

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Гоуфман Е.И.¹, Яковлев В.Н.¹, Тихонова Н.Б.¹, Низяева Н.В.¹, Гершкович К.Б.², Айсина Р.Б.³, Ковалева О.В.⁴, Кушлинский Н.Е.⁴

КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ IGG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского» Министерства науки и высшего образования РФ, 117418, Москва, Россия;

²ФГБУН ИБХФ имени Н.М. Эмануэля РАН, 119997, Москва, Россия;

³МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119234, Москва, Россия;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

Представлены данные иммуноферментного исследования уровня продуктов деградации IgG со свободным C-концевым лизином (IgG-Lys) в сыворотке крови 46 здоровых доноров, 9 пациентов с доброкачественными новообразованиями легкого и 62 больных раком легкого на различных стадиях опухолевого процесса. Выявлено, что медиана IgG-Lys в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля значимо ниже, чем в группе больных раком легкого. Не отмечено различий в значениях IgG-Lys при злокачественных и доброкачественных опухолях легкого. Не выявлено связи значений IgG-Lys в сыворотке крови больных раком легкого с возрастом и полом пациентов, критериями системы TNM и стадией заболевания. Проведенный ROC-анализ показал значимую роль содержания IgG-Lys в диагностике рака легкого, чувствительность и специфичность метода составили соответственно 82% и 85%.

Ключевые слова: продукты деградации IgG; рак легкого; сыворотка крови.

Для цитирования: Гоуфман Е.И., Яковлев В.Н., Тихонова Н.Б., Низяева Н.В., Гершкович К.Б., Айсина Р.Б., Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е. Концентрация продуктов деградации IgG в сыворотке крови больных раком легкого. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (1): 32-35. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-1-32-35>

Для корреспонденции: Гоуфман Евгений Иосифович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. репродукции; e-mail: eugene_goufman@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 28.07.2022

Принята к печати 01.09.2022

Опубликовано 20.01.2023

Goufman E.I.¹, Iakovlev V.N.¹, Tikhonova N.B.¹, Nizyaeva N.V.¹, Gershkovich K.B.², Aisina R.B.³, Kovaleva O.V.⁴, Kushlinskii N.E.⁴

CONCENTRATION OF IGG DEGRADATION PRODUCTS IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH LUNG CANCER

¹A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of the Federal State Budgetary Scientific Institution «B.V. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery», 117418, Moscow, Russia;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics of the RAS, 119997, Moscow, Russia;

³M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234, Moscow, Russia;

⁴N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115522, Moscow, Russia

The data of enzyme immunoassay of the level of IgG degradation products with free C-terminal lysine (IgG-Lys) in the blood serum of 46 healthy donors, 9 patients with benign lung neoplasms and 62 patients with lung cancer at various stages of the tumor process are presented. It was found that the median of IgG-Lys in the blood serum of healthy donors in the control group was significantly lower than in the group of patients with lung cancer. There were no differences in IgG-Lys values in malignant and benign lung tumors. There were no differences in IgG-Lys values in malignant and benign lung tumors. There was no correlation between the values of IgG-Lys in the blood serum of patients with lung cancer and the age and gender of the patients, the criteria of the TNM system, and the stage of the disease. The ROC analysis performed showed a significant role of IgG-Lys content in the diagnosis of lung cancer; the sensitivity and specificity of the method were 82% and 85%, respectively.

Key words: IgG degradation product; lung cancer; blood serum.

For citation: Goufman E.I., Iakovlev V.N., Tikhonova N.B., Nizyaeva N.V., Gershkovich K.B., Aisina R.B., Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E. Concentration of IgG degradation products in the blood serum of patients with lung cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (1): 32-35 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-1-32-35>

For correspondence: *Goufman Egeniy Iosifovich*, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Reproduction Laboratory; e-mail: eugene_goufman@mail.ru

Information about authors:

Goufman E.I., <https://orcid.org/0000-0002-7468-7015>;
Iakovlev V.N., <https://orcid.org/0000-0002-0842-0005>;
Tikhonova N.B., <https://orcid.org/0000-0001-5437-6933>;
Nizyaeva N.V., <https://orcid.org/0000-0001-5592-5690>;
Gershkovich K.B., <https://orcid.org/0000-0002-5378-4713>;
Aisina R.B., <https://orcid.org/0000-0003-0172-517X>;
Kovaleva O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 28.07.2022

Accepted 01.09.2022

Published 20.01.2023

Введение. Связь между агрессивным ростом злокачественных опухолей и активностью протеолитических ферментов показана в целом ряде работ [1]. Агрессивность роста опухоли напрямую коррелирует с активностью плазмина, компонента активации протеолитического каскада плазминогена [2-4]. Повышенная активность плазмина в злокачественных опухолях способствует инвазии и метастазированию, при этом протеолиз окружающего матрикса приводит к освобождению места для дальнейшего злокачественного роста, метастазированию и растворению базальной мембраны [3, 5].

В предыдущих исследованиях сообщалось о потенциальной возможности использования продуктов протеолитической деградации в качестве биомаркеров злокачественных опухолей [6-8]. Однако на сегодняшний день данные о протеолитических продуктах в циркуляции, которые могут быть использованы для диагностики онкологических заболеваний, отсутствуют, поэтому поиск продолжается.

Известно, что плазминоген имеет лизин-связывающие центры, с помощью которых он может связываться с белками, имеющими свободный С-концевой лизин. Было показано, что после расщепления плазмином, образовавшиеся фрагменты IgG-Lys специфически взаимодействовали с плазминогеном через их С-концевой лизин [9-11]. Ранее мы продемонстрировали повышенный уровень IgG-Lys в плазме больных раком простаты по сравнению со здоровыми донорами [12]. В последующей работе нами было установлено, что повышенный уровень IgG-Lys обусловлен связыванием фрагментов IgG со свободным С-концевым лизином с тяжелой цепью плазминогена (PLG-H) [13]. Поскольку рак легкого также относится к солидным опухолям, в которых возможна повышенная протеолитическая активность, целью настоящей работы была проверка содержания IgG-Lys в сыворотке крови у больных с различными типами данного заболевания.

Материал и методы. В исследование включены 62 больных раком легкого и 9 больных с доброкачественными новообразованиями легкого, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процеду-

ры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника, получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей легкого (ВОЗ, 2021). Средний возраст больных раком легкого составил 59,7 (23-76) лет, пациентов с доброкачественными новообразованиями легкого 58,8 (51-72) лет. В группу контроля включили 46 практически здоровых доноров, которых обследовали в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, из них 28 (60,9%) мужчин и 18 (39,1%) женщин. Описание исследованной выборки больных раком легкого представлено в табл. 1.

Образцы сыворотки крови получены стандартным методом до лечения больных и хранились в течение 2 мес при -80°C до проведения исследования.

Определение уровня содержания IgG-Lys проводили с помощью коммерческого набора реактивов «Анти Плазминоген ИФА» (№ РЗН 2019/8345, ООО «Ангиоген») согласно инструкции производителя. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью многоканального спектрофотометра (Bio-Rad, Hercules CA, США) [14]. За значения IgG-LysK (коэффициент) принимали отношение оптической плотности исследуемого образца к значению оптической плотности cut-off. Значение оптической плотности cut-off вычисляли прибавляя к оптической плотности отрицательного контроля 30%. Значения коэффициента менее 1 считали отрицательными; от 1 до 1,15 – значения в серой зоне и более 1,15 – положительные значения.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrizm 9.0. Распределение значений исследуемого коэффициента значимо отличалось от распределения Гаусса, в связи с этим рассчитывали медиану и квартили. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Анализ информативно-

сти диагностического метода с помощью оценки его чувствительности и специфичности проводили путем построения ROC кривых и вычисления площади под ними (AUC). Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В табл. 2 представлены значения коэффициента IgG-LysK в контроле, у больных доброкачественными и злокачественными опухолями легкого.

Как следует из представленных данных, медиана показателя IgG-LysK в сыворотке крови здоровых доноров группы контроля значимо ниже, чем в группе больных раком легкого ($p < 0,0001$). При этом частота выявления отрицательных значений IgG-LysK в группе контроля равнялась 80,4%, а в группе больных 16,1%. Выявлена тенденция к различию медиан IgG-LysK в группе контроля и больных доброкачественными опухолями легкого ($p = 0,076$), тогда как различия медиан

маркера в группе больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями легкого были незначимы ($p = 0,54$). В группе больных доброкачественными опухолями легкого частота выявления отрицательных значений IgG-LysK составила 33,3%.

На следующем этапе исследования провели анализ значений IgG-LysK в зависимости от гистологического типа опухоли и клинико-морфологических характеристик. Результаты представлены в табл. 3.

Проведенный анализ показал, что значения IgG-LysK не зависят от клинико-морфологических характеристик рака легкого. Следует отметить, что наибольшее содержание исследуемых расщепленных иммуноглобулинов наблюдали при плоскоклеточном раке легкого. Также их содержание было выше при наличии отдаленных метастазов, однако, эти наблюдения не достигли статистической значимости (см. табл. 3).

На заключительном этапе исследования провели анализ информативности диагностического метода с помощью оценки его чувствительности и специфичности путем построения ROC кривых и вычисления площади под ними (AUC). Результаты представлены на рисунке.

ROC-анализ проведен как для рака легкого в целом, так и по отдельности для двух его самых распространенных гистологических вариантов, а именно аденокарциномы и плоскоклеточного рака. Для рака легкого в целом чувствительность данной методики составляет 82%, специфичность 85% (AUC – площадь под кривой 0,859 с 95% ДИ 0,786-0,932; cut-off–оптимальный порог отсечения 1,065; $p < 0,0001$). Для аденокарциномы легкого чувствительность теста составила 83%, специфичность 91% (AUC – площадь под кривой 0,881 с 95% ДИ 0,793-0,969; cut-off–оптимальный порог отсечения 1,315; $p < 0,0001$). Для плоскоклеточного рака

Таблица 1

Клинико-морфологические характеристики больных раком легкого

Клинико-морфологические характеристики	Число случаев (в %)
Возраст, годы:	
<60	35 (56%)
≥60	27 (44%)
Пол:	
Мужской	49 (79%)
Женский	13 (21%)
Гистология:	
Аденокарцинома	23 (37%)
Плоскоклеточный рак	29 (47%)
Смешанный рак	3 (5%)
Нейроэндокринные опухоли (НЭО)	7 (11%)
Стадия:	
I-II	32 (52%)
III-IV	30 (48%)
Размер опухоли (T):	
T1-T2	39 (63%)
T3-T4	23 (37%)
Наличие регионарных метастазов (N):	
N0	27 (44%)
N+	35 (56%)
Наличие отдаленных метастазов (M):	
M0	52 (84%)
M+	10 (16%)

Таблица 2

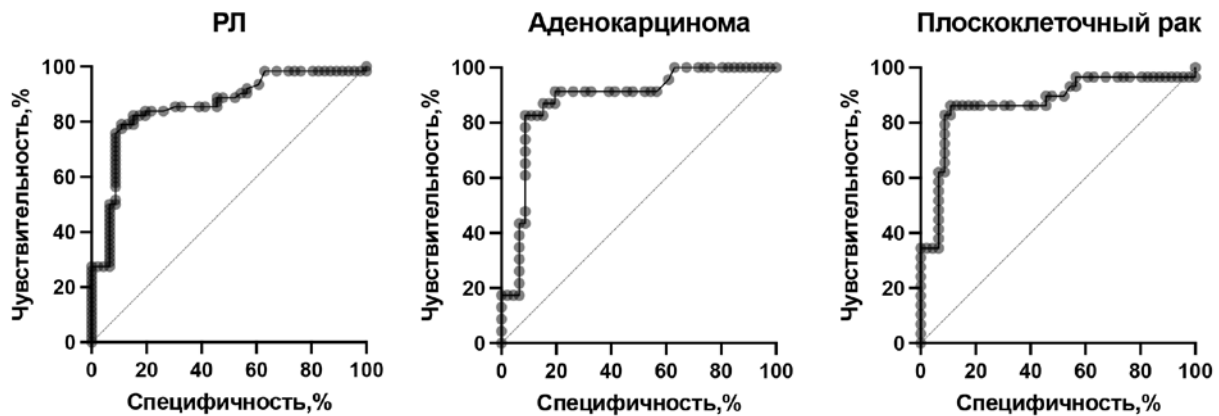
Статистический анализ содержания IgG-LysK в сыворотке крови больных доброкачественными и злокачественными опухолями легкого

Группы	Число наблюдений	IgG-LysK		
		Пределы колебания	Медиана; квартили	<i>p</i>
Контроль	46	0,27-3,4	0,78; 0,56-0,93	
Доброкачественные опухоли легкого	9	0,91-1,88	1,52; 0,94-1,81	0vs1=0,076 0vs2<0,0001 1vs2=0,54
Злокачественные опухоли легкого	62	0-10,82	1,95; 1,19-3,51	

Таблица 3

Статистический анализ содержания IgG-LysK в сыворотке крови больных раком легкого в зависимости от клинико-морфологических характеристик

Характеристика	IgG-LysK	
	Пределы колебания	Медиана; квартили
Гистология:		
Аденокарцинома	0,66-5,95	0,92; 1,5-2,75
Плоскоклеточный рак	0,0-10,82	2,36; 1,7-4,09
Смешанный рак	0,66-1,09	0,92; 0,66-1,09
НЭО	0,66-5,25	1,32; 0,85-3,86
Стадия:		
I-II	0,66-10,82	1,95; 1,35-3,72
III-IV	0,0-10,5	1,98; 1,14-3,08
Размер опухоли (T):		
T1-T2	0,66-8,14	1,96; 1,18-3,55
T3-T4	0,0-10,82	1,9; 1,19-3,5
Наличие регионарных метастазов (N):		
N0	0,66-10,82	1,94; 1,18-2,84
N+	0,0-10,5	2,04; 1,19-3,94
Наличие отдаленных метастазов (M):		
M0	0,66-10,82	1,93; 1,35-3,54
M+	0,0-5,95	2,43; 0,66-3,09



ROC-анализ для IgG-LysK у больных раком легкого.

легкого получены близкие результаты, а именно чувствительность составляла 83%, специфичность 91% (AUC – площадь под кривой 0,872 с 95% ДИ 0,779–0,965; cut-off–оптимальный порог отсечения 1,185; $p < 0,0001$). Как видно из представленных результатов, различий по ROC-анализу между группами плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого не выявлено, что свидетельствует в пользу использования данной методики для дополнительной верификации рака легкого в целом, а не для дифференциальной диагностики различных гистологических подтипов. Однако необходимо учитывать, что повышение показателя IgG-LysK в сыворотке крови наблюдается не только при раке легкого, но и при наличии других солидных опухолей, например, при раке простаты, что не позволяет использовать данную методику для дифференциальной диагностики онкологических заболеваний в целом.

Заключение. Таким образом, представленные нами данные сравнительного иммуноферментного исследования IgG-Lys в сыворотке крови здоровых доноров, пациентов с доброкачественными новообразованиями и раком легкого выявили, что содержание IgG-Lys в сыворотке крови больных раком легкого значительно выше, чем в группе здоровых доноров. У пациентов с доброкачественными новообразованиями легкого также наблюдали тенденцию к повышению содержания IgG-Lys. Не выявлено связи уровня IgG-LysK в сыворотке крови больных раком легкого с возрастом и полом пациентов, размером опухоли, наличием метастазов и стадией заболевания. Проведенный ROC-анализ показал значимую роль IgG-Lys в диагностике рака легкого, чувствительность и специфичность метода составили 82% и 85% соответственно, что свидетельствует о хорошем качестве модели и требует продолжения исследований.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-14 см. REFERENCES)

1. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Ассоциированные с опухолью протеазы и их тканевые ингибиторы. В кн.: Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования. Кушлинский Н.Е., Красильников М.А., ред. М.: Издательство РАМН; 2017: 197–230.

REFERENCES

1. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S. Biological markers of tumors: fundamental and clinical research. In book: Biological markers of tumors: fundamental and clinical research. Kushlinskii N.E., Krasil'nikov M.A., eds. Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2017: 197–230. (in Russian)
2. Andreassen P.A., Egelund R., Petersen H.H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57(1):25–40.
3. Pepper M.S. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator–Plasmin Systems in Angiogenesis. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21(7):1104–17.
4. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2(3):161–74.
5. Danø K., Behrendt N., Høyer-Hansen G., Johnsen M., Lund L.R., Ploug M., Rømer J. Plasminogen activation and cancer. *Thromb. Haemost.* 2005; 93(4):676–81.
6. Harpel P.C., Sullivan R., Chang T.S. Binding and activation of plasminogen on immobilized immunoglobulin G. Identification of the plasmin-derived Fab as the plasminogen-binding fragment. *J. Biol. Chem.* 1989; 264(1):616–24.
7. van Winden A.W., van den Broek I., Gast M.C., Engwegen J.Y., Sparidans R.W., van Dulken E.J., Depla A.C., Cats A., Schellens J.H., Peeters P.H., Beijnen J.H., van Gils C.H. Serum Degradome Markers for the Detection of Breast Cancer. *J. Proteome Res.* 2010; 9(8):3781–8.
8. Grozdanić M., Vidmar R., Vizovišek M., Fonović M. Degradomics in Biomarker Discovery. *Proteom. Clin. Appl.* 2019; 13(6):e1800138.
9. Morgan E.L., Hugli T.E., Weigle W.O. Isolation and identification of a biologically active peptide derived from the CH3 domain of human IgG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1982; 79(17):5388–91.
10. Brezski R.J., Jordan R.E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: An evasion tactic against host immunity? *MAbs.* 2010; 2(9):212–20.
11. Aisina R.B., Mukhametova L.I., Gershkovich K.B., Yakovlev V.N., Goufman E.I., Tikhonova N.B. Effect of Specific Cleavage of Immunoglobulin G by Plasmin on the Binding and Activation of Plasminogen. *J. Bioorganic Chem.* 2018; 44:210–6.
12. Goufman E.I., Iakovlev V.N., Tikhonova N.B., Lokshin A.E. Quantification of autoantibodies to plasminogen in plasma of patients with cancer. *Cancer Biomark.* 2015; 15(3):281–7.
13. Lokshin A., Mikhaleva L.M., Goufman E.I., Boltovskaya M.N., Tikhonova N.B., Stepanova I.I., Stepanov A.A., Potoldykova N.V., Vinarov A.Z., Stemmer P., Iakovlev V. Proteolyzed Variant of IgG with Free C-Terminal Lysine as a Biomarker of Prostate Cancer. *Biology.* 2021; 10(8):817.
14. Goufman E.I., Yakovlev V.N., Tikhonova N.B., Aisina R.B., Yarygin K.N., Mukhametova L.I., Gershkovich K.B., Gulín D.A. Autoantibodies to Plasminogen and Their Role in Tumor Diseases. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021; 158(4):493–6.