



Д.В. Бурцев

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ СКРИНИНГА РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

Государственное бюджетное учреждение Ростовской области

«Областной консультативно-диагностический центр»

Россия, 344010, г. Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127. E-mail: info@rokdc.ru

Цель: проведение сравнительного анализа серологических и эпигенетических методов скрининга рака толстой кишки для создания адекватных скрининговых и диагностических алгоритмов по выявлению колоректального рака.

Материалы и методы: обследованы 204 больных, у которых рак толстой кишки был выявлен при проведении скрининговых мероприятий. Контрольную группу составили 56 здоровых людей. Скрининговые мероприятия объединяли следующие методики: иммунохроматографический тест кала на скрытую кровь, определение онкомаркеров в крови (раковоэмбрионального антигена, онкоантигенов СА 19-9, СА 242), метилированной ДНК гена септина 9 в крови. Методом ROC-анализа определяли диагностическую значимость тестов и их комплексирования.

Результаты: диагностическая эффективность скрининга рака толстой кишки путем определения уровней в крови РЭА, СА 242 и СА 19-9 составляет, соответственно, 40,4%, 50,8% и 51,7%. Эпигенетический тест на наличие метилата ДНК гена SEPT9 в крови как скрининговая методика характеризуется более высокой диагностической чувствительностью - 85,3%.

Заключение: на начальном этапе скрининга рака толстой кишки оптимальным сочетанием методов является комбинация иммунохимического теста на скрытую кровь в кале при пороге 100 нг/мл, определения наличия метилата ДНК гена SEPT9 в крови.

Ключевые слова: рак толстой кишки, скрининг, эпигенетический тест, онкомаркеры, диагностическая чувствительность.

D.V. Burtsev

COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFICIENCY OF SEROLOGICAL SCREENING METHODS FOR EPIGENETIC AND COLON CANCER

Regional Consultative-Diagnostic Center

127 Pushkinskaya St., Rostov-on-Don, 344010, Russia. E-mail: info@rokdc.ru

Purpose: Comparative analysis serologic screening techniques of epigenetic and colon cancer for adequate screening and diagnostic algorithms for detection of colorectal cancer.

Materials and methods: Surveyed 204 patients whose colon cancer was detected in screening activities. A control group consisted of 56 healthy people. Screening measures unite following techniques: Immunochromatographic fecal occult blood, determination of tumor markers in the blood (carcinoembryonic antigen, oncoantigens CA 19-9, CA 242), methylated DNA gene septins 9 in the blood. The ROC-analysis determined the significance of diagnostic tests and their aggregation.

Results: Diagnostic efficacy of colon cancer screening by blood levels of CEA, CA 242 and CA 19-9, respectively, 40,4%, 50,8%, 51,7%. Epigenetic testmetilat DNASEPT9of blood as screening method is characterized by a high diagnostic sensitivity-85,3%.

Summary: At the initial stage of colon cancer screening method is a combination of the optimal combination of immunochemical test for the occult blood in feces in the threshold of 100 ng/ml, metilat DNA detection of SEPT9 gene in the blood.

Keywords: colon cancer, screening, epigenetic test, tumour markers, diagnostic sensitivity..



Введение

Неуклонный рост заболеваемости и высокий уровень смертности больных раком толстой кишки, поздняя диагностика заболевания, низкая резектабельность являются причинами неудовлетворительных показателей выживаемости у данной категории пациентов [1]. По общемировой статистике в последние пять десятилетий в структуре онкологической заболеваемости колоректальный рак прочно удерживает 3-4 место [1]. В Российской Федерации распространенность заболеваний ободочной кишки значительна и достигает 32 случая на 100 тысяч населения, из них 11,3 случаев приходится на колоректальный рак [2]. Тревожным является тот факт, что на 100 новых больных раком ободочной и прямой кишки приходится более 70 умерших, из них на 1-м году с момента установления диагноза около 40% [3]. Данное обстоятельство обусловлено тем, что при первичном обращении пациентов к врачу запущенные формы рака (III-IV стадии) диагностируются у 71,4% больных раком ободочной кишки и у 62,4% в случаях заболевания раком прямой кишки [4].

Выходом из сложившейся ситуации является организация и широкое внедрение в практику скрининговых программ по раннему выявлению рака толстой кишки. Под скринингом рака понимают применение различных методов исследования, позволяющих диагностировать опухоль на ранней стадии, когда еще нет симптомов болезни [5]. Целью скрининга является раннее активное выявление бессимптомного рака и его лечение [6]. К сожалению, уровень скрининга в странах с высоким риском колоректального рака, включая Россию, остается низким. Ошибки на догоспитальном этапе диагностики колоректального рака, несмотря на впечатляющий арсенал диагностических возможностей, достигают 87,8% [6]. Видимо, проблема заключается в отсутствии системности и достаточной кратности использования диагностических инноваций [7]. Чаще всего для неинвазивного скрининга онкологического заболевания, в том числе и рака толстой кишки, используют серологические методы исследования по определению онкомаркеров [8]. Между тем, эпигенетические методы определения метилированной ДНК гена SEPT9 могут помочь в организации молекулярного скрининга колоректального рака [9]. Ген SEPT9 кодирует синтез белка septin-9. Метилирование ДНК этого гена прекращает его активную работу и «выключает» синтез белка-супрессора ракового роста [9]. Повреждение экспрессии гена SEPT9 ассоциировано с развитием колоректального рака [10]. В связи с появлением новых возможностей, необходимость разработки логических схем, имеющих своей целью оптимизацию каждого этапа скрининга и диагностического процесса в выявлении рака толстой кишки, очевидна.

Целью работы - проведение сравнительного анализа серологических и эпигенетических методов скрининга рака толстой кишки для создания адекватных скрининговых и диагностических алгоритмов по выявлению колоректального рака.

Материал и методы

В исследование включено 1669 пациентов, обследованных в ГБУ РО «Областной консультативно-диагностический центр» г.Ростова-на-Дону по системе скрининга, и 213 больных, которые самостоятельно обратились в специализированные онкологические учреждения с кишечными либо общими системными жалобами. Основную группу пациентов составили 204 больных, у которых рак толстой кишки был выявлен при проведении скрининговых мероприятий у 1669 пациентов и далее подтвержден с помощью фиброколоноскопии с гистологическим исследованием биоптатов. В группе скрининга клинических проявлений заболевания не было, жалоб на дисфункцию толстой кишки пациенты не предъявляли. Контрольную группу составили 56 здоровых людей, у которых отсутствовала патология желудочно-кишечного тракта, что было доказано с помощью эндоскопических методов исследования. От всех пациентов получали письменное информированное согласие для участия в исследовании.

Скрининговые мероприятия на начальном этапе объединяли следующие методики: иммунохроматографический тест кала на скрытую кровь (СКК), определение онкомаркеров в крови (раковоэмбрионального антигена, онкоантигенов СА 19-9, СА 242), метилированной ДНК гена септина 9 в крови. Из перечисленных методик определение метилированной ДНК гена септина 9 в крови находится на стадии апробации в ряде зарубежных клиник (США, Швейцария) [10], в 2012 году было внедрено в лабораторию ГБУ Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр» и до момента настоящего исследования не использовалась ни в одной из российских клиник.

В основной группе мужчин было 99 (48,5%), а женщин – 105 (51,5%). В контрольной группе число мужчин было 31 (55,4%), а женщин – 25 (44,6%). Средний возраст пациентов основной группы составил $61,4 \pm 1,56$ года, а в контрольной группе $58,7 \pm 1,23$ лет.

Распределение больных раком толстой кишки основной группы с учетом классификации TNM отражено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение больных раком толстой кишки основной и контрольной групп с учетом классификации TNM

Стадии TNM	Основная группа	
	абс.	%
T1N0M0	21	10,3
T2N0M0	141	69,1
T3N0M0	24	11,8
T3N1M0	12	5,9
T3N2M0	6	2,9
Всего	204	100,0

Опухоли больных раком толстой кишки имели различную глубину инвазии в кишечную стенку. В основной группе прорастание слизистого и подслизистого слоев (T1) наблюдали у 21 (10,3%) больного, вращение



опухоли в мышечную оболочку (T2) - у 141 (69,1%) пациентов, прорастание всех слоев стенки кишки (T3) – у 42 (20,6%) больных. Наличие регионарных метастазов в периколярных лимфоузлах (N1-N2) отмечено у 18 (8,8%) пациентов.

При гистологическом исследовании биопсийного материала у всех больных были диагностированы аденокарциномы толстой кишки различной степени дифференцировки: низкая – 24 (11,8%), средняя – 138 (67,6%) и высокая – 42 (20,6%).

Анализ частоты различных локализаций рака толстой кишки у больных основной группы показал, что чаще других локализаций выявлялся рак сигмовидной (25,5%) и прямой кишки (21,6%). На третьем и четвертом месте по встречаемости были злокачественные новообразования поперечной ободочной (11,3%) и слепой кишки (10,8%).

Анализ кала на скрытую кровь проводили с помощью иммунохроматографического теста (Hexagon OBTI). Для заключения о наличии крови в кале использовали предел количества гемоглобина в кале в 50 нг/мл и 100 нг/мл. Определение онкомаркера раковоэмбрионального антигена (РЭА) в крови базировалось на принципе твердофазового ферментносвязанного иммуносорбентного теста с использованием набора DRG CEA ELISA (США). Определение уровней онкоантигенов СА 19-9 и СА 242 в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом (ELISA) с использованием соответствующих наборов Calbiotech CA19-9 ELISA ИФА (США) и Calbiotech CA 242 ELISA ИФА (США). Качественный анализ наличия метилата гена SEPT9 в крови проводили, используя протокол EpiProColon теста (EpigenomicsAG, Berlin, Germany) для ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном време-

ни выполнена на амплификаторе (RocheAppliedScience, Indianapolis, Indiana).

Фиброколоноскопия (ФКС) выполнялась с использованием видеотелеинформационных систем V-70, EVIS EXERA и EVIS EXERA-2 «OLYMPUS» (Япония), оснащенных видеокколоноскопами. При этом по показаниям при выявлении патологических объектов применяли, кроме стандартной, магнификационную эндоскопию с использованием видеокколоноскопа CF-180AI с функцией 74-х электронного увеличения без потери качества, что делало возможным различать мельчайшие структуры слизистой и позволяло проводить исследование близкое по качеству к микроскопическому, а также узкоспектральную эндоскопию с помощью видеокколоноскопов «180» для коррекции изображения. При проведении колоноскопии прицельно забирали биоптаты толстой кишки для последующего гистологического исследования. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, проводили световую микроскопию.

Для расчета чувствительности, специфичности, эффективности (точности) диагностических тестов, нахождения диагностической точки разделения использовали ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic). Значения площади под ROC-кривыми (AreaUnderCurve, AUC) позволяли оценить качество диагностических тестов. ROC-анализ проводили с помощью программы MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты и обсуждение

Параметры ROC-анализа диагностической значимости изучаемых методов скрининга рака толстой кишки представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели ROC-анализа диагностической значимости методов начального этапа скрининга рака толстой кишки

Метод скрининга	ДЧ	ДС	ДЭ	AUC	z-статистика, р
Тест на скрытую кровь при пороге 50 нг/мл	41,9	94,9	93,1	0,613±0,0132	z=2,4 p=0,04
Тест на скрытую кровь при пороге 100 нг/мл	63,0	91,1	90,1	0,645±0,0241	z=2,9 p=0,02
СА19-9	27,9	87,5	51,7	0,602±0,0324	z=1,2 p=0,13
СА 242	41,7	83,9	50,8	0,632±0,0658	z=5,0 p=0,0001
РЭА	48,0	87,5	40,4	0,746±0,0468	z=5,2 p=0,0001
SEPT9 крови	85,3	91,1	86,5	0,821±0,0287	z=5,13 p=0,0000

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДЭ – диагностическая эффективность, AUC – площадь под ROC-кривой, Z-статистика – критерий достоверной значимости теста при достоверной вероятности р.

Низкая диагностическая чувствительность отдельно для использования скрининговых методов была отмечена для онкомаркеров СА 19-9 (27,9%), СА 242 (41,7%), РЭА (48%), теста на скрытую кровь в кале при пороговом значении гемоглобина 50 нг/мл (41,9%). Диагностическая

чувствительность теста на скрытую кровь в кале у пациентов для выявления рака толстой кишки при уровне 100 нг/мл возросла до 63%. Наиболее перспективной скрининговой методикой был тест на наличие в крови метилированной ДНК гена SEPT9. Диагностическая



чувствительность этого теста составила 85,3%. Площадь под ROC-кривой эпигенетического теста имела высокое значение ($AUC=0,821\pm0,0287$) и статистически значимо ($p<0,05$) отличалась от аналогичных величин других методов начального этапа скрининга – анализа кала на скрытую кровь при пороговом значении 100 нг/мл ($0,645\pm0,0241$), определения уровня в крови онкомаркеров СА-19-9 ($0,602\pm0,0324$), СА 242 ($0,632\pm0,0658$), РЭА ($0,746\pm0,0468$).

Среди больных основной группы при I стадии заболевания положительный результат теста на метилат ДНК гена SEPT9 в крови был выявлен у 34 (75,6%), II стадии – у 123 (87,2%), III стадии – у 17 (94,4%) пациентов. Чувствительность эпигенетического теста при I стадии была 75,6%, II стадии – 87,2%, III стадии – 94,4%. Таким образом, диагностическая значимость эпигенетического теста на ранних стадиях колоректального рака была высокой. С повышением стадии рака толстой кишки от I к III чувствительность изучаемого теста повышалась.

Результаты EpiProColon теста не зависели от локализации рака толстой кишки. В труднодоступных местах толстой кишки, где при фиброколоноскопии существуют определенные затруднения для выявления опухоли, положительные результаты теста выявлялись в 83,3–100%.

Таким образом, определение в крови метилированной ДНК гена SEPT9 эффективно при ранних стадиях рака толстой кишки, а также при проксимальной локализации опухоли.

В результате исследования было выявлено, что диагностической точкой разделения РЭА, при превышении которой повышается вероятность выявления рака толстой кишки, была величина 11,9 нг/мл. При достижении этой величины чувствительность метода соответствовала 48%, а специфичность – 87,5%. Чувствительность изучаемого метода зависела от стадии заболевания. При I стадии чувствительность составила 20%, II стадии – 53,2% и III стадии 77,8%. У больных раком толстой кишки при распространении опухолевого процесса на лимфатические узлы уровень РЭА в крови возрастал практически вдвое ($p<0,001$) – $56,7\pm1,5$ нг/мл против $25,9\pm1,2$ нг/мл. Степень дифференцировки опухоли также прямо пропорционально влияла на уровень РЭА. После хирургического лечения в ранний послеоперационный период уровень РЭА в крови у больных достоверно снижался ($p<0,001$) с $26,8\pm1,9$ нг/мл до $8,3\pm0,8$ нг/мл. В отдаленный период наблюдения содержание онкоантигена в крови зависело от наличия рецидива или метастазов заболевания. При прогрессировании опухолевого процесса уровень РЭА статистически значимо возрастал до $72,1\pm1,7$ нг/мл. У больных без рецидивов заболевания через 3 года после операции уровень РЭА был значительно ниже – $15,8\pm0,6$ нг/мл. Таким образом, для выявления рака толстой кишки диагностическая чувствительность теста по оценке уровня РЭА в крови была недостаточной. Однако уровень РЭА крови отражает степень распространенности опухолевого процесса, его серийное определение в послеоперационный период хирургического лечения рака толстой кишки позволяет предположить рецидив заболевания при многократном повышении концентрации онкоантигена в крови.

На следующем этапе у больных скрининговой группы изучали эффективность определения в крови карбогидрат-антигена СА-242. Изучение ROC-кривых показало, что диагностической точкой разделения СА-242, при превышении которой повышается риск наличия рака толстой

кишки, была концентрация 23 Е/мл. При достижении этой величины чувствительность метода соответствовала 41,7%, а специфичность – 83,9%. При верхней границе нормы 15 Е/мл чувствительность теста была крайне низкой, а специфичность – высокой, что привело бы при соблюдении такой точки разделения к гиподиагностике. Диагностическая чувствительность метода определения СА 242 в крови повышалась при III стадии заболевания. При I стадии диагностическая чувствительность составила 33,3%, II стадии – 43,3% и III стадии – 50%. У больных раком толстой кишки при распространении опухолевого процесса на лимфатические узлы уровень СА-242 в крови возрастал незначительно ($p>0,05$) – с $34,7\pm2,1$ Е/мл до $41,7\pm1,5$ Е/мл. Степень дифференцировки опухоли не влияла на уровень СА-242 в крови. После хирургического лечения в ранний послеоперационный период уровень СА-242 в крови у больных снижался с $35,2\pm1,7$ Е/мл до $20,7\pm1,9$ Е/мл ($p<0,05$). В отдаленный период наблюдения при развитии метастазов содержание онкоантигена в крови возрастало в 4 раза до $80,5\pm1,6$ Е/мл. У больных без рецидивов заболевания через 3 года после операции уровень СА-242 достоверно не изменялся и составил $23,9\pm1,5$ Е/мл. Таким образом, только по определению СА-242 в крови скрининг рака толстой кишки является неэффективным. Концентрация СА-242 коррелировала со стадиями заболевания и отражала распространенность опухолевого процесса, что определяет целесообразность динамичного серийного учета СА-242 в крови после операции у больных раком толстой кишки.

На следующем этапе определяли диагностический уровень карбогидрат-антигена СА 19-9 в крови для выявления больных раком толстой кишки. Диагностической точкой разделения была концентрация СА 19-9 в 46 U/мл. При содержании СА 19-9 в 46 U/мл чувствительность и специфичность составили, соответственно, 27,9% и 87,5%. Диагностическая чувствительность метода определения СА 19-9 в крови составила при I стадии рака толстой кишки – 17,8%, II стадии – 27,6% и III стадии – 55,5%. У больных раком толстой кишки при распространении опухолевого процесса на лимфатические узлы повышенный уровень СА 19-9 в крови наблюдался в 88,9% и значительно возрастал по сравнению с больными без поражения лимфатических узлов – на 61,3%. Степень дифференцировки опухоли, как и в случае СА-242, не влияла на уровень СА 19-9 в крови. После хирургического лечения в ранний послеоперационный период уровень СА 19-9 в крови у больных снижался с $62,1\pm2,1$ U/мл до $44,1\pm2,5$ U/мл. В отдаленный период наблюдения при развитии у больных метастазов содержание онкоантигена в крови возрастало с $62,1\pm2,1$ U/мл до $86,3\pm2,3$ U/мл. У больных без рецидивов заболевания через 3 года после операции уровень СА 19-9 достоверно не изменялся и составил $47,2\pm1,9$ U/мл. Таким образом, самая низкая диагностическая эффективность в отношении скрининга рака толстой кишки была характерна для СА 19-9. Однако концентрация СА 19-9 изменялась сопряжено со стадией заболевания, уровень онкоантигена отражал распространенность опухолевого процесса на лимфатические узлы и повышался при развитии рецидивов и метастазов рака толстой кишки.

Низкая диагностическая эффективность серологических методов скрининга рака толстой кишки обуславливала необходимость исследования значимости их совместного определения для выявления колоректального



рака в комбинации с эпигенетическими опухолевыми маркерами.

Комплексное использование методов скрининга рака толстой кишки приводило к последовательному возрастанию их совместной диагностической ценности. Исключение составило сочетание определения онкогенов СА-242 и СА 19-9. При таком сочетании серологических методов скрининга диагностическая чувствительность не изменялась по сравнению с одиночным применением методов.

Эффективной программой начального этапа скрининга оказался комплекс методов, включающих анкетирование для выяснения наличия наследственной предрасположенности к заболеванию и факторов риска рака толстой кишки, иммунохроматографический анализ кала на скрытую кровь при пороговом значении 100 нг/мл и определение наличия метилата ДНК гена SEPT9 в крови (чувствительность 89,2%, специфичность 92,9%, эффективность 90%).

Таким образом, совокупность серологических и эпигенетических методов скрининга ввиду их высокой диагностической чувствительности и меньшей стоимости по сравнению с фиброколоноскопией могут выступать альтернативой эндоскопическому скринингу. Разработанные нами скрининговые программы включают неинвазивные тесты, доступные в выполнении как для обследуемого, так и для врача, обладающие оптимальным соотношением чувствительности и специфичности, эффективности и затратности. Кроме того, возрастание в крови уровней

исследуемых опухолевых маркеров поставляет дополнительную информацию о степени распространенности опухолевого процесса и, что особенно важно, об эффективности проведенного лечения. Периодическое исследование опухолевых маркеров после окончания лечения дает возможность заподозрить развитие рецидива опухолевого процесса раньше традиционно используемых в онкологии методов диагностики.

Выводы

Диагностическая эффективность скрининга рака толстой кишки путем определения уровней в крови РЭА, СА 242 и СА 19-9 составляет, соответственно, 40,4%, 50,8% и 51,7%.

Эпигенетический тест на наличие метилата ДНК гена SEPT9 в крови как скрининговая методика характеризуется более высокой диагностической чувствительностью 85,3%, диагностической специфичностью 91,1% и диагностической эффективностью 86,5% по сравнению с серологическими методами.

На начальном этапе скрининга рака толстой кишки оптимальным сочетанием методов является комбинация иммунохимического теста на скрытую кровь в кале при пороге 100 нг/мл, определения наличия метилата ДНК гена SEPT9 в крови. Диагностическая эффективность I этапа скрининга составляет 90%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мерабишвили В.М. Злокачественные новообразования в мире, России, Санкт-Петербурге. - СПб.: Коста, 2011. - 290 с.
2. Циммерман Я.С. Колоректальный рак: современное состояние проблемы // Вестник Северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. - 2012. - N 1. - С. 78-83.
3. Чалык Ю., Рубцов В. Методологические аспекты раннего выявления колоректальных новообразований // Врач. - 2011. - №13. - С. 22-24.
4. Солодкий В., Чхиквадзе В., Станоевич У., Дехисси Е. Ранняя диагностика колоректального рака // Врач. - 2012. - N 11. - С. 20-23.
5. Воробьев А.В., Протасова А.Э. Общие вопросы скрининга // Практическая онкология. - Т. 11, № 2 - 2010. - С. 53-59.
6. Егоренков В.В., Моисеенко Ф.В. Скрининг рака толстой кишки // Практическая онкология. - 2010. Т. 11, № 2. - Имянитов Е.Н. Высокопроизводительные молекулярно-генетические методы нового поколения в диагностике и лечении новообразований // Практическая онкология. - 2011. - Т. 12, № 4. - С. 194-202.
7. Пальцева Е.М., Самофалова О.Ю., Горбачева Ю.В., Царьков П.В. Молекулярно-биологические маркеры прогрессии рака толстой кишки // Архив патологии. - 2012. - № 2. - С. 14-18.
8. Akhtar-Zaidi B., Cowper-Sallari R., Corradin O., Saiakhova A. Epigenomic enhancer profiling defines a signature of colon cancer // Science. - 2012. - Vol. 336, № 6082. - P. 736-739.
9. Kondo Y., Issa J.P. Epigenetic changes in colorectal cancer // Cancer Metastasis Rev. - 2004. - Vol. 23. - P. 29-39.

ПОСТУПИЛА 07.01.2014