Мурашко Д.И., Таганович А.Д., Ковганко Н.Н.
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Murashka D., Tahanovich A., Kauhanka M.
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Компоненты оси HIF-1 α / рецептор CD44v6 / гиалуроновая кислота в крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Перспективы использования в диагностике

Components of the Axis HIF-1 α / Receptor CD44v6 / Hyaluronic Acid in the Blood of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Prospects of Use in Diagnostics

Резюме

Введение. Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) занимает второе место в структуре смертности вследствие онкологических заболеваний в Республике Беларусь. Он подразделяется на два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ). Поздняя диагностика существенно ухудшает прогноз течения этого заболевания, в связи с чем существует потребность в поиске информативных биомаркеров, позволяющих судить о распространенности опухолевого процесса, особенно на ранних стадиях НМКРЛ.

Цель. Изучить уровень CD44v6, HIF-1 α и гиалуроновой кислоты (ГК) в периферической крови пациентов с НМКРЛ с тем, чтобы оценить целесообразность его использования в диагностике НМКРЛ.

Материалы и методы. Материалом служила кровь 107 пациентов с ПКРЛ, 90 пациентов с АК, 14 человек с гамартомой легкого и 40 здоровых людей. Концентрацию ГК и HIF-1 α в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Относительное количество клеток лейкоцитарного ряда, снабженных рецептором CD44v6, и плотность его расположения в них (MFI) измеряли методом проточной цитометрии.

Результаты. Уровень ГК, HIF-1 α , доля моноцитов, содержащих CD44v6, и плотность расположения этого рецептора в гранулоцитах и лимфоцитах крови пациентов с АК и ПКРЛ значительно превышают таковые у здоровых людей и пациентов с гамартомой. Концентрация ГК в сыворотке крови выше у пациентов с большим размером опухоли, наличием метастазов в регионарные лимфоузлы и внутренние органы вне зависимости от гистологического типа НМКРЛ. Плотность расположения CD44v6 в лимфоцитах выше у пациентов с большим (>5 см) размером опухоли и метастазами во внутренние органы (M1) при обоих гистологических типах заболевания, а аналогичный показатель в гранулоцитах существенно возрастает при наличии регионарных метастазов НМКРЛ (N1–3). Концентрация ГК имеет коррелятивную связь со стадиями АК и ПКРЛ.

Измерение концентрации ГК в сыворотке крови пациентов позволяет дифференцировать I и II стадии НМКРЛ с чувствительностью 72,2% и специфичностью 99,2% для рассчитанного

порогового значения, а при выявлении III–IV стадий чувствительность составила 67,6%, специфичность – 81,2%.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, кровь, гиалуроновая кислота, HIF-1 α , CD44v6.

Abstract

Introduction. Non-small cell lung cancer (NSCLC) takes the second place in the structure of cancer morbidity in Belarus. It is classified into two main histological types: adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC). Late diagnosis significantly worsens the prognosis of this disease. That's why there is the need to search for available and informative biomarkers that let to assess the prevalence of NSCLC, especially its early stages.

Purpose. To study the level of CD44v6, HIF-1 α and hyaluronic acid (HA) in the peripheral blood of patients with NSCLC in order to assess the feasibility of its use in diagnostics of NSCLC.

Materials and methods. There were studied the blood samples of 107 patients with SCC, 90 patients with AC, 14 patients with lung hamartoma, and 40 healthy people. HIF-1 α and HA serum levels were determined with ELISA. The relative number of leukocytes supplied with CD44v6 and its density in the cells (MFI) were measured with flow cytometry.

Results. HIF-1 α and HA serum levels, relative number of monocytes and granulocytes, and MFI CD44v6 in granulocytes and lymphocytes of the blood of patients with AC and SCC are significantly higher than in healthy people and patients with lung hamartoma. HA serum level is higher in both AC and SCC patients with bigger tumor size ($T > 5$ cm), regional lymph node (N1–3) and distant metastases (M1). MFI CD44v6 in lymphocytes increases in both histological types of NSCLC in patients with $T > 5$ cm and distant metastases. At the same time, MFI CD44v6 in granulocytes is higher in AC and SCC patients with regional lymph node metastases. HA serum level has a medium strong correlation with AC and SCC TNM stages.

The cutoff value of HA serum level allows to differentiate the stages I and II of the NSCLC with 72.2% of diagnostic sensitivity and 99.2% of specificity. The same indicator can be used to determine the advanced stages of NSCLC (67.6% of sensitivity, 81.2% of specificity).

Keywords: non-small cell lung cancer, blood, hyaluronic acid, HIF-1 α , CD44v6.

■ ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире. В 2019 г. он занимал второе место в структуре онкологической заболеваемости в Республике Беларусь [1]. Наиболее частой его формой является немелкоклеточный рак (НМКРЛ), который в свою очередь подразделяется на аденокарциному (АК, 40% НМКРЛ), плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ, 30%) и крупноклеточный рак (9%) [2].

НМКРЛ характеризуется плохим прогнозом, обусловленным длительным отсутствием специфических проявлений и, соответственно, поздней диагностикой данного заболевания. Вместе с тем пятилетняя выживаемость пациентов с I стадией НМКРЛ составляет 73%. Она практически в два раза выше, чем у пациентов с впервые диагностированной II стадией заболевания [3, 4]. Показатель снижается еще сильнее по мере прогрессирования опухолевого процесса. Из пациентов с установленной IV стадией НМКРЛ выживает лишь 13% [3].

В настоящее время не существует информативных и специфичных биомаркеров, позволяющих выявить НМКРЛ, в особенности на ранних стадиях заболевания. Для верификации диагноза в сыворотке крови пациентов нередко определяется концентрация фрагмента цитокератина 19 (CYFRA 21-1) и антигена плоскоклеточной карциномы (SCC). Однако чувствительность этих тестов при НМКРЛ невысока и составляет 59% и 30% соответственно [5]. Сообщают об отсутствии их информативности при определении стадий заболевания [6].

Интенсивная пролиферация злокачественных клеток нередко сопровождается гипоксией в опухолевой ткани. В этих условиях активируется синтез транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1α), который в свою очередь активирует транскрипцию генов, продукты экспрессии которых регулируют жизнеобеспечение опухолевых клеток при недостатке кислорода [7]. Одним из эффектов, опосредуемых HIF-1α, является увеличение экспрессии некоторых вариантов адгезионного рецептора CD44, в частности CD44v6 [8]. Связывание с ним его основного лиганда – гиалуроновой кислоты (ГК) – приводит к активации матричной металлопротеиназы 9, участвующей в клеточной инвазии. Помимо этого, ГК и продукты ее деградации способны усиливать опухолевый рост и ангиогенез и без участия CD44v6 [9].

В литературе имеются данные об увеличенной экспрессии HIF-1α, ГК и CD44v6 в клетках НМКРЛ и их ассоциации с плохим прогнозом заболевания [9–11]. Рост уровня биомолекул в опухолевой ткани закономерно сопровождается выходом их из опухолевых клеток в кровь. Нельзя отвергнуть и продукцию компонентов оси HIF-1α/CD44v6/ГК клетками крови, которая может претерпевать изменения в условиях формирования и развития опухоли.

В литературе есть указания на увеличенную концентрацию HIF-1α и ГК в сыворотке крови пациентов со злокачественными новообразованиями, в частности у пациентов с раком молочной железы, носоглотки, а также положительную корреляцию их уровня со стадиями этих заболеваний и метастазированием в регионарные лимфоузлы [12, 13]. Ранее нами были опубликованы результаты определения CD44v6 в крови пациентов с НМКРЛ, в том числе при аденокарциноме, свидетельствующие о связи его уровня в клетках крови со стадиями и дескрипторами опухоли [14].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить уровень CD44v6, HIF-1α и ГК в периферической крови пациентов с АК и ПКРЛ, установить его взаимосвязь с дескрипторами опухоли с тем, чтобы определить эффективность использования этих показателей метаболизма в диагностике НМКРЛ.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 107 пациентов с ПКРЛ и 90 пациентов с АК при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019–2021 гг. Характеристика пациентов представлена в табл. 1. В качестве группы контроля обследовано 40 человек без проявлений заболевания в возрасте 43–67 лет.

Дополнительная группа сравнения включала 14 пациентов с гамартомой – доброкачественной опухолью легкого.

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

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 ГК, HIF-1α и SCC в сыворотке крови пациентов и здоровых людей использовали ИФА-наборы Fine Test (КНР), автоматический ИФА-анализатор Brio (Seac, Италия) и планшетный фотометр Sirio (Seac, Италия). Измерение оптической плотности стандартных разведений и образцов проводили при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм.

Относительное количество клеток крови, снабженных рецептором CD44v6, и плотность расположения этого рецептора в клетках крови

Таблица 1
Характеристика пациентов

Table 1
Patients' characteristics

Характеристика / Characteristics	ПКРЛ / SCC	АК / AC
Пол / Sex		
Женский	24	23
Мужской	83	67
Стадия / Stage		
I	21	24
II	41	27
III	41	29
IV	4	10
Размер опухоли / Tumor size		
T < 5 см / T < 5 cm	80	68
T > 5 см / T > 5 cm	27	22
Метастазы в регионарные лимфоузлы / Lymph node metastases		
N0	26	41
N1–3	81	49
Отдаленные метастазы / Distant metastases		
M0	95	78
M1	12	12
Grade		
G1	26	23
G2	51	37
G3	18	16

определялись 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: CD44v6 – FITC (Invitrogen, США), CD14-ECD (Elabscience, США), CD45 – Pacific Orange (Exbio, Чехия). Через 15 мин. инкубации в темноте к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VeraLyse (Beckman Coulter, Франция). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью фиксирующего раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, Франция).

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 (IBM, США) и MedCalc (США). Рассчитывались медиана 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 расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью характеристических кривых (ROC-анализ). В последующем вычисляли площадь под ROC-кривой (AUC, англ. Area Under Curve), на основании которой оценивали надежность определяемого показателя как потенциального биомаркера.

О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС) и диагностической эффективности (ДЭ) теста. Пороговое значение диагностического теста определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении ROC-кривых.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень определяемых показателей в крови пациентов с гамартомой легкого существенно не отличается от такового у здоровых людей. Концентрация CYFRA 21-1 значительно возрастает в сыворотке крови пациентов с АК и ПКРЛ уже на ранних (I–II) стадиях заболевания. Отмечается также значительный подъем уровня SCC в сыворотке крови пациентов с ПКРЛ, но не АК (табл. 2).

Концентрация ГК существенно увеличивается в сыворотке крови пациентов с I стадией НМКРЛ обоих гистологических типов и еще сильнее возрастает в поздний период. Уровень HIF-1α в сыворотке крови пациентов с ранними стадиями АК и ПКРЛ демонстрирует тенденцию к увеличению и существенно возрастает по сравнению с контрольной группой и пациентами с гамартомой легкого лишь на поздних стадиях заболевания.

Уже на I стадии АК и ПКРЛ интенсивность флуоресценции комплексов антитело/рецептор (MFI), характеризующая интенсивность экспрессии рецептора CD44v6 в гранулоцитах и лимфоцитах, демонстрировала тенденцию к повышению, а на II, III и IV стадиях заболевания была

Таблица 2
Уровень CD44v6, HIF-1α и ГК в крови пациентов с НМКРЛ

Table 2
CD44v6, HIF-1α and HA levels in the blood of patients with NSCLC

Показатель / Indicator	Контроль / Controls	Гамартома / Hamartoma	ПКРЛ (стадии) / SSC (stages)			АК (стадии) / AC (stages)		
			I	II	III-IV	I	II	III-IV
CD44v6, гранулоциты / granulocytes, %	3,3 [1,2; 4,2]	3,4 [1,9; 4,6]	3,7 [1,0; 4,5]	3,8 [1,9; 4,2]	3,9 [1,3; 6,6]	3,4 [2,4; 7,6]	5,0 * [3,8; 5,5]	6,1 * [2,8; 8,5]
MFI CD44v6, гранулоциты / granulocytes	1,6 [1,1; 2,1]	1,7 [1,6; 2,9]	2,5 [1,1; 2,8]	2,7 * [1,8; 2,8]	2,8 * [1,9; 2,7]	1,9 [1,4; 3,6]	2,5 * [2,4; 3,4]	2,8 * [1,7; 3,6]
CD44v6, лимфоциты / lymphocytes, %	1,0 [0,4; 1,9]	1,1 [0,4; 1,6]	1,6 [0,6; 4,3]	1,6 [1,2; 2,2]	1,6 [0,8; 2,4]	1,1 [0,5; 1,4]	1,2 [0,9; 1,3]	2,0 [1,9; 4,6]
MFI CD44v6, лимфоциты / lymphocytes	2,6 [2,4; 2,9]	2,8 [2,6; 3,1]	2,9 [1,6; 5,3]	3,3 * [2,9; 4,4]	3,9 * [1,8; 4,1]	3,0 [2,2; 4,9]	3,6 * [2,7; 4,5]	3,9 * [1,9; 4,6]
CD44v6, моноциты / monocytes, %	2,0 [1,6; 2,4]	2,2 [1,9; 3,4]	2,4 [1,6; 9,9]	3,2 [1,4; 3,7]	3,3 * [2,2; 9,7]	2,9 [1,8; 8,5]	3,3 * [1,9; 4,1]	3,9 * [1,3; 9,1]
MFI CD44v6, моноциты / monocytes	5,5 [4,6; 5,9]	5,5 [5,1; 5,8]	6,1 [2,1; 20,5]	6,2 [2,1; 14,5]	6,7 [2,1; 7,9]	5,6 [3,7; 7,8]	6,0 [3,2; 8,1]	6,8 [4,8; 9,5]
HIF-1α, нг/мл (ng/ml)	2,9 [2,7; 4,1]	2,9 [2,1; 4,1]	2,9 [2,2; 3,1]	3,1 [2,4; 4,3]	3,8 * [2,6; 4,4]	2,9 [2,2; 3,6]	3,3 [2,8; 3,5]	3,9 * [2,7; 5,3]
ГК/HA, нг/мл (ng/ml)	8,4 [7,1; 18,0]	9,3 [7,1; 18,0]	15,1 * [10,7; 31,1]	22,4 * [20,7; 40,5]	31,7 * [29,7; 43,3]	22,4 * [15,0; 24,6]	28,7 * [23,8; 32,2]	30,2 * [27,0; 33,6]
SCC, нг/мл (ng/ml)	1,2 [0,9; 1,7]	1,5 [0,9; 3,0]	2,1 [1,7; 4,2]	2,7 * [1,7; 5,9]	3,3 * [1,2; 6,6]	1,3 [0,9; 1,8]	1,7 [1,1; 2,2]	1,8 [0,9; 2,1]
CYFRA 21-1, нг/мл (ng/ml)	1,3 [1,2; 1,9]	1,3 [1,2; 2,9]	3,1 * [2,2; 4,6]	3,6 * [2,1; 5,9]	5,6 * [4,2; 12,3]	2,1 * [1,5; 4,3]	2,9 * [2,1; 3,8]	4,3 * [2,8; 7,2]

Примечания: * достоверность различия у пациентов с I, II и III-IV стадиями НМКРЛ по сравнению со здоровыми людьми; † достоверность различия у пациентов с гамартомой по сравнению с НМКРЛ; ‡ достоверность различия у пациентов с I стадией НМКРЛ по сравнению с другими стадиями; † достоверность различия у пациентов с III-IV стадиями НМКРЛ по сравнению со II стадией.

Notes: * significance of the difference in patients with I, II and III-IV stages of NSCLC in comparison with healthy people; † significance of the difference in patients with hamartoma in comparison with NSCLC; ‡ significance of the difference in patients with stage I in comparison with other stages; † significance of the difference in patients with stages III-IV of NSCLC in comparison with stage II.

существенно выше по сравнению с контрольной группой и пациентами с гамартомой. Только при АК доля гранулоцитов и моноцитов, снабженных рецептором CD44v6, значительно возрастает у пациентов со II стадией заболевания и в поздний период. Существенный подъем относительного количества моноцитов, содержащих CD44v6, отмечается и при ПКРЛ, но лишь на поздних его стадиях.

Для показателей, которые существенно отличались на ранних стадиях АК и ПКРЛ по сравнению со здоровыми людьми и пациентами с гамартомой, а также поздними стадиями, обнаруживается коррелятивная связь. В частности, для концентрации ГК, уровня CYFRA 21-1 имеется связь средней силы со стадиями заболевания (ПКРЛ: R – 0,518 и 0,469 соответственно; АК: R – 0,567 и 0,329 соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют об изменениях анализируемых показателей не только в зависимости от стадии заболевания, но и от дескрипторов опухоли. Как при АК, так и при ПКРЛ у пациентов с большим размером опухоли (T > 5 см) концентрация ГК в сыворотке крови существенно превышает таковую у пациентов с T < 5 см (табл. 3, 4). Значения этого же показателя значительно выше при наличии у пациентов с обоими гистологическими типами НМКРЛ метастазов в регионарные лимфоузлы (N1–3) и внутренние органы (M1) по сравнению с пациентами без метастазов. Только при АК уровень ГК значительно выше у пациентов с низкой степенью дифференцировки опухоли (G3) по сравнению со средней и высокой (G2, G1).

Доля гранулоцитов, снабженных CD44v6, существенно возрастает по мере снижения степени дифференцировки ПКРЛ, но не АК (табл. 3, 4). В то же время при АК отмечается существенное повышение уровня этого показателя в крови пациентов с отдаленными метастазами по сравнению с M0. MFI CD44v6 в лимфоцитах значительно возрастает как у пациентов с большим размером опухоли по сравнению с T < 5 см, так и при наличии отдаленных метастазов по сравнению с группой M0 вне зависимости от гистологического типа заболевания. Кроме того, только при АК этот показатель существенно увеличен у пациентов, имеющих метастазы в регионарные лимфоузлы (N1–3) по сравнению с N0. Аналогичным образом, но при обоих гистологических типах НМКРЛ изменяется MFI CD44v6 в гранулоцитах. Имеется коррелятивная связь средней силы анализируемых показателей с большинством вышеупомянутых дескрипторов опухоли (R>0,3).

Уровень CYFRA 21-1 в крови пациентов с большим размером опухоли выше по сравнению с группой T < 5 см при обоих гистологических типах НМКРЛ (табл. 3, 4). В то же время только при ПКРЛ у пациентов, имеющих отдаленные метастазы, концентрация этого антигена существенно больше, чем в группе M0. Отмечается коррелятивная связь средней силы уровня CYFRA 21-1 с этими дескрипторами опухоли, если судить по рассчитанным величинам коэффициента корреляции.

Таким образом, в изменениях анализируемых показателей существуют как общие закономерности, присущие обоим гистологическим типам НМКРЛ, так и индивидуальные особенности. К общим относятся значительное увеличение в сыворотке крови уровня ГК на I стадии заболевания и еще большее возрастание этого показателя в поздний период. На III–IV стадиях НМКРЛ при обоих гистологических типах

Таблица 3

Уровень CD44v6 и ГК в крови пациентов с ПКРЛ в зависимости от характеристик опухоли

Table 3

CD44v6 and HA levels in the blood of patients with SCC depending on tumor characteristics

Размер опухоли / Tumor size				
Показатель / Indicator	T <5 см / T <5 cm	T >5 см / T >5 cm	R	
MFI CD44v6, лимфоциты / lymphocytes	3,1* [1,8; 3,6]	4,4*# [2,1; 4,6]	0,306	
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	29,7* [21,6; 38,9]	31,1*# [28,5; 45,9]	0,358	
CYFRA 21-1, нг/мл / ng/ ml	3,7* [2,2; 5,9]	5,4*# [4,2; 12,3]	0,345	
Примечания: * здесь и далее: статистическая достоверность разницы у пациентов с ПКРЛ по сравнению со здоровыми людьми; # статистическая достоверность разницы у пациентов с размером опухоли <5 см и >5 см; R – коэффициент корреляции Спирмена.				
Notes: * here and after: statistical significance of difference in SCC patients in comparison with controls; # statistical significance of difference in patients with T < 5 cm in comparison with T > 5 cm; R – Spearman's correlation coefficient.				
Метастазы в регионарные лимфоузлы / Lymph node metastases				
Показатель / Indicator	N0	N1-3	R	
MFI CD44v6, гранулоциты / granulocytes	2,5* [1,5; 3,4]	3,9*# [2,7; 4,9]	0,303	
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	22,9* [14,5; 32,6]	31,7*# [24,3; 43,3]	0,407	
Примечание: # статистическая достоверность разницы у пациентов с наличием метастазов в регионарные лимфоузлы и пациентов без таковых.				
Note: # statistical significance of difference in patients with lymph node metastases in comparison with N0 patients.				
Отдаленные метастазы / Distant metastases				
Показатель	M0	M1	R	
MFI CD44v6, лимфоциты / lymphocytes	3,1* [1,5; 3,3]	4,1*# [2,9; 4,9]	0,452	
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	24,1* [20,3; 36,9]	31,7*# [29,7; 43,3]	0,339	
CYFRA 21-1, нг/мл / ng/ml	2,8* [1,6; 5,2]	5,9*# [1,7; 10,9]	0,323	
Примечание: # статистическая достоверность разницы у пациентов M1 по сравнению с M0.				
Note: # statistical significance of difference in patients with distant metastases in comparison with M0 patients.				
Степень дифференцировки опухоли / Grade				
Показатель	G1	G2	G3	r
CD44v6, гранулоциты / granulocytes, %	3,1 [1,7; 3,9] *	4,0 [1,2; 5,6] **	4,9 [3,8; 7,1] **§	0,261
Примечания: # статистическая достоверность разницы у пациентов со средней и низкой степенью дифференцировки опухоли по сравнению с высокой; § статистическая значимость разницы у пациентов с низкой и средней степенью дифференцировки опухоли.				
Notes: # statistical significance of difference in G2, 3 patients compared with G1; § statistical significance of the difference in the level in G2 and G3 patients.				

существенно выросла концентрация HIF-1 α и плотность расположения CD44v6 в лимфоцитах. Сходным образом при АК и ПКРЛ изменяется показатель MFI CD44v6 в лимфоцитах в зависимости от размера опухоли и наличия/отсутствия отдаленных метастазов, а MFI CD44v6 в гранулоцитах – в зависимости от наличия/отсутствия метастазов в регионарные лимфоузлы.

Согласно полученным результатам, существенное возрастание доли гранулоцитов и моноцитов, снабженных CD44v6, на II стадии НМКРЛ и в дальнейшем увеличение уровня MFI CD44v6 в лимфоцитах у пациентов с метастазами в регионарные лимфоузлы, возрастание доли гранулоцитов, снабженных этим рецептором, у пациентов с отдаленными метастазами и существенный рост уровня ГК в сыворотке крови пациентов с низкодифференцированной опухолью являются характерными чертами АК. Однако даже в случае АК доля гранулоцитов и моноцитов, снабженных CD44v6, и MFI CD44v6 в лимфоцитах не отличаются от контрольной группы и пациентов с гамартомой на I стадии заболевания и потому не могут быть информативными для диагностики его ранних стадий.

В дальнейшую оценку эффективности биохимических тестов были вовлечены показатели, уровень которых в крови продемонстрировал существенные отличия от пациентов с гамартомой и контрольной группы уже на I стадии заболевания и значительный рост в дальнейшем. Этому критерию соответствуют концентрация CYFRA 21-1 в сыворотке крови и уровень ГК, которые изменяются схожим образом при обоих гистологических типах НМКРЛ. Это дает основания для проведения дальнейшей оценки диагностической информативности этих показателей в общей группе пациентов с НМКРЛ.

Результаты ROC-анализа свидетельствуют, что значения концентрации ГК в сыворотке крови, превышающие 19,1 нг/мл, в 81,2% случаев соответствуют пациентам с I–II стадиями НМКРЛ (ДЧ) (табл. 5). Вместе с тем у 94,7% здоровых людей уровень этого биомаркера в сыворотке крови ниже упомянутого порогового значения (ДС). 67,6% пациентов с концентрацией в крови ГК >28,7 нг/мл имеют III–IV стадии заболевания при 81,2% вероятности истинно отрицательного результата.

Концентрация ГК статистически значимо увеличивается в сыворотке крови пациентов со II стадией НМКРЛ по сравнению с I стадией. Это единственный показатель из всех анализируемых, позволяющий различить I и II стадии НМКРЛ. Его значения выше 25,1 нг/мл, но ниже 28,7 нг/мл соответствуют II стадии заболевания у 72,2% пациентов со специфичностью 99,2%.

Концентрация CYFRA 21-1 в крови пациентов с I–II стадиями заболевания значительно превышает таковую здоровых людей. Наблюдается также существенный рост уровня в крови этого антигена на поздних стадиях НМКРЛ. 68,4% людей с концентрацией в сыворотке крови CYFRA 21-1, превышающей 2,8 нг/мл, имеют I–II стадии заболевания, в то время как уровень CYFRA 21-1 ниже этого порогового значения соответствует здоровым людям в 96,8% случаев. Концентрация этого биомаркера, превышающая 4,1 нг/мл, позволяет дифференцировать ранние и поздние стадии НМКРЛ с чувствительностью 79,2%.

Определение уровня ГК в сыворотке крови позволяет выявить ранние стадии НМКРЛ со значительно большей чувствительностью (81,2%),

Таблица 4

Уровень CD44v6 и ГК в крови пациентов с АК в зависимости от характеристик опухоли

Table 4

CD44v6 and HA levels in the blood of patients with SCC depending on tumor characteristics

Размер опухоли				
Показатель	T < 5 см	T > 5 см	R	
MFI CD44v6, лимфоциты / lymphocytes	3,2 * [1,4; 3,7]	3,9*# [2,9; 4,8]	0,311	
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	24,8* [23,7; 30,2]	33,6*# [32,2; 46,7]	0,438	
CYFRA 21-1, нг/мл / ng/ml	2.8 * [1,6; 4,3]	5,8 *# [2,5; 6,4]	0,303	
Примечания: * здесь и далее: статистическая достоверность разницы у пациентов с АК по сравнению со здоровыми людьми; # статистическая значимость разницы уровня у пациентов с размером опухоли <5 см и >5 см; R – коэффициент корреляции Спирмена.				
Notes: * here and after: statistical significance of difference in SCC patients in comparison with controls; # statistical significance of difference in patients with T< 5 cm in comparison with T > 5 cm; R – Spearman's correlation coefficient.				
Метастазы в регионарные лимфоузлы				
Показатель	N0	N1-3	R	
MFI CD44v6, гранулоциты / granulocytes	2,0* [1,8; 3,2]	2,9*# [2,7; 4,7]	0,313	
MFI CD44v6, лимфоциты / lymphocytes	3,1* [1,6; 3,9]	4,0*# [2,8; 4,6]	0,291	
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	25,1* [21,4; 28,7]	30,2*# [24,2; 33?3]	0,285	
Примечание: # статистическая достоверность разницы у пациентов с наличием метастазов в регионарные лимфоузлы и пациентов без таковых.				
Note: # statistical significance of difference in patients with lymph node metastases in comparison with N0 patients.				
Отдаленные метастазы				
Показатель	M0	M1	R	
CD44v6, гранулоциты / granulocytes, %	4,0* [1,7; 5,4]	5,1 *# [2,8; 7,2]	0,431	
MFI CD44v6, лимфоциты / lymphocytes	2,9* [1,4; 3,3]	4,5*# [2,8; 4,8]	0,452	
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	25,0* [23,4; 49; 5]	34,2*# [24,1; 46,6]	0,330	
Примечание: # статистическая достоверность разницы у пациентов M1 по сравнению с M0.				
Note: # statistical significance of difference in patients with distant metastases in comparison with M0 patients.				
Степень дифференцировки опухоли				
Показатель	G1	G2	G3	R
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	23,6* [21,3; 29,7]	32,4*# [28,7; 41,8]	43,3*#§ [31,7; 44,5]	0,307
Примечания: # статистическая достоверность разницы у пациентов со средней и низкой степенью дифференцировки опухоли по сравнению с высокой; § статистическая значимость разницы у пациентов с низкой и средней степенью дифференцировки опухоли.				
Notes: # statistical significance of difference in G2, 3 patients compared with G1; § statistical significance of the difference in the level in G2 and G3 patients.				

Таблица 5

Результаты ROC-анализа для существенно измененных показателей при НМКРЛ, коррелятивно связанных с характеристиками опухоли

Table 5

ROC analysis results for significantly altered parameters in NSCLC that correlate with tumor characteristics

Показатель	I-II ст. НМКРЛ / здоровые (I-II st. NSCLC / healthy people)				
	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	19,1	81,2	89,7	0,895	84,3
CYFRA 21-1, нг/мл / ng/ml	2,8	68,4	96,8	0,858	81,3
	I-II ст. НМКРЛ / III-IV ст. НМКРЛ (I-II st. NSCLC / III-IV st. NSCLC)				
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	28,7	67,6	81,2	0,765	76,2
CYFRA 21-1, нг/мл / ng/ml	4,1	79,2	68,4	0,768	80,6
	I ст. НМКРЛ / II ст. НМКРЛ (I st. NSCLC / II st. NSCLC)				
ГК, нг/мл / HA, ng/ml	25,1	72,2	99,2	0,849	84,4

нежели измерение CYFRA 21-1 (68,4%), однако ДС теста, напротив, несколько уступает таковой CYFRA 21-1 (89,7% и 96,8% соответственно) (табл. 5). В то же время определение в сыворотке крови уровня ГК при дифференцировании ранних и поздних стадий НМКРЛ, напротив, демонстрирует существенно большую специфичность (81,2%) и меньшую чувствительность (67,6%) в сравнении с CYFRA 21-1, благодаря чему значения их ДЭ сопоставимы друг с другом. Вместе с тем определение уровня ГК, как уже было отмечено, может использоваться для различия I и II стадий НМКРЛ, в отличие от CYFRA 21-1.

Результаты проведенного исследования показали, что ось HIF-1α/CD44v6/ГК является важным звеном патогенеза злокачественного роста и потенциально значимым компонентом в диагностике НМКРЛ, в особенности его ранних стадий. В первую очередь это относится к уровню ГК в сыворотке крови пациентов, определение которой позволяет не только выявить ранние стадии НМКРЛ и дифференцировать их от поздних, но и различить I и II стадии этого заболевания. На наш взгляд, это является чрезвычайно важной находкой в связи с отсутствием специфичных по отношению к НМКРЛ биомаркеров, которые можно было бы определить в крови пациентов. Немаловажной находкой является и то обстоятельство, что обнаруженные закономерности изменения уровня рецептора CD44v6 в клетках крови в зависимости от размеров опухоли, метастазирования, дифференцировки клеток более выражены, чем у концентрации в крови CYFRA 21-1. Поэтому они могут найти свое применение в качестве дополнительного диагностического инструмента.

■ ВЫВОДЫ

1. В крови пациентов с АК и ПКРЛ имеют место количественные изменения компонентов оси HIF-1α/CD44v6/ГК. Они отражают молекулярные события, связанные с ростом и развитием опухоли. Их сходство при обоих гистологических типах НМКРЛ заключается

в увеличении уровня ГК у пациентов уже на I стадии и значительном росте его на последующих стадиях, существенном подъеме HIF-1 α и плотности расположения CD44v6 в лимфоцитах, но только на поздних стадиях. Имеются также схожие изменения MFI CD44v6 в лимфоцитах и MFI CD44v6 в гранулоцитах в зависимости от размера опухоли и наличия/отсутствия отдаленных метастазов для первого и от наличия метастазов в регионарные лимфоузлы для второго показателя.

2. При АК, в отличие от ПКРЛ, значительно более выражен рост доли гранулоцитов и моноцитов, содержащих CD44v6, начиная со II стадии заболевания. Для пациентов с АК, имеющих метастазы в регионарные лимфоузлы, характерны также увеличение плотности расположения рецепторов CD44v6 в лимфоцитах и существенный подъем доли гранулоцитов, снабженных рецептором CD44v6, в зависимости от наличия/отсутствия отдаленных метастазов, а также увеличение в крови уровня ГК по мере снижения степени дифференцировки опухоли. Особенностью ПКРЛ является существенный подъем уровня SCC в сыворотке крови по мере прогрессирования заболевания; увеличение относительного количества гранулоцитов, содержащих CD44v6, у пациентов со средней и низкой степенью дифференцировки опухоли по сравнению с высокой степенью дифференцировки.
3. Концентрация ГК в сыворотке крови пациентов с НМКРЛ >19,1 нг/мл, но <28,1 нг/мл позволяет выявить ранние стадии заболевания с чувствительностью 81,2% и специфичностью 89,7% (ДЭ – 84,3%). Концентрация этого же параметра >19,1 нг/мл, но <25,1 нг/мл соответствует I стадии НМКРЛ с чувствительностью 72,2% и специфичностью 99,2% (ДЭ – 84,4%).

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование текста – А.Д. Таганович, сбор материала, обработка, написание текста – Д.И. Мурашко, Н.Н. Ковганко.

Authors' contribution: research concept and design, text editing – A. Taganovich, collecting material, processing, writing the text – D. Murashko, N. Kovganko.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Artemova N.A. (2021) Zabolevaemost' rakom legkogo y muzshin Respubliki Belarus' [Lung cancer morbidity in men of Republic of Belarus]. *Tezisy vneocherednogo XII sjezda onkologov i radiologov stran SNG i Evrasii im. Trapeznikova M.M., posvyashennogo -letiyu I sjezda ADIOR*, vol. 9, no 1, p. 437.
2. Maria Gabriela Raso (2007) Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 2, no 7, pp. 128–135.
3. Woodard G (2016) Lung cancer staging and prognosis. *Cancer Treat Res*, vol. 170, pp. 47–75. doi 10.1007/978-3-319-40389-2_3.
4. Wisnivesky J (2005) Prognosis of Stage II non-small cell lung cancer according to tumor and nodal status at diagnosis. *Lung Cancer*, vol. 49, no 2, pp. 181–186. doi: 10.1016/j.lungcan.2005.02.010.
5. Kagohashi K. (2008) A re-evaluation of squamous cell carcinoma antigen (SCC) as a serum marker for non-small cell lung cancer. *Medical Oncology*, vol. 25, pp. 187–189. doi: 10.1007/s12032-007-9021-3.

6. Alkotiyan K. (2010) CYFRA 21-1 as a tumor marker for follow-up of patients with squamous cell carcinoma of oropharynx. *Anticancer Res*, vol. 30, no 6, pp. 2291–2296.
7. Georgina N (2015) HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, vol. 5, no 5, pp. 378–389. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.
8. Krishnamachary B. (2012) Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1α in triple negative breast cancer. *PLoS One*, vol. 7, no 8, p. 44078. doi: 10.1371/journal.pone.0044078.
9. Pirinen R. (2001) Prognostic value of hyaluronan expression in non-small cell lung cancer: increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J of Cancer*, vol. 95, no 1, pp. 12–17.
10. Ioannou M. (2012) HIF-1α in lung carcinoma: histopathological evidence of hypoxia targets in patient biopsies. *J of Solid Tumors*, vol. 3, no 2, pp. 35–43. doi: 10.5430/jst.v3n2p35.
11. Chen C. (2018) The biology and role of CD44 in cancer progression therapeutic implications. *J Hematol Oncol*, vol. 11, no 1, p. 64. doi: 10.1186/s13045-018-0605-5.
12. Feng-Feng C. (2016) Prognostic value of plasma levels of HIF-1α and PGC-1α in breast cancer. *Oncotarget*, vol. 7, no 77793–77806. doi: 10.18632/oncotarget.12796.
13. Chen L. (2017) Clinical significance of serum hyaluronic acid level alteration in patient with nasopharyngeal carcinoma. *Biomedical Research-India*, special issue, pp. 469–472.
14. Tahanovich A. (2020) Vzaimosvyaz' kolichestvennykh kharacteristic CD44 v kletkah krovi s deskriptorami nemelkokletochnogo raka legkogo [Relationship of quantitative characteristics of cd44 in blood cells with descriptors of non-small-cell lung cancer]. *Oncologicheskij journal*, vol. 14, no 4, pp. 16–27.

Подана/Submitted: 09.06.2021

Принята/Accepted: 19.09.2021

Контакты/Contacts: sherstyanoyurovei@mail.ru