

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.06

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕТОДА НЕИНВАЗИВНОЙ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИКО-ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПУХОЛИ

© Г. М. Бутрович,¹ Е. Д. Мирлина,¹ В. Н. Вербенко,¹
И. Г. Хабарова,² О. А. Вострюхина^{1,*}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300, и

² Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022;

* электронный адрес: Vostrukhina_OA@pnpi.nrcki.ru

Частота встречаемости колоректального рака (КРР) и явная зависимость успешного излечения от его раннего обнаружения оправдывают разработку неинвазивных методов ранней диагностики КРР. Представлен анализ чувствительности метода неинвазивной ПЦР-диагностики КРР, основанного на целостности фекальной ДНК, в зависимости от клинико-патолого-анатомических характеристик опухоли. Чувствительность и специфичность метода в целом составили соответственно 76 и 100 % ($P < 0.0001$). Чувствительность метода не имеет значимых различий для пациентов с разными стадиями заболевания, что позволяет использовать его для ранней диагностики КРР. Чувствительность разработанного метода диагностики рака прямой кишки по сравнению с другими отделами кишечника достоверно выше — 85 против 62.5 % ($P = 0.0314$). Чувствительность анализируемого метода диагностики КРР при выявленном в опухоли некрозе составила 89, а в отсутствие некроза — 69 %; статистически значимых различий не выявлено ($P = 0.0562$), однако можно отметить выраженную тенденцию повышения чувствительности метода в случае некроза. Не выявлено значимых различий между чувствительностью метода для диагностики опухолей с эндофитным или экзофитным ростом опухоли ($P = 0.4087$). Полученные данные будут способствовать корректному использованию метода неинвазивной ПЦР-диагностики КРР в клинической практике.

Ключевые слова: неинвазивная диагностика, колоректальный рак, полимеразная цепная реакция, проксимальный и дистальный отделы, чувствительность

Принятые сокращения: КРР — колоректальный рак.

Несмотря на активную разработку новых методов лечения и диагностики колоректального рака (КРР), смертность от него по-прежнему остается очень высокой и составляет 10—13 % от общей смертности от онкологических заболеваний. Причина этого состоит прежде всего в том, что большинство случаев КРР (около 60 %) диагностируется на поздних стадиях, а выживаемость больных коррелирует со стадией, на которой заболевание было выявлено (Henley et al., 2010). Статистические данные в отношении КРР различаются между странами. В США общая пятилетняя выживаемость составляет 62 %, тогда как в Европе — 43 %. Причинами таких различий являются программы скрининга, проводимые в США и позволяющие выявить заболевание на более ранней стадии (García-Bilbao, 2012). Все это свидетельствует о настоятельной потребности поиска новых диагностических подходов для улучшения эффективности скрининговых программ раннего выявления КРР (Newton et al., 2012).

В нашем предыдущем исследовании (Бутрович и др., 2017) представлена разработка процедуры диагностики КРР на основе анализа целостности фекальной ДНК методом ПЦР-анализа. Для анализа использовали два протяженных фрагмента — участки генов *TP53* и *MLH1*. Чувствительность и специфичность предложенного метода составили соответственно 78 и 100 % ($P < 0.0001$). Чувствительность метода не различается в случае применения для пациентов с разными стадиями заболевания, что позволяет использовать его для ранней диагностики КРР.

В настоящем исследовании мы увеличили выборку пациентов и провели анализ чувствительности разработанного метода для разных отделов толстой кишки, а также в зависимости от клинико-патолого-анатомических характеристик опухолей (эндофитного либо экзофитного роста опухоли, наличия в ней некроза, степени дифференцировки опухоли). Увеличение выборки пациентов

Вероятность случайности, чувствительность, специфичность и предсказательные значения для различных клинико-патолого-анатомических характеристик опухоли

Параметры	Все пациенты	Локализация опухоли		Некроз		Направление роста опухоли	
		прямая кишка	остальные отделы толстой кишки	есть	нет	экзофитный	эндофитный
Вероятность (P) ^а	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0003
Чувствительность ^б	0.7595 0.6503—0.8486	0.8511 0.7171—0.9380	0.6250 0.4372—0.7890	0.8889 0.7082—0.9765	0.6863 0.5411—0.8087	0.7647 0.5010—0.9319	0.5455 0.2338—0.8325
Специфичность ^б	1.000 0.9404—1.000	1.000 0.8575—1.000	1.000 0.8575—1.000	1.000 0.8575—1.000	1.000 0.8575—1.000	1.000 0.8575—1.000	1.000 0.8575—1.000
Позитивное предсказательное значение ^б	1.000 0.9119—1.000	1.000 0.9119—1.000	1.000 0.8317—1.000	1.000 0.8575—1.000	1.000 0.9001—1.000	1.000 0.7531—1.000	1.000 0.5409—1.000
Негативное предсказательное значение ^б	0.5581 0.3989—0.7094	0.7742 0.5894—0.9040	0.6667 0.4905—0.8143	0.8889 0.7082—0.9765	0.6000 0.4331—0.7513	0.8571 0.6730—0.9597	0.8276 0.6420—0.9416

Примечание. ^а Представлены значения вероятности (P), определенной с использованием точного метода Фишера. ^б Представлены средние значения и 95%-ный доверительный интервал. Чувствительность — доля истинных положительных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом, специфичность — доля истинных отрицательных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом, позитивное предсказательное значение — доля истинно положительных результатов среди всех положительных значений теста, негативное предсказательное значение — доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных значений теста.

привело к изменению чувствительности метода — 78 против 76 %, что, впрочем, не выходит за пределы доверительного интервала.

Материал и методика

Определение целостности ДНК проводили по разработанной ранее методике (Бутрович и др., 2017). Образцы стула были получены у 103 человек, из них 79 пациентов с КРР и 24 здоровых добровольца (контрольная группа). Образцы стула пациентов были предоставлены хирургическим отделением ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Наличие или отсутствие опухоли было установлено методом колоноскопии. Для пациентов с КРР были предоставлены демографические данные, диагноз был подтвержден гистологически и получены клинико-патолого-анатомические данные опухолей. Выделение геномной ДНК производили с использованием набора ДНК-сорб-В фирмы АмплиСенс ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

ПЦР-анализ. С целью проверки успешности выделения ДНК и отсутствия ингибирования ПЦР предварительно проводили амплификацию двух коротких фрагментов длиной менее 200 н. п. из разных участков генома: фрагмент гена *TP53* длиной 141 н. п. и фрагмент гена *BLM* длиной 153 н. п. Для оценки целостности геномной ДНК методом ПЦР-анализа использовали два прототипных фрагмента: фрагмент гена *TP53* длиной 800 н. п. и фрагмент гена *MLN1* длиной 2340 н. п. Для визуализации полученных продуктов амплификации проводили одномерный электрофорез.

Статистический анализ. Для анализа данных использовали программу Graphpad InStat. Различия между группами считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Результаты статистической обработки полученных данных с помощью программы Graphpad InStat приведены в таблице. Для некоторых групп пациентов подсчитаны следующие параметры: P (определено с использованием точного метода Фишера), чувствительность, специфичность, позитивные и негативные предсказательные значения.

Локализация опухоли. Многими исследователями показано, что правосторонний и левосторонний рак толстой кишки имеет различную клиническую картину и биологические особенности и должен рассматриваться как два различных заболевания (Hussain et al., 2016). Наиболее часто встречается рак прямой кишки (38 %), далее следует рак сигмовидной (29 %), слепой (15 %) и поперечно-ободочной кишки (10 %). Только около 5 % злокачественных новообразований обнаруживается в восходящей ободочной кишке и 3 % — в нисходящей (Davies et al., 2005). Поэтому нам было важно понять, как зависит чувствительность разработанного нами метода диагностики КРР от локализации опухоли. Для получения статистически достоверного результата пришлось объединить данные по сигмовидной, слепой, поперечно-ободочной, восходящей ободочной и нисходящей ободочной кишкам. В нашей выборке встречаемость КРР, определенная методом колоноскопии в разных отделах, была следующей: прямая кишка — 59 %, остальные отделы толстой кишки — 41 %. В результате выяснилось, что чувствительность метода диагностики для прямой кишки по сравнению с другими отделами толстой кишки достоверно выше (см. таблицу) — 85 против 62.5 % ($P = 0.0314$). Это в определенной степени ожидаемый результат, принимая во внимания принцип действия рассматриваемого метода.

Неопластические клетки, которые отслаиваются от новообразований кишечника и выводятся наружу вместе с каловыми массами, характеризуются некорректно функционирующими апоптотическими механизмами, что по-

вышает их устойчивость к деградации и позволяет идентифицировать высокомолекулярные фрагменты ДНК (протяженные фрагменты ДНК более 500—700 н. п.) в фекалиях. В то же время клетки нормального эпителия, также отслаивающиеся в ходе постоянного обновления эпителиального пласта, в большей степени подвергаются разрушению, в результате в образцах стула выявляются лишь короткие (до 200 н. п.) фрагменты ДНК таких клеток (Young et al., 2011).

Однако очевидно, что происходящие из наиболее удаленных от анального отверстия отделов толстой кишки раковые клетки находятся в просвете кишечника существенно большее время, чем клетки из прямой кишки и, по-видимому, в большей степени подвергаются разрушительному действию ферментов, в результате чего их ДНК больше деградирует. Это и определяет несколько меньшую чувствительность метода для опухолей, локализованных в проксимальных отделах кишечника.

Для клинициста небезынтересно понимать, влияет ли распад опухоли вследствие некроза на чувствительность диагностического метода. В результате некроза происходит распад опухоли, ее содержимое оказывается в просвете кишки и движется с каловыми массами. Чувствительность метода диагностики КРП при выявленном в опухоли некрозе составила 89 %, а в отсутствие некроза — 69 %; однако не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода для пациентов с некрозом опухоли и без него ($P = 0.0562$). Тем не менее можно говорить о наличии выраженной тенденции повышения чувствительности в случае некроза, и в дальнейшем мы будем повторно анализировать влияние наличия некроза на чувствительность метода на увеличенной выборке обследуемых.

По отношению к просвету полого органа рост опухоли может быть эндофитным (в глубину стенки органа) или экзофитным (в просвет органа) (Струков, Серов, 2015). Не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода в отношении выявля-

ния опухолей с эндофитным или экзофитным ростом ($P = 0.4087$).

Полученные данные будут способствовать корректному использованию метода неинвазивной ПЦР-диагностики КРП в клинической практике.

Список литературы

- Бутрович Г. М., Мирлина Е. Д., Вербенко В. Н., Хабарова И. Г., Вострюхина О. А. 2017. Разработка ПЦР-диагностики колоректального рака на основе целостности ДНК, выделенной из фекалий пациента. Клиническая лабораторная диагностика. 62 (6) : 359—362. (Butrovich G. M., Mirlina E. D., Verbenko V. N., Habarova I. G., Vostryukhina O. A. 2017. The development of polymerase chain reaction diagnostic of colorectal cancer based on dna integrity separated from feces of patient. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 62 (6) : 359—362.)
- Струков А. И., Серов В. В. 2015. Патологическая анатомия. М.: ГЭОТАР-Медиа. 878 с. (Strukov A. I., Serov V. V. 2015. Patologicheskaya anatomiya. Moscow: GEHOTAR-Media. 878 p.)
- Davies R. J., Miller R., Coleman N. 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. Nat. Rev. Cancer. 5 : 199—209.
- García-Bilbao A., Armañanzas R., Ispizua Z., Calvo B., Alonso-Varona A., Inza I., Larrañaga P., López-Vivanco G., Suárez-Merino B., Betanzos M. 2012. Identification of a biomarker panel for colorectal cancer diagnosis. BMC Cancer. 12 : 43.
- Henley S. J., King J. B., German R. R., Richardson L. C., Plescia M., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. Surveillance of screening-detected cancers (colon and rectum, breast, and cervix). MMWR Surveill Summ. 59 : 1—25.
- Hussain M., Waqas O., Hassan U., Loya A., Akhtar N., Mush-taq S., Yusuf M. A., Syed A. A. 2016. Right-sided and left-sided colon cancers are two distinct disease entities: an analysis of 200 cases in Pakistan. Asian. Pac. J. Cancer Prev. 17 : 2545—2548.
- Newton K. F., Newman W., Hill J. 2012. Review of biomarkers in colorectal cancer. Colorectal Dis. 14 : 3—17.
- Young G. P., Bosch L. J. 2011. Fecal tests: from blood to molecular markers. Curr. Colorectal Cancer Rep. 7 : 62—70.

Поступила 20 III 2018

SENSITIVITY OF THE COLORECTAL CANCER NONINVASIVE PCR-DIAGNOSTIC METHOD DEPENDS ON CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUMORS

G. M. Butrovich,¹ E. D. Mirlina,¹ V. N. Verbenko,¹ I. G. Habarova,² O. A. Vostryukhina^{1,*}

¹ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad Region, 188300, and

² I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, 197022;

* e-mail: Vostryukhina_OA@pnpi.nrcki.ru

The frequency of occurrence of colorectal cancer (CRC) and the apparent dependence of successful medical treatment on early detection justify the development of non-invasive methods for early diagnosis of CRC. The sensitivity analysis of the method of noninvasive PCR diagnostics of colorectal cancer based on the integrity of fecal DNA, depending on the clinical and pathological characteristics of the tumor is presented. Sensitivity and specificity of the method as a whole were 76 and 100 %, respectively ($P < 0.0001$). The sensitivity of the method has no significant differences for patients with different stages of the disease, which allows to use it for early diagnosis of CRC. The sensitivity of the developed diagnostic method for the rectum compared with other departments of the intestine is significantly higher 85 versus 62.5 % ($P = 0.0314$). Sensitivity of the method of CRC diagnostics with tumor necrosis was 89 %, and in the absence of necrosis 69 %; statistically significant differences were not revealed, but there was a pronounced tendency to increase the sensitivity of the method in the case of necrosis ($P = 0.0562$); no significant differences between the sensitivity of the method for patients with endophytic or exophytic tumor growth ($P = 0.4087$). The obtained data will help clinicians to correctly use the results of the method application in practice.

Key words: non-invasive diagnostics, colorectal cancer, polymerase chain reaction, proximal and distal segments, sensitivity, specificity