрессирования опухоли. При АК однолетняя выживаемость пациентов выше, чем при ПКРЛ. У пациентов с АК и высоким риском рецидива опухоли по сравнению с пациентами с низким риском были больше уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах, относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах. При быстром прогрессировании ПКРЛ у пациентов более высокое, чем при медленном прогрессировании, относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах, доля моноцитов, снабжённых рецептором CD44v6, уровень SCC. Регрессионные уравнения, включающие комбинации вышеуказанных параметров (пороговое значение для АК — 0,512, для ПКРЛ — 0,409, чувствительность — 91,9% и 90%, специфичность — 90,0% и 87,5% соответственно), позволяют прогнозировать вероятность рецидива опухоли.

Ключевые слова: аденокарцинома лёгкого; плоскоклеточный рак лёгкого; прогрессирование; биомаркеры крови

DOI: 10.18097/PBMC20216706507

ВВЕДЕНИЕ

Рак лёгкого является ведущей причиной в структуре смертности от онкологических заболеваний у мужчин, у женщин он занимает второе место. В большинстве случаев (80%-85%) это немелкоклеточный рак лёгкого (НМКРЛ), который на основании гистологического исследования чаще является аденокарциномой (АК) (половина всех случаев первично диагностированного рака лёгкого) или плоскоклеточным раком (ПКРЛ) [1-9]. В настоящее время накоплено много информации о различиях между подтипами НМКРЛ — АК и ПКРЛ. Они касаются не только структурных особенностей, но и мутаций генов [10-13]. АК чаще встречается

у некурящих женщин, в то время как ПКРЛ характерен для курящих мужчин [14]. Протоколы лечения и эффективность его также различны при обоих гистологических подтипах НМКРЛ [15]. Течение заболевания при аденокарциноме менее агрессивно, характеризуется более благоприятным ответом на проводимое лечение [11, 12]. Вместе с тем, данные об уровне выживаемости пациентов с АК и ПКРЛ противоречивы. Согласно одним исследователям, ПКРЛ характеризуется более высокой выживаемостью по сравнению с АК [16]. Другие авторы пришли к выводу об отсутствии разницы в выживаемости между ними [17]. Наконец, согласно ещё одной точке зрения, АК имеет более благоприятную 5-летнюю выживаемость пациентов по сравнению с ПКРЛ [18, 19].

Принятые сокращения: АК — аденокарцинома; НМКРЛ — немелкоклеточный рак лёгкого; ПКРЛ — плоскоклеточный рак лёгкого; CYFRA 21-1 — фрагмент цитокератина 19; MFI — средняя интенсивность флуоресценции; SCC — антиген плоскоклеточной карциномы; РЭА — раковый эмбриональный антиген; ЭДТА-К₂ — двойная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты; TuM2 PK — изофермент пируваткиназы; HIF-1 α — фактор, индуцируемый гипоксией; ИФА — иммуноферментный анализ; TNM — международная классификация выраженности опухолевого процесса.

Пятилетняя выживаемость пациентов с НМКРЛ существенно меньше, чем в случае злокачественных опухолей другой локализации и составляет 15% [3]. У 70% пациентов удаётся поставить правильный диагноз только на III/IV стадиях, когда оперативное вмешательство уже не показано или гораздо менее эффективно [2].

Однако даже на ранних стадиях 5-летний барьер выживаемости преодолевают только 60-70% пациентов с I стадией НМКРЛ и 35-40% — со II стадией (по классификации TNM). Причиной столь высокой смертности практически всегда является рецидив заболевания, который обусловлен наличием скрытых метастазов, даже несмотря на постановку диагноза в ранней стадии. Это свидетельствует о разном течении заболевания в пределах одной стадии. Таким образом, есть необходимость в разработке прогностических показателей, которые бы позволяли предсказывать прогрессирование опухолевого процесса у пациентов на ранних стадиях развития опухоли с тем, чтобы правильно построить стратегию и тактику их лечения (проведение только хирургического лечения или в сочетании с неoadъювантной и (или) адъювантной терапией).

Для выявления заболевания на ранних стадиях, когда клиническая симптоматика ещё отсутствует, самым приемлемым является проведение скрининговых исследований. Для этих целей используют три направления — визуализация опухоли, гистологические и биохимические методы. К сожалению, на сегодняшний день имеющиеся методы визуализации опухоли имеют ограничения, обусловленные, с одной стороны, их разрешающей способностью и облучением организма. С другой — действуют экономические причины, связанные с высокой стоимостью такого оборудования. Гистологическое исследование предполагает наличие биопсийного материала опухолевой ткани, который чаще можно получить только инвазивным путём.

Многообещающим диагностическим инструментом служат циркулирующие биомаркеры рака лёгкого. Они появляются и обнаруживаются в кровотоке на ранней стадии опухолевого процесса. 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 [4]. Они являются или компонентами опухолевых клеток, или участниками звеньев молекулярных событий развития опухолевой ткани. К ним, в частности, относятся CYFRA 21-1 (фрагмент цитокератина 19), SCC (антиген плоскоклеточного рака), РЭА (раковый эмбриональный антиген) [5]. Было показано, что CYFRA 21-1 является чувствительным маркером НМКРЛ, в особенности ПКРЛ, а раковый эмбриональный антиген (РЭА) — аденокарциномы [20-22]. Использование их комбинации рекомендовано для диагностики этого заболевания [11]. Однако результаты определения в сыворотке крови уровня каждого из них в отдельности не смогли продемонстрировать необходимых специфичности и чувствительности [6].

Предпринятые попытки использовать значения этих же показателей до оперативного лечения с прогностической целью у пациентов с I стадией НМКРЛ [23, 24] не принесли желаемого результата. Одни исследователи полагали, что РЭА полезен для отбора пациентов с высоким риском прогрессирования заболевания, в то время как уровень CYFRA 21-1 не связан с развитием рецидива [23]. Другие пришли к выводу, что только CYFRA 21-1 был независимым прогностическим фактором у пациентов с I стадией НМКРЛ, хотя повышение уровня обоих маркеров было характерно для неблагоприятного прогноза [24]. Существует и третья точка зрения, согласно которой подъём концентрации в сыворотке крови ни одного из этих маркеров не способен предсказывать вероятность неблагоприятного течения заболевания [25].

Воспаление относится к обязательному компоненту молекулярных событий, сопутствующих развитию рака [7]. CXCL5 и CXCL8, известный также как интерлейкин 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 [8]. Результаты ранее проведённых 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 маркеров [9]. Информация об использовании провоспалительных цитокинов и (или) их рецепторов для предсказания прогрессирования рака лёгкого отсутствует.

Целью настоящего исследования было обоснование возможности использования лабораторных показателей, характеризующих уровень некоторых белков крови — участников канцерогенеза у пациентов с ранними стадиями АК и ПКРЛ, для определения риска прогрессирования заболевания.

МЕТОДИКА

Для обоснования групп риска прогрессирования опухоли у пациентов с ранними стадиями АК и ПКРЛ проведено ретроспективное исследование с использованием базы данных Белорусского канцер-регистра. У 1250 пациентов (839 мужчин и 411 женщин), у которых в период с 01.01.2015 по 31.12.2015 впервые был диагностирован НМКРЛ в ранних стадиях (I и II по классификации TNM), анализировали длительность безрецидивного периода после проведённого хирургического лечения по результатам наблюдения в течение одного года. Средний возраст пациентов составил 57±24,5 лет. Стадия I аденокарциномы была у 467 человек (322 мужчины и 145 женщин), II стадия — у 349 человек (234 мужчины и 115 женщин).

Стадия I плоскоклеточного рака лёгкого была выявлена у 265 человек (167 мужчин и 98 женщин), II стадия — у 169 человек (93 мужчины и 76 женщин).

Исследование уровня лабораторных показателей проводили у 117 пациентов (73 мужчины и 44 женщины), поступивших в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период с 01.01.2019 по 31.12.2020 гг., у которых впервые диагностирован НМКРЛ I или II стадии. Средний возраст пациентов составил $56 \pm 22,5$ лет. Стадия I аденокарциномы была диагностирована у 40 пациентов (26 мужчин и 14 женщин). По результатам гистологического исследования, высокодифференцированная опухоль (G1) была у 13, средней степени дифференцировки (G2) — у 15 и низкодифференцированная (G3) — у 12 человек. У 41 пациента (25 мужчин и 16 женщин) была выявлена II стадия аденокарциномы. Из них по степени злокачественности опухоли G1 была у 9, G2 — у 10 и G3 — у 8 человек. Стадия I плоскоклеточного рака лёгкого была диагностирована у 22 пациентов (13 мужчин и 9 женщин). По результатам гистологического исследования высокодифференцированная опухоль (G1) была у 7, средней степени дифференцировки (G2) — у 8 и низкодифференцированная (G3) — у 7 человек. У 14 пациентов (9 мужчин и 5 женщин) была II стадия плоскоклеточного рака лёгкого (G1 — у 5, G2 — у 5 и G3 — у 4 человек) (см. дополнительные материалы).

Кровь из локтевой вены собирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-К₂. Определение концентрации антигена CYFRA 21-1 (фрагмента цитокератина-19) и концентрации биомаркера плоскоклеточного рака SCC (подфракция ингибитора сериновой протеазы TA-4) в сыворотке крови проводили на автоматическом анализаторе Cobas e411 (“Roche Diagnostics”, Германия), использующем принцип электрохемилюминесценции.

Определение концентрации хемокинов CXCL5, CXCL8, фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1 α , изофермента пируваткиназы TuM2 PK и гиалуроновой кислоты в сыворотке крови пациентов с НМКРЛ проводили с помощью ИФА-наборов FineTest (KHP) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (“Seac”, Италия). Измерение оптической плотности ИФА-наборов проводили при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм на планшетном фотометре Sirio (“Seac”).

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 смесь растворов соответствующих антител (по 5 мкл), содержащих флуоресцентные метки: CD44v6-FITC (“Invitrogen”, США), CD181(CXCR1)-PE-Cy5 (“BioLegend”, США), CD182(CXCR2)-PE (“BioLegend”)

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).

Для выборки пациентов, у которых проводили исследование лабораторных показателей, проверяли гипотезу нормальности распределения по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Поскольку значения не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программы MedCalc (“MedCalc Software”, Бельгия). Рассчитывали медиану и интерквартильный размах (25%-75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни.

Для выяснения зависимости длительности безрецидивного периода от времени наблюдения строили графики Каплана-Майера. Сравнение групп с различным риском прогрессирования АК и ПКРЛ проводили, используя Log Rank тест и χ^2 (хи-квадрат).

Построение диагностической модели осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии. Использовали метод пошагового включения предикторов, который ранжирует признаки в соответствии с их вкладом в модель. Относительный вклад отдельных предикторов выражали величиной стандартизованного коэффициента регрессии. Качество приближения регрессионной модели оценивали при помощи функции правдоподобия, мерой которой служит отрицательное удвоенное значение логарифма этой функции (–2LL). Согласованность полученной модели (регрессионного уравнения) проверяли, используя тест Хосмера-Лемешова.

Оценку интегральной диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением площади под ROC-кривой (AUC). О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчёта чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов и диагностической эффективности теста. Для этого использовали расчётные значения истинно положительных, истинно отрицательных, ложноположительных и ложноотрицательных результатов диагностического теста. Расчёт производили по общепринятым формулам. Пороговое значение определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении кривых зависимости чувствительности от вероятности ложноположительных результатов.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимость проведения ретроспективного исследования была продиктована поиском и выделением групп риска прогрессирования опухоли в ранних стадиях АК и ПКРЛ. С этой целью в расчёт принимались только те факторы, которые связаны с развитием опухоли и, прежде всего, могут оказывать своё влияние на прогрессирование. По мнению различных авторов, к ним относятся стадия заболевания и степень дифференцировки клеток опухоли или Grade [13]. Мы проанализировали вышеперечисленные факторы, сопоставив их с результатами одногодичного наблюдения после проведённого лечения до наступления рецидива заболевания.

Результаты графического анализа Каплана-Майера позволили оценить зависимость безрецидивной выживаемости пациентов от стадии НМКРЛ и степени дифференцированности опухоли. Как и ожидалось, длительность безрецидивной выживаемости пациентов со II стадией АК и ПКРЛ была значительно ниже, чем пациентов с I стадией заболевания (рис. 1). Аналогично стадии имеется чёткая разница безрецидивной выживаемости пациентов с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток (рис. 2). Наиболее высокая она в случае, когда клетки опухоли высоко дифференцированы (G1), и затем, по мере снижения степени дифференцировки (G2, G3), уменьшается.

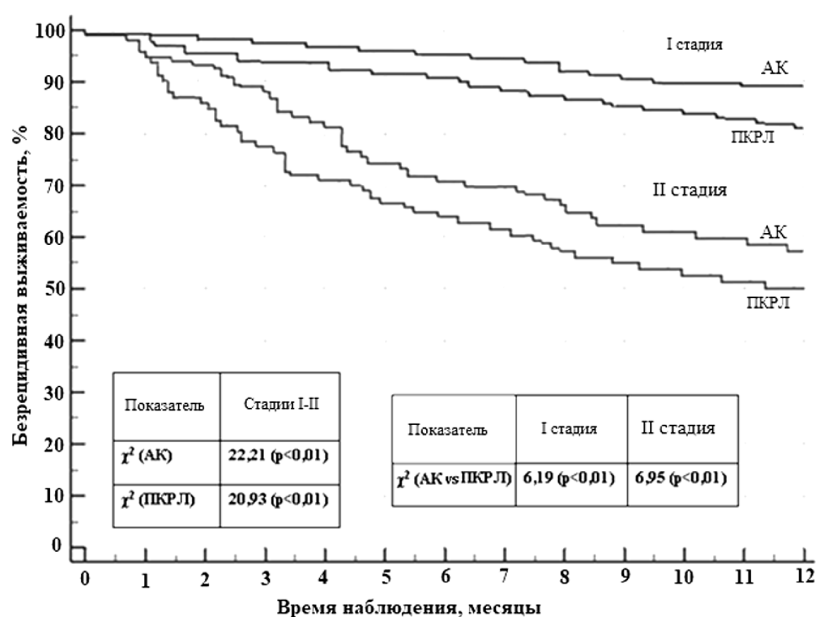


Рисунок 1. Безрецидивная выживаемость пациентов с I или II стадиями аденокарциномы и плоскоклеточного рака лёгкого.

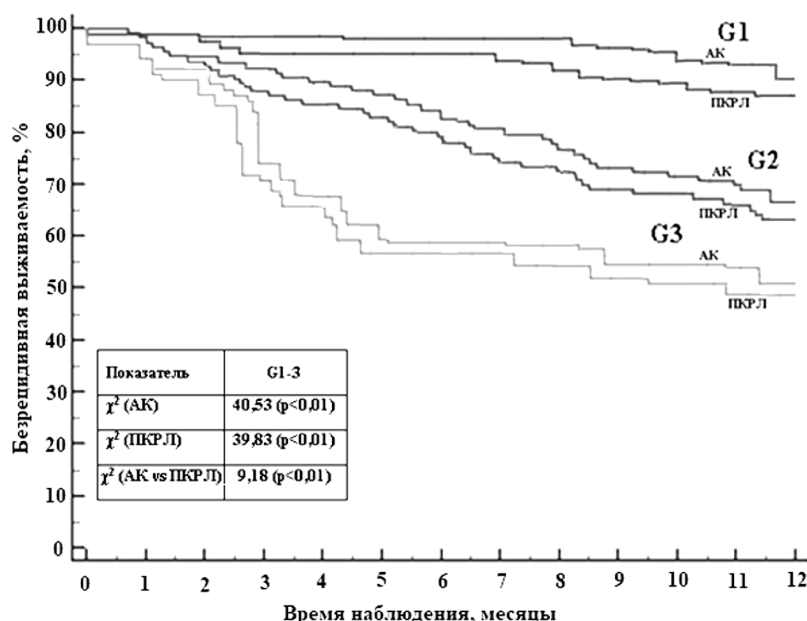


Рисунок 2. Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком лёгкого в зависимости от степени злокачественности опухоли.

График Каплана-Майера, в котором приведена зависимость безрецидивной выживаемости пациентов, одновременно, в зависимости от стадии (I или II) и степени дифференцировки опухолевых клеток, наглядно демонстрирует разделение кривых на 2 группы (рис. 3, 4). Первая включает пациентов с более длительной безрецидивной выживаемостью, в неё вошли пациенты I стадией АК или ПКРЛ и высокодифференцированной опухолью (G1) или опухолью средней степени дифференцировки (G2), а также пациенты со II стадией заболевания и высокодифференцированной опухолью. Вторая группа включает пациентов с более коротким периодом безрецидивной выживаемости. В неё вошли пациенты с I стадией и низкодифференцированной

опухолью (G3), а также пациенты со II стадией, опухолевые клетки у которых были средней степени дифференцировки или низкодифференцированными (рис. 3, 4).

На основании полученных данных все пациенты были разделены на группы быстрого (I ст. G3 + II ст. G2-G3) и медленного (I ст. G1-G2 + II ст. G1) прогрессирования опухоли или, соответственно, высокого и низкого риска прогрессирования. Результаты построения графика Каплана-Майера показывают, что разница безрецидивной выживаемости между этими двумя группами превышает различия выживаемости в зависимости только от стадии НМКРЛ или только от степени дифференцированности опухолевых клеток (рис. 5).

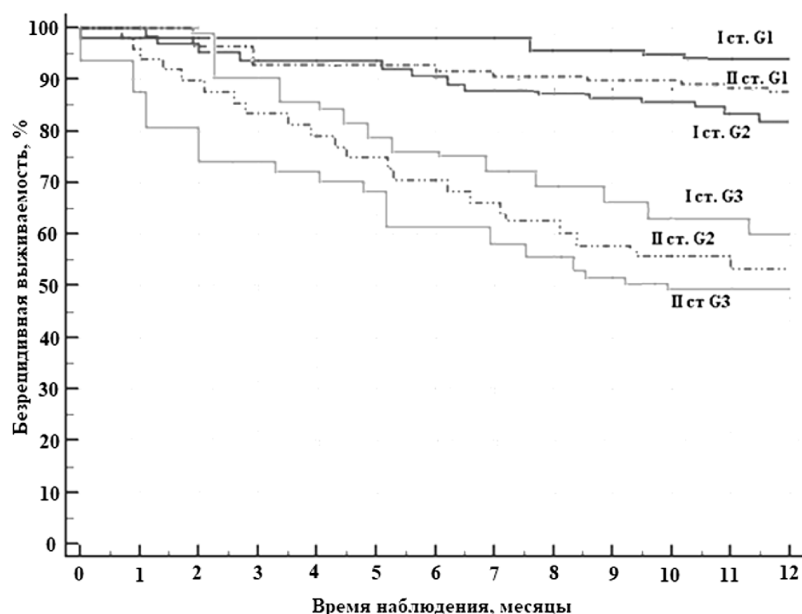


Рисунок 3. Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокарциномой в зависимости от стадии и степени злокачественности опухоли.

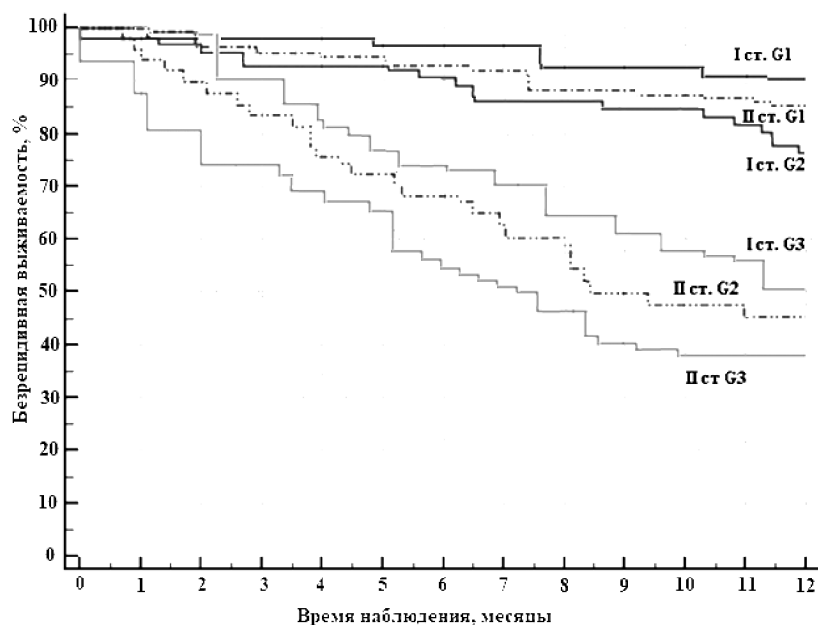


Рисунок 4. Безрецидивная выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого в зависимости от стадии и степени злокачественности опухоли.

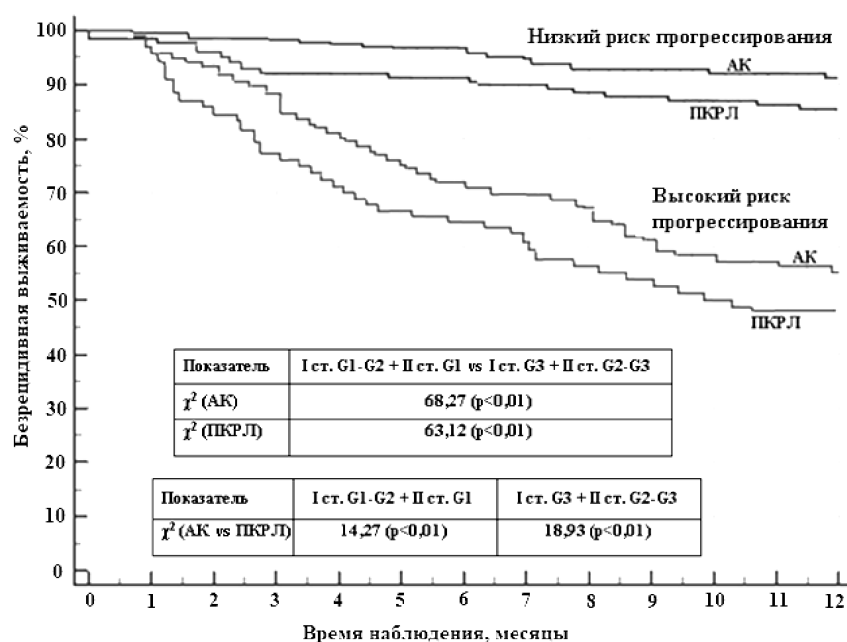


Рисунок 5. Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком лёгкого в зависимости от риска прогрессирования опухоли.

Ещё более чётко различия выживаемости в анализируемых группах пациентов по сравнению только со стадией НМКРЛ или только со степенью злокачественности прослеживаются путём расчёта значений критерия χ^2 (хи-квадрат) при проведении Log-rank теста (рис. 1-4). Его величина была статистически значимой и характеризовала выраженность различий в группах низкого (пациенты с I ст. G1-G2 и II ст. G1) и высокого (пациенты с I ст. G3 и II ст. G2-G3) рисков прогрессирования опухоли. Она в 3 раза превышает значение этого показателя, если анализировалась разница, обусловленная только стадией заболевания, и в 1,5 раза — только степенью злокачественности опухоли (рис. 1-4). Из 26 определяемых лабораторных параметров в крови пациентов с АК и ПКРЛ, уровни только трёх для АК и трёх для ПКРЛ демонстрировали существенную разницу между группами высокого и низкого риска прогрессирования опухоли (табл. 1, 2).

У пациентов с АК и высоким риском прогрессирования опухоли по сравнению с пациентами с низким риском прогрессирования опухоли уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах и относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах были более высокими. У пациентов с ПКРЛ и высоким риском по сравнению с группой низкого риска прогрессирования заболевания более высокими были относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах, доля моноцитов, снабжённых рецептором CD44v6, в общей популяции этих клеток крови, а также уровень SCC (табл. 1, 2). Поэтому все они были включены в построение моделей определения риска опухолевой прогрессии методом логистической регрессии. В результате составлены уравнения (1) — для пациентов с АК и (2) — для пациентов с ПКРЛ, которые учитывают все 3 отобранных параметра крови соответственно.

$$Y1 = \frac{\exp(-0,317 + 0,512 \times X1 + 0,631 \times X2 + 0,815 \times X3)}{1 + \exp(-0,317 + 0,512 \times X1 + 0,631 \times X2 + 0,815 \times X3)} \quad (1),$$

где X1 — результат определения концентрации антигена Cyfra 21-1 в сыворотке крови; X2 — интенсивность флуоресценции рецептора CXCR1 в гранулоцитах; X3 — относительное количество (%) рецептора CXCR2 в лимфоцитах; Y1 — результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X1–X3 — коэффициенты логистической регрессии; \exp ($\approx 2,718$) — основание натурального логарифма; “–0,317” — константа логистического уравнения.

$$Y2 = \frac{\exp(-0,492 + 0,309 \times X1 + 0,759 \times X2 + 0,917 \times X3)}{1 + \exp(-0,492 + 0,309 \times X1 + 0,759 \times X2 + 0,917 \times X3)} \quad (2),$$

где X1 — результат определения концентрации антигена SCC в сыворотке крови; X2 — относительное количество (%) рецептора CXCR2 в лимфоцитах; X3 — относительное количество (%) рецептора CD44v6 в моноцитах; Y2 — результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X1–X3 — коэффициенты логистической регрессии; \exp ($\approx 2,718$) — основание натурального логарифма; “–0,492” — константа логистического уравнения.

Анализ качества созданных моделей показал, что все отобранные показатели для АК и ПКРЛ вносили существенный вклад в логистическое уравнение. Это следует из того обстоятельства, что их включение в уравнения приводило к значительному снижению отрицательного удвоенного значения логарифма функции правдоподобия ($Y1$, $\Delta=17,79$, $p < 0,05$; $Y2$, $\Delta=16,91$, $p < 0,05$) и соответствует хорошему качеству моделей. Об этом же свидетельствует рассчитанный критерий согласия Хосмера-Лемешова, равный для $Y1$ 8,37 ($p=0,338$), а для $Y2$ — 9,01 ($p=0,403$). В данном случае величина уровня статистической

Таблица 1. Уровень рецепторов, их лигандов и опухолевых биомаркеров у пациентов с низким и высоким риском прогрессирования опухоли (аденокарцинома)

Показатель	Низкий риск	Высокий риск
CXCR1 гранулоциты, %	93,90 [92,70; 95,90]	95,70 [93,90; 96,80]
CXCR1 гранулоциты, MFI	36,45 [26,80; 44,15]	49,40 [36,90; 61,10]*
CXCR1 лимфоциты, %	9,10 [5,30; 18,50]	11,90 [6,60; 18,60]
CXCR1 лимфоциты, MFI	2,80 [2,40; 3,80]	3,40 [2,50; 4,80]
CXCR1 моноциты, %	85,50 [72,60; 96,70]	93,50 [76,80; 97,20]
CXCR1 моноциты, MFI	2,70 [2,30; 3,60]	3,40 [2,80; 6,70]
CXCL8, пг/мл	165,15 [81,02; 284,15]	171,91 [70,65; 339,90]
CXCR2 гранулоциты, %	93,70 [92,70; 95,90]	96,00 [91,00; 99,90]
CXCR2 гранулоциты, MFI	101,70 [89,60; 119,30]	105,40 [83,60; 126,10]
CXCR2 лимфоциты, %	14,80 [11,10; 21,20]	18,90 [13,70; 25,80]*
CXCR2 лимфоциты, MFI	14,10 [11,20; 19,70]	14,90 [11,90; 18,40]
CXCR2 моноциты, %	91,50 [78,90; 95,60]	96,40 [86,90; 97,10]
CXCR2 моноциты, MFI	22,50 [14,70; 26,90]	24,90 [18,30; 58,90]
CXCL5, пг/мл	470,15 [131,55; 806,15]	528,20 [284,02; 1029,18]
CD44v6 гранулоциты, %	3,45 [2,10; 5,45]	4,25 [2,40; 6,20]
CD44v6 гранулоциты, MFI	2,40 [2,00; 2,60]	2,60 [2,00; 3,50]
CD44v6 лимфоциты, %	1,10 [0,55; 2,05]	1,25 [0,60; 1,65]
CD44v6 лимфоциты, MFI	2,25 [1,95; 3,95]	3,70 [2,65; 4,55]
CD44v6 моноциты, %	4,20 [1,80; 4,80]	5,00 [3,70; 5,80]
CD44v6 моноциты, MFI	4,80 [2,10; 6,10]	5,30 [4,20; 8,10]
HIF-1 α , пг/мл	2,54 [2,20; 3,58]	2,91 [2,17; 3,75]
Гиалуроновая кислота, нг/мл	20,75 [12,32; 27,10]	24,80 [16,30; 37,40]
CYFRA 21-1, нг/мл	2,17 [1,51; 4,15]	3,27 [2,12; 6,49]*
SCC, нг/мл	1,51 [1,05; 2,45]	1,69 [1,18; 2,45]
TPA, пг/мл	827,15 [651,15; 1185,87]	923,15 [772,15; 1214,18]
TuM2 PK, пг/мл	1872,45 [1255,15; 2631,35]	2170,15 [1722,27; 3181,70]

Примечание. Здесь и далее: (%) — доля соответствующих клеток среди клеток того же типа, несущих на своей поверхности соответствующий вид рецептора; MFI — интенсивность флуоресценции комплексов антитело/рецептор, пропорциональная количеству рецепторов на одной соответствующей клетке; * — наличие статистической значимости отличий между определяемым показателем у группы с низким риском прогрессирования опухоли в сравнении с группой с высоким риском прогрессирования.

значимости превышает 0,05, тем самым подтверждается согласованность данных регрессионного уравнения при отнесении пациентов к низкому или высокому рискам прогрессирования соответствующих гистологических типов рака лёгкого.

О надёжности регрессионных уравнений, которые используют комбинацию из значений определения вышеуказанных маркеров для прогнозирования риска опухолевой прогрессии при АК и ПКРЛ, свидетельствуют результаты ROC-анализа (табл. 3, 4). Согласно экспертной шкале AUC, площадь под ROC-кривой в случае АК (0,859) и ПКРЛ (0,847) соответствуют “очень хорошему” качеству прогностической модели. Оптимальное пороговое значение для разделения групп низкого и высокого риска развития опухолевой прогрессии для АК составило 0,512 (табл. 3). То есть, другими словами, если значение $Y_1 > 0,512$, то в 91,9% случаев

у пациентов действительно будет высокий риск рецидива опухоли, в то время как при значении $Y_1 \leq 0,512$ у 90% пациентов будет правильно составлен прогноз низкого риска прогрессирования опухоли. В случае ПКРЛ оптимальное пороговое значение для разделения групп низкого и высокого риска развития опухолевой прогрессии составило 0,409 (табл. 4). То есть, если значение $Y_2 > 0,409$, то в 91,2% случаев у пациентов с ПКРЛ действительно будет высокий риск рецидива заболевания, в то время как при значении $Y_2 \leq 0,409$ у 86,7% пациентов будет правильно составлен прогноз низкого риска прогрессирования опухоли.

По данным однолетнего наблюдения (рис. 6), распределение вероятности безрецидивной выживаемости соответствует результатам ретроспективного исследования (рис. 5). Выживаемость к концу первого года для пациентов

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ

Таблица 2. Уровень рецепторов, лигандов и опухолевых биомаркеров у пациентов с низким и высоким риском прогрессирования опухоли (плоскоклеточный рак лёгкого)

Показатель	Низкий риск	Высокий риск
CXCR1 гранулоциты, %	94,80 [91,70; 95,70]	96,80 [92,90; 97,80]
CXCR1 гранулоциты, MFI	39,45 [27,70; 46,25]	46,30 [34,80; 58,20]
CXCR1 лимфоциты, %	9,20 [5,80; 18,30]	11,70 [6,50; 18,90]
CXCR1 лимфоциты, MFI	2,70 [2,30; 3,70]	3,30 [2,20; 4,90]
CXCR1 моноциты, %	85,10 [72,30; 94,20]	92,50 [77,90; 98,10]
CXCR1 моноциты, MFI	2,60 [2,20; 3,50]	3,30 [2,60; 6,50]
CXCL8, пг/мл	161,23 [82,25; 279,07]	170,78 [70,31; 321,80]
CXCR2 гранулоциты, %	92,30 [90,60; 94,90]	95,90 [90,90; 98,90]
CXCR2 гранулоциты, MFI	101,60 [89,80; 120,10]	104,60 [83,30; 126,90]
CXCR2 лимфоциты, %	13,90 [11,00; 21,40]	18,20 [14,90; 26,60]*
CXCR2 лимфоциты, MFI	14,20 [11,80; 19,10]	14,50 [11,10; 16,90]
CXCR2 моноциты, %	92,10 [79,30; 96,20]	96,20 [86,80; 97,20]
CXCR2 моноциты, MFI	22,30 [14,30; 26,50]	24,40 [18,20; 57,10]
CXCL5, пг/мл	472,20 [130,60; 815,27]	516,62 [273,11; 1011,73]
CD44v6 гранулоциты, %	3,40 [2,05; 5,50]	4,15 [2,30; 6,10]
CD44v6 гранулоциты, MFI	2,20 [1,90; 2,70]	2,70 [2,00; 3,60]
CD44v6 лимфоциты, %	0,75 [0,45; 1,90]	1,25 [0,70; 2,30]
CD44v6 лимфоциты, MFI	2,15 [1,85; 3,85]	3,60 [2,50; 4,50]
CD44v6 моноциты, %	2,60 [1,70; 3,90]	5,10 [2,60; 6,70]*
CD44v6 моноциты, MFI	4,70 [2,20; 6,20]	5,20 [4,10; 8,20]
HIF-1α, пг/мл	2,37 [2,07; 3,69]	2,79 [2,13; 3,95]
Гиалуроновая кислота, нг/мл	21,05 [11,15; 28,25]	24,90 [15,40; 35,20]
CYFRA 21-1, нг/мл	2,45 [2,12; 4,65]	3,07 [2,14; 5,17]
SCC, нг/мл	1,42 [0,95; 2,15]	2,39 [1,25; 3,75]*
TPA, пг/мл	812,11 [641,07; 1112,15]	913,17 [773,93; 1211,27]
TuM2 PK, пг/мл	1811,33 [1210,17; 2616,75]	2162,03 [1713,25; 3195,85]

Таблица 3. Диагностическая значимость определения уровня CYFRA 21-1 и рецепторов к цитокинам в крови пациентов с аденокарциномой в зависимости от риска опухолевой прогрессии

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
CYFRA 21-1, г/л, (10 ⁻⁶)	>2,7	67,6	73,3	75,7	64,7	0,685	70,1
CXCR1 гранулоциты, MFI	>43,0	62,2	66,7	69,7	58,9	0,632	64,2
CXCR2 лимфоциты, %	>15,5	64,9	70,0	72,7	61,8	0,649	67,2
Комбинация (Y1)	>0,512	91,9	90,0	91,9	90,0	0,859	91,0

Примечание. Здесь и в таблице 4: ПЗ — пороговое значение; ДЧ — диагностическая чувствительность; ДС — диагностическая специфичность; ПЦПР — прогностическая ценность положительного результата; ПЦОР — прогностическая ценность отрицательного результата; AUC — площадь под ROC-кривой; ДЭ — диагностическая эффективность.

Таблица 4. Диагностическая значимость определения уровня SCC и рецепторов к цитокинам в крови пациентов с ПКРЛ в зависимости от риска опухолевой прогрессии

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
SCC, г/л, (10 ⁻⁶)	>1,9	70,0	68,8	73,7	64,7	0,657	69,4
CXCR2 лимфоциты, %	>16,1	60,0	56,3	63,2	53,0	0,553	58,3
CD44v6 моноциты, %	>3,8	65,0	62,5	68,4	58,8	0,607	63,2
Комбинация (Y2)	>0,409	90,0	87,5	91,2	86,7	0,847	88,9

с аденокарциномой с низким риском развития опухолевой прогрессии составляет 91% (ретроспективное исследование) и 90% при вовлечении отобранных параметров крови в регрессионное уравнение. Для пациентов с высоким риском опухолевой прогрессии выживаемость к концу первого года после проведённого лечения составляет 54% и 53% соответственно. Для пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого данные показатели составили 85% и 84% в случае группы с низким риском развития опухолевой прогрессии, и 48% и 46% для группы с высоким риском развития опухолевой прогрессии.

Расчёт регрессионных уравнений демонстрирует стратификацию по безрецидивной выживаемости пациентов, начиная, приблизительно, с 1,5 месяцев после проведенного оперативного лечения, в то время как, согласно результатам ретроспективного исследования, различие по выживаемости наблюдается через 1 месяц. Вместе с тем, между кривыми безрецидивной выживаемости пациентов с АК и ПКРЛ, отнесённых по результатам вычисления $Y1$ и $Y2$, к группам высокого и низкого риска, имеется статистически достоверная разница (рис. 6). Она, по сути, повторяет графики Каплана-Майера, построенные по данным ретроспективного исследования как в зависимости от выраженности риска, так и в зависимости от гистологической формы НМКРЛ. То есть, и по данным расчёта регрессионных уравнений безрецидивная выживаемость пациентов с ПКРЛ ниже, чем с АК.

Полученные нами данные впервые демонстрируют возможность использования результатов комбинированного определения в сыворотке крови пациентов уровня CYFRA 21-1, SCC и рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6 для определения вероятности прогрессирования АК и ПКРЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги проведённого исследования дают основание рекомендовать комплекс лабораторных показателей, включающий уровни CYFRA 21-1, SCC и параметры рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6 для определения в крови пациентов с АК и ПКРЛ на ранних стадиях заболевания с целью оценки у них риска прогрессирования опухоли. В дальнейших исследованиях необходимо будет проверить жизнеспособность созданных моделей прогнозирования течения АК и ПКРЛ путём их валидации с использованием независимой выборки пациентов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансовая поддержка осуществлялась за счёт средств республиканского бюджета РБ (грант 2.7 ГПНИ “Медицина и фармация”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все пациенты дали письменное информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования “Белорусский государственный медицинский университет” №2 от 04.10.2021.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

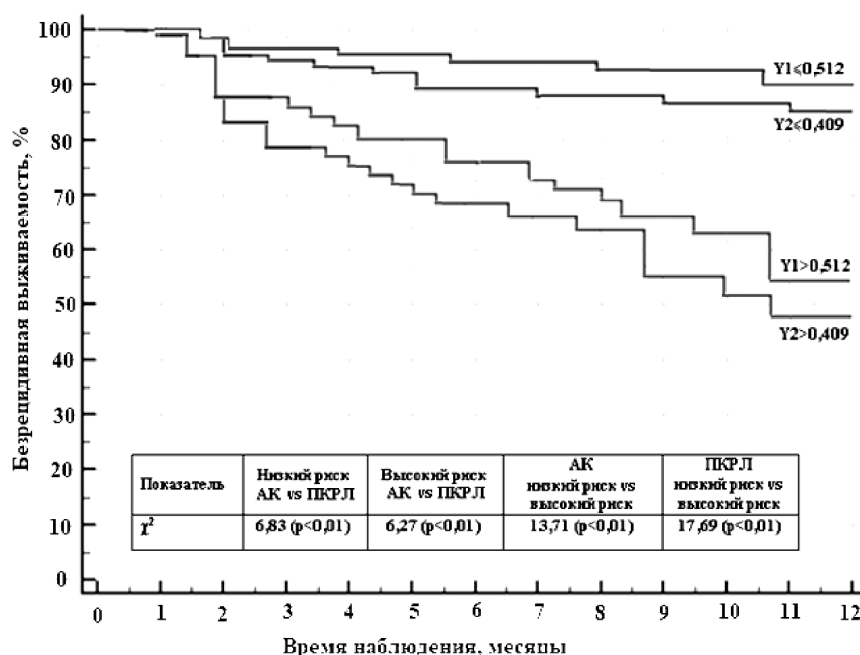


Рисунок 6. Безрецидивная выживаемость пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком лёгкого в зависимости от значений результата регрессионного уравнения $Y1$ и $Y2$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Clark S.B., Alsubait S. (2021) in: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved October 18, 2021, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562307/>
2. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. (2018) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016: Table 15.14 NonSmall Cell Cancer of the Lung and Bronchus (Invasive). National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2018 (<http://seer.cancer.gov/csr/2018>).
3. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. (2008) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD. (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008).
4. Zamay T.N., Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zukov R.A., Petrova M.M., Gargaun A., Berezovski M.V., Kichkailo A.S. (2017) *Cancers*, **9**(11), 155. DOI: 10.3390/cancers9110155.
5. Pujol J.L., Molinier O., Ebert W., Daurès J.P., Barlesi F., Buccheri G., Paesmans M., Quoix E., Moro-Sibilot D., Szturmowicz M., Bréchet J.M., Muley T., Grenier J. (2004) *Br. J. Cancer*, **90**(11), 2097-2105.
6. Nolen B.M., Langmead C.J., Choi S., Lomakin A., Marrangoni A., Bigbee W.L., Weissfeld J.L., Wilson D.O., Dacic S., Siegfried J.M., Lokshin A.E. (2011-2012) *Cancer Biomark.*, **10**(1), 3-12.
7. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. (2009) *Carcinogenesis*, **30**(7), 1073-1081.
8. Zhang W., Wang H., Sun M., Deng X., Wu X., Ma Y., Li M., Shuo S.M., You Q., Miao L. (2020) *Cancer Comm. (London, England)*, **40**(2-3), 69-80.
9. Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Прохорова В.И., Готько О.В., Державец Л.А., Мурашко Д.И. (2020) *Лаб. Диагн. Вост Евр.*, **9**(3), 252-271. [Tahanovich A.D., Kauhanka N.N., Prokhorova V.I., Got'ko O.V., Derzhavets L.A., Murashko D.I. (2020) *Lab. Diagn. Vost Yevr.*, **9**(3), 252-271.]
10. Li M., Zhan C., Sui X., Jiang W., Shi Y., Yang X., Feng M., Wang J., Wang Q. (2019) *Front. Oncol.*, **9**, 771. DOI: 10.3389/fonc.2019.00771
11. Tian S. (2017) *Oncol. Lett.*, **14**, 5464-5470.
12. Fukui T., Taniguchi T., Kawaguchi K., Fukumoto K., Nakamura S., Sakao Y., Yokoi K. (2015) *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **63**(9), 507-513.
13. Yasukawa M., Sawabata N., Kawaguchi T., Kawai N., Nakai T., Ohbayashi C., Taniguchi S. (2018) *In vivo (Athens, Greece)*, **32**(6), 1505-1512.
14. Hsu L.H., Chu N.M., Liu C.C., Tsai S.Y., You D.L., Ko J.S., Lu M.C., Feng A.C. (2009) *Lung Cancer*, **66**(2), 262-267.
15. Ettinger D.S., Wood D.E., Aisner D.L., Akerley W., Bauman J., Chirieac L.R., D'Amico T.A., DeCamp M.M., Dilling T.J., Dobelbower M., Doebele R.C., Govindan R., Gubens M.A., Hennon M., Horn L., Komaki R., Lackner R.P., Lanuti M., Leal T.A., Leisch L.J., Lilenbaum R., Lin J., Loo B.W., Martins R., Otterson G.A., Reckamp K., Rieley G.J., Schild S.E., Shapiro T.A., Stevenson J., Swanson S.J., Tauer K., Yang S.C., Gregory K., Hughes M. (2017) *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, **15**(4), 504-535.
16. Chansky K., Sculier J.P., Crowley J.J., Giroux D., van Meerbeeck J., Goldstraw P. (2010) *Clin. J. Lung Cancer*, **13**(1), 9-18.
17. Berardi R., Brunelli A., Tamburrano T., Verdecchia L., Onofri A., Zuccatosta L., Gasparini S., Santinelli A., Scartozzi M., Valeri G., Giovagnoni A., Giuseppetti G.M., Fabris G., Marmorale C., Fianchini A., Cascinu S. (2005) *Lung Cancer*, **49**(3), 371-376.
18. Lopez Guerra J.L., Gomez D.R., Lin S.H., Levy L.B., Zhuang Y., Komaki R., Jaen J., Vaporciyan A.A., Swisher S.G., Cox J.D., Liao Z., Rice D.C. (2013) *Ann. Oncol.*, **24**(1), 67-74.
19. 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.
20. Jiao Z., Cao S., Li J., Hu N., Gong Y., Wang L., Jin S. (2021) *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 686313. DOI: 10.3389/fmolb.2021.686313.
21. Nakamura H., Nishimura T. (2017) *Surg. Today*, **47**(9), 1037-1059.
22. Muley T., Rolny V., He Y., Wehnl B., Escherich A., Warth A., Stolp C., Schneider M.A., Dienemann H., Meister M., Herth F.J., Dayyani F. (2018) *Lung Cancer*, **120**, 46-53.
23. Matsuoka K., Sumitomo S., Nakashima N., Nakajima D., Misaki N. (2007) *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, **32**, 435-439.
24. Mizuguchi S., Nishiyama N., Iwata T., Nishida T., Izumi N., Tsukioka T., Inoue K., Uenishi T., Wakasa K., Suehiro S. (2007) *Lung Cancer*, **58**, 369-375.
25. Blankenburg F., Hatz R., Nagel D., Ankerst D., Reinmiedl J., Gruber C., Seidel D., Stieber P. (2008) *Tumour Biol.*, **29**(4), 272-277.

Поступила в редакцию: 18. 10. 2021.
После доработки: 15. 12. 2021.
Принята к печати: 20. 12. 2021.

**PREDICTING THE RISK OF TUMOR PROGRESSION IN PATIENTS
WITH EARLY STAGES OF ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL LUNG CARCINOMA
BASED ON LABORATORY PARAMETERS**

A.D. Tahanovich^{1}, N.N. Kauhanka¹, V.I. Prohorova², D.I. Murashka¹, O.V. Gotko²*

¹Belarusian State Medical University,

83 Dzerzhinsky ave., Minsk, 8220116, Republic of Belarus; *e-mail: ataganovich@gmail.com

²N.N. Alexandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology,
ag. Lesnoy, Minsk region, 223040 Republic of Belarus

Non-small cell carcinoma (NSCLC) prevails in the structure of the incidence of lung cancer. In patients with I stage NSCLC, only 60-70% overcome the 5-year survival barrier, and at II stage it decreases to 35-40%. The reason for such a high mortality rate is almost always a relapse of the disease. The main histological forms of NSCLC — adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCLC) — differ in the course, protocols and effectiveness of the treatment. Comparative survival data for AC and SCLC are controversial, and reliable biomarkers for determining the risk of tumor progression are lacking. In this study we have investigated the possibility of using laboratory parameters characterizing the level of some blood proteins involved in carcinogenesis in patients with early stages of AC and SCLC to determine the risk of disease progression. We retrospectively analyzed the duration of the relapse-free period after surgical treatment for one year in 1250 patients (816 with stages I and II of adenocarcinoma, G1-3 and 434 with early stages of SCLC, G1-3). In 81 patients with AC and 36 — with SCLC (stages I-II, G1-3) the level of CYFRA 21-1 and SCC by electrochemiluminescent method, chemokines CXCL5, CXCL8, TPA, pyruvate kinase M2, HIF-1 α and hyaluronic acid by enzyme immunoassay, receptors CXCR1, CXCR2, CD44v6 by flow cytometry were determined. Using the Kaplan-Meier graphical analysis, groups of low (stage I G1-2 + stage II G1) and high (stage I G3 + stage II G2-3) risk of tumor progression were identified. In the case of the one-year survival rate of patients with AC was higher than with SCLC. In patients with AC and a high risk of tumor recurrence, compared with a low one, the level of CYFRA 21-1, the mean intensity of fluorescence (MFI) of the CXCR1 receptor in granulocytes, and the relative content of the CXCR2 receptor in lymphocytes were higher. In the case of rapid progression of SCLC in patients, the relative content of the CXCR2 receptor in lymphocytes, the proportion of monocytes equipped with the CD44v6 receptor, and the SCC level were higher than with slow progression. Regression equations, including combinations of the above parameters (threshold value for AC — 0,512, for SCLC — 0,409, sensitivity — 91,9% and 90,0%, specificity — 90,0% and 87,5%, respectively), allow to predict the probability of tumor recurrence.

Key words: lung adenocarcinoma; squamous cell lung cancer; progression; blood biomarkers

Funding. The study was supported by the Republican Budget of the Republic of Belarus (grant 2.7 Scientific Program “Medicine and Pharmacy”).

Received: 18.10.2021, revised: 15.12.2021, accepted: 20.12.2021.