

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И КОПРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Бурцев Д. В.¹, Кит О. И.², Максимов А. Ю.²

¹ГБУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», Ростов-на-Дону
Ростов-на-Дону, Россия (344010, г. Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127), aad@aanet.ru

²ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону
Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63), aad@aanet.ru

В статье разработан алгоритм дифференциальной диагностики воспалительных и онкологических заболеваний у больных с положительным результатом теста на скрытую кровь в кале с помощью определения эпигенетических маркеров (метилированная форма ДНК гена SEPT9) в составе циркулирующей ДНК крови и пептидных копрологических маркеров. У 71 пациента с положительным результатом анализа кала на скрытую кровь определяли уровень фекального кальпротектина и проводили тест на детекцию метилированной ДНК гена SEPT9 среди циркулирующих ДНК крови. Одновременное повышение уровня фекального кальпротектина и детекция метилированной ДНК гена SEPT9 среди пула циркулирующих ДНК в крови у больных с воспалительными заболеваниями кишечника является основанием для заключения о высоком онкологическом риске и активном поиске опухоли при колоноскопии. Диагностическая эффективность эпигенетического теста для выявления онкологических заболеваний у этой категории больных составила 90,6 %.

Ключевые слова: рак толстой кишки, воспалительные заболевания толстой кишки, диагностика.

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND CANCER USING MOLECULAR SEROLOGICAL AND COPROLOGICAL METHODS

Burtsev D. V.¹, Kit O. I.², Maksimov A. Yu.²

¹Regional consultative-diagnostic centre, Rostov-on-Don,
Rostov-na-Donu, Russia (344010, Rostov-on-Don, Pushkinskaya str., 127), aad@aanet.ru

²Rostov Institute of cancer research, Rostov-on-Don
Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, 14 line, 63) aad@aanet.ru

In the article the algorithm of differential diagnosis of inflammatory and oncological diseases in patients with a positive test result for occult blood in feces with a determining epigenetic markers (methylated DNA form SEPT9 gene) in the circulating blood DNA and peptide coprological markers. In 71 patients with positive result of occult blood feces analysis determined the level of faecal calprotectin and test for detection of methylated DNA gene SEPT9 among circulating blood DNA. Simultaneous increase faecal calprotectin and detection of methylated DNA SEPT9 gene pool of circulating DNA in the blood in patients with inflammatory bowel disease is the basis for the conclusion about high cancer risk and tumor in active search of colonoscopy. Diagnostic efficiency of epigenetic test to detect cancer in patients in this category amounted to 90,6 %.

Keywords: colon cancer, inflammatory diseases of the large intestine, diagnosis.

В России проблема скрининга, ранней диагностики рака толстой кишки и своевременной дифференциальной диагностики с воспалительными заболеваниями кишки до сих пор остается нерешенной. Это связано не столько с отсутствием должного государственного финансирования, сколько с недостаточной разработкой критериев, с помощью которых можно выделить группу лиц, подлежащих углубленному клинико-инструментальному обследованию [1]. До настоящего времени эффективность скрининговых программ по выявлению колоректального рака в России не превышает 1 % [1]. Несмотря на это, целесообразность использования диагностических методов, направленных на раннее выявление

рака толстой кишки, уже научно обоснована на примере многих западных стран, таких как США, Япония, Австралия, Германия. Считается, что в 90 % случаев рак толстой кишки можно предупредить [9]. Основанием для таких убеждений служат знания о патогенезе опухолей в толстой кишке. Высокую вероятность развития колоректального рака (КРР) имеют пациенты, страдающие воспалительными заболеваниями толстой кишки (прежде всего, неспецифический язвенный колит), с семейной предрасположенностью к данной форме рака и/или имеющие полипы толстой кишки. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) повышают риск развития рака толстой кишки, особенно если неспецифический язвенный колит длится более 10 лет. Недавние исследования показали, что болезнь Крона на 5–10 % повышает риск раковых заболеваний [3]. Частота случаев развития рака из ворсинчатых аденом (полипов) более 2 см в диаметре составляет 35–53 %. При полипах диаметром более 3 см вероятность их озлокачествления составляет 100 % [3].

Используемые в настоящее время методы диагностики рака толстой кишки малоэффективны для обнаружения опухоли до ее клинической манифестации. Белковые онкомаркеры, детектируемые в сыворотке/плазме крови при помощи иммуноферментного анализа, несмотря на относительно высокую специфичность (до 97 %), не обладают достаточной чувствительностью – не более 60 % [4], что ограничивает их использование для ранней диагностики рака толстой кишки. Большую распространенность при скрининге рака толстой кишки получили биохимические и иммуногистохимические тесты, идея которых основывается на обнаружении скрытой крови в фекалиях пациента [5]. Однако этот подход не удовлетворяет потребностей клинической онкологии из-за низкой чувствительности и специфичности. Действительно, далеко не все злокачественные новообразования толстой кишки характеризуются кровотечением. С другой стороны, скрытое кровотечение может сопровождать ВЗК [5], что сразу ставит актуальную задачу дифференциальной диагностики воспалительных и онкологических заболеваний кишки.

Таким образом, поиск новых маркеров, пригодных для ранней диагностики рака толстой кишки, которые бы позволяли выявить заболевание с высокой чувствительностью, а также специфичностью, позволяющей дифференцировать опухоли от ВЗК, является актуальной задачей. В качестве таких маркеров наиболее перспективным представляется использование патогенетически значимых молекулярно-генетических маркеров, которые могут быть обнаружены в циркулирующей крови. Действительно, ДНК трансформированных (опухолевых) клеток обнаруживаются во внеклеточных ДНК, циркулирующих в плазме крови (цир. ДНК) [2], и могут быть использованы для малоинвазивной диагностики опухолей. Одним из таких методов для ранней диагностики рака толстой кишки является опреде-

ление в крови метилированной ДНК гена SEPT9, кодирующего синтез гена-супрессорасептина-9 [6].

Целью работы явилось провести сравнительный анализ эффективности дифференциальной диагностики воспалительных и онкологических заболеваний у больных с положительным результатом теста на скрытую кровь в кале с помощью определения эпигенетических маркеров (метилированная форма ДНК гена SEPT9) в составе циркулирующей ДНК крови и пептидных копрологических маркеров.

Материалы и методы. Исследования были проведены на базе ГБУ Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр» с 2008 по 2011 г. На первом этапе больным проводили анализ кала на скрытую кровь (СКК) с помощью фотометрического анализатора Sentifob и теста FOB Gold. Тест FOB Gold позволял точно определить количественное содержание гемоглобина в кале без предварительного придерживания пациентами диеты. Метод основан на реакции агглютинации антиген-антитело между присутствующим в образце гемоглобином человека и анти-гемоглобин-антитело на латексных частицах. Агглютинация измерялась как увеличение при абсорбции в 570 нм, единица которой пропорциональна количеству гемоглобина человека в образце.

Далее у 71 пациента (42 мужчин и 29 женщин) в возрасте 38–72 лет с положительным результатом анализа кала на СКК определяли уровень фекального кальпротектина и проводили тест на детекцию метилированной ДНК гена SEPT9 среди цир. ДНК.

Количественное определение содержания кальпротектина в образцах стула проводили иммуноферментным анализом (ELISA) с помощью стандартных наборов Buhlmann (Швейцария).

Наличие метилированной ДНК гена SEPT9 определяли в крови с помощью ПЦР. Для проведения методики использовали EpiProColontest (Epigenomics, Германия). Образцы ДНК модифицировали путем бисульфитной конверсии по стандартному протоколу по DevosT. et al.[6], очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «BisulfiteSSDNAIsolationKit» фирмы «BioSilicaLtd.». В образцах плазмы одновременно определяли ДНК SEPT9 и бета-актина (ACTB). Вывод об обнаружении гена SEPT9 делали, если количество циклов при анализе ДНК SEPT9 было менее 45, а ACTB – менее 36. Вывод об отрицательном результате делали при отсутствии специфичного участка ДНК либо при превышении количества циклов для SEPT9 более 45, а для ACTB – более 36 циклов.

В качестве контрольной была сформирована выборка из 25 практически здоровых пациентов (возрастной интервал – 40–60 лет. 4 мужчин и 11 женщин), безонкологических и воспалительных заболеваний кишки в анамнезе.

На окончательном этапе пациентам проводили колоноскопию. В результате проведения колоноскопии забирали биоптаты кишки для последующего гистологического анализа. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, проводили световую микроскопию.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 7.0 (StatSoft, США).

Результаты и их обсуждение

Результаты определения уровня фекального кальпротектина у 71 больных с положительным результатом теста на СКК и 25 здоровых пациентов отражены в табл.1.

Таблица 1

Результаты определения уровня фекального кальпротектина у больных с положительным результатом теста на СКК и у здоровых пациентов

Фекальный кальпротектин	Больные с положительным результатом теста на СКК (n=71)	Здоровые пациенты (n=25)	p
Среднее значение (M±m), мг/г	172,2±5,9	33,9±3,2	<0,001
Число больных с уровнем кальпротектина <50 мг/г, абс. (%)	6 (8,5%)	23 (92%)	<0,001
Число больных с уровнем кальпротектина ≥50 мг/г, абс. (%)	65 (91,5%)	2 (8%)	<0,001

Фекальный кальпротектин является пептидным маркером, позволяющим дифференцировать органические и функциональные кишечные заболевания [7]. Кальпротектин высвобождается из нейтрофилов и тканевых макрофагов во время их активации или гибели и вовлекается в активный воспалительный процесс [10]. Кальпротектин является стабильным химическим веществом и медленно разлагается протеазами микроорганизмов. В результате прямое обнаружение кальпротектина в кале отражает степень воспалительного иммунного ответа в различных регионах ЖКТ [11]. У здоровых людей «нормальные» уровни кальпротектина в стуле ≤ 50 мг/г [12]. В работе было установлено, что уровень фекального кальпротектина среди больных с положительным результатом теста на СКК был выше контрольных величин в 5,1 раз ($p < 0,001$). У 65 пациентов с положительным результатом теста на СКК

уровень кальпротектина значительно превышал верхнюю границу нормального диапазона и колебался в 50 % наблюдений от 145 до 219 мг/г. В контрольной группе число пациентов с повышенным кальпротектином составило 2 человека. Однако пептид был повышен незначительно и составил у одного пациента 61 мг/г, а у второго – 65 мг/г.

Положительный тест на СКК и повышение фекального кальпротектина явилось основанием для проведения колоноскопии. В результате из 71 пациента у 39 был диагностирован рак толстой кишки, а у 32 – ВЗК (30 пациентов – неспецифический язвенный колит и у 2 больных – болезнь Крона). Уровень кальпротектина при ВЗК оценивали в зависимости от клинической активности колита. Клиническую активность колита оценивали с помощью балльной шкалы D. Rachmilewitz (1989). Сумма баллов от 0 до 4 соответствовала ремиссии заболевания, 5–10 баллов – низкой, 11–15 баллов – средней и более 16 баллов – высокой степени клинической активности неспецифического колита.

Содержание фекального кальпротектина (мкг/г) у больных с воспалительными и опухолевыми заболеваниями толстой кишки отражено в табл. 2.

Таблица 2

Содержание фекального кальпротектина (мкг/г) у больных с воспалительными и опухолевыми заболеваниями толстой кишки

Группы больных	M±m	Me [25;75]
Больные с ВЗК: в т.ч.	238,8±5,7*	235 [221;257]
Ремиссия (n=4)	85,3±3,2	86 [75;94]
Низкая активность (n=7)	120,7±7,4*	120 [108;133]
Умеренная активность (n=21)	264,5±6,2*	265 [243;276]
Больные со злокачественными опухолями кишки (n=39)	95,5±5,4	94 [82;106]

Примечание: M±m – средняя выборочная и ошибка средней, Me – медиана, [25;75] – значения нижнего и верхнего квартилей, *– достоверные отличия по сравнению с больными со злокачественными опухолями при p<0,001.

Средние концентрации кальпротектина в образцах кала у больных ВЗК составили 238,8±5,7мкг/г, что было в 2,5 раза выше (p<0,001) в отличие от аналогичных показателей пациентов со злокачественными опухолями (95,5±5,4 мкг/г). С повышением клинической активности ВЗК повышался и уровень фекального кальпротектина. Больные в основном были с умеренной активностью неспецифического колита. При этом значимых различий концентраций кальпротектина у больных ВЗК в состоянии ремиссии и у пациентов с опухолевыми образованиями кишки не наблюдалось, что требует более тонких методов дифференцировки заболеваний.

За последнее десятилетие исследований процессов развития раковых опухолей биологи установили, что у человека имеется сложная система молекулярных механизмов, при участии которых внешние факторы могут изменять поведение генов, не влияя на заключенную в них информацию [2]. Химические группы – эпигенетические маркеры – присоединяются либо к самой ДНК, либо к гистоновым комплексам, на которые эта ДНК закручена. К маркерам подобного типа относятся метильные группы [8]. Септины – белки, функции которых заключаются в построении белкового остова, осуществляющего поддержку клетки во время процесса деления. Они обеспечивают децентрализацию плазматической мембраны и запускают механизм, необходимый для разделения цитоплазмы. Белок septin-9 является онкосупрессором и регулирует деление цитоплазмы или цитокинез в клетках кишки. Ген SEPT9 кодирует синтез белка septin-9. Метилирование ДНК этого гена прекращает его активную работу и «выключает» синтез белка-супрессора ракового роста. Повреждение экспрессии гена SEPT9 ассоциировано с развитием колоректального рака (КРР). Наличие в крови неактивного гена-супрессора раковой опухоли свидетельствует о процессах развития опухоли в кишечнике, отражает такие события, как пролиферация клеток и ангиогенез в опухоли [6].

Среди 39 больных КРР в сыворотке крови метилированная ДНК гена SEPT9 была обнаружена у 34 пациентов, а у 5 больных результат теста был отрицательным. В контрольной группе ложноположительный результат наблюдался только у 1 больного, во всех остальных наблюдениях метилированная ДНК гена SEPT9 отсутствовала. Таким образом, диагностическая чувствительность эпигенетического теста EpiProColon в отношении выявления онкологических заболеваний составила 87,1 %, диагностическая специфичность – 96 %, диагностическая эффективность 90,6 %. В клиническом исследовании, проведенном Lofton-DayC. et al. в 2008 году, были получены иные, но схожие цифры эффективности теста по выявлению метилированной ДНК гена SEPT9: диагностическая чувствительность 69 %, а диагностическая специфичность 86 % [8]. Несколько большую чувствительность теста в нашем исследовании можно объяснить тем, что исследование проводили среди больных с положительным результатом теста на СКК.

Среди онкологических больных рак толстой кишки I стадии был диагностирован у 5 (12,8 %), IIА стадии у 11 (28,2 %), IIВ стадии у 9 (23,1 %), IIС стадии у 4 (10,3 %), III стадии у 6 (15,4 %) и IV стадии у 4 (10,2%) пациентов. На следующем этапе определяли эффективность эпигенетического теста обнаружения метилированной ДНК гена SEPT9 среди больных КРР на ранней стадии (I), во II стадии и поздних этапах (III–IV стадии) заболевания. Среди больных КРР на I стадии заболевания отрицательный тест встречался у 1 (20 %) больного, на II стадии – у 4 (16,7 %) пациентов и на III–IV стадиях отрицательных результатов не

встречалось. Диагностическая эффективность на I стадии заболевания составила 80 %, на II стадии – 83,3 % и на III–IV стадии – 100 %. Таким образом, эффективность теста была высокой и на ранних стадиях КРР, но с повышением стадии рака толстой кишки диагностическая чувствительность изучаемого молекулярного теста повышалась.

На следующем этапе была изучена взаимосвязь между локализацией рака толстой кишки и чувствительностью теста по выявлению метилированной ДНК гена SEPT9 в крови (табл. 3).

Таблица 3

Результаты теста по выявлению метилированной ДНК гена SEPT9 в крови у больных раком толстой кишки в зависимости от локализации опухоли

Локализация рака толстой кишки	Общее число больных	Число больных с положительным результатом теста	Диагностическая чувствительность теста
Слепая кишка	3	3	100
Восходящая ободочная кишка	4	4	100
Печеночный изгиб	1	1	100
Поперечная ободочная кишка	3	2	66,7
Селезеночный изгиб	1	1	100
Нисходящая ободочная кишка	1	1	100
Сигмовидная кишка	11	9	81,8
Ободочная кишка неуточненной локализации	1	1	100
Ректосигмовидное соединение	3	2	66,7
Прямая кишка	11	10	90,9
Всего	39	34	89,7

Результаты EpiroColon теста не зависели от локализации рака толстой кишки. При проксимальном раке толстой кишки, когда существуют диагностические трудности при проведении колоноскопии, положительные результаты молекулярного теста выявлялись в 100 %.

Эффективность эпигенетических и копрологических молекулярных методов диагностики воспалительных и онкологических заболеваний толстой кишки обобщена в табл. 4. Среди 32 больных ВЗК в сыворотке крови метилированная ДНК гена SEPT9 была выявлена у 3 пациентов, а у 29 больных результат теста был отрицательным. При колоноскопии было установлено, что у двух больных имелись аденоматозные полипы. Аденоматозные измене-

ния макроскопически были выражены незначительно в виде бородавчатых разрастаний и бархатистой поверхности на фоне уплощённой слизистой оболочки – flatmucosa. Еще у одного больного наблюдали тотальную форму поражения кишки, активность воспаления была умеренной. Стаж заболевания был у одного больного 11 лет, у второго – 27 лет и третьего пациента – 21 год.

Таблица 4

Эффективность эпигенетических и копрологических молекулярных методов диагностики воспалительных и онкологических заболеваний толстой кишки

Группа больных	Тест	Число больных с положительным результатом теста	Диагностическая чувствительность	Диагностическая эффективность
Больные КРР	Тест с кальпротектином	33	84,6	87,5
Больные с ВЗК		32	100,0	96,5
Здоровые пациенты		2	-	-
Больные КРР	Эпигенетический тест	34	87,2	90,6
Больные с ВЗК		3	9,4	47,4
Здоровые пациенты		1	-	-

Таким образом, алгоритм использования молекулярных методов для дифференциальной диагностики воспалительных и онкологических заболеваний толстой кишки видится следующим. Иммуногистохимический тест кала на скрытую кровь позволит отобрать контингент пациентов с предположением наличия у них воспалительных или онкологических заболеваний толстой кишки. Проведение оценки уровня фекального кальпротектина среди пациентов с положительным результатом теста СКК дает возможность выделить группу пациентов с ВЗК. Однако необходимо помнить, что фекальный кальпротектин повышен относительно нормы и у больных с КРР. Определение в крови среди пула циркулирующей метилированной ДНК гена SEPT9 позволит дифференцировать ВЗК и КРР с высокой эффективностью. Если среди пациентов с ВЗК выявляются больные с детекцией у них в крови метилата ДНК гена SEPT9, то это является поводом для максимальной выраженности онкологической настороженности. Безусловно, больные с положительным результатом тестов на СКК, повышение фекального протектина, детекцииметилированной ДНК гена SEPT9 в крови составляют группу для обязательного направления их на колоноскопию.

Выводы

1. Проведение анализа кала на скрытую кровь иммуногистохимическим методом, уровня фекального кальпротектина и детекция метилированной ДНК гена SEPT9 среди пула циркулирующих ДНК в крови могут быть использованы для дифференциальной диагностики воспалительных и онкологических заболеваний толстой кишки до применения эндоскопических методов диагностики.
2. Одновременное повышение уровня фекального кальпротектина и детекция метилированной ДНК гена SEPT9 среди пула циркулирующих ДНК в крови у больных ВЗК является основанием для заключения о высоком онкологическом риске.

Список литературы

1. Егоренков В. В., Моисеенко Ф. В. Скрининг рака толстой кишки. Практическая онкология. – 2010. – Т. 11, № 2. – С.81-87.
2. Залетаев Д. В. Системы молекулярных маркеров в ДНК-диагностике онкозаболеваний // Молекулярная медицина. – 2005. – № 1. – С. 10–17.
3. Мейерхардт Дж., Сандерз М. Рак толстой кишки. – М.: ООО «Рид Элсивер», 2009. – 188 с.
4. Сергеева Н. С., Маршутина Н. В. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии // Практическая онкология. – 2011.– Т.12, №4. – С.147-154.
5. Auge J. M., Sasot M., Escudero J. M. et al. The immunologic faecal occult blood test for the detection of significant colorectal neoplasia // Tumor Biology. – 2011; 32, Suppl.1: S.17.
6. Devos T., Tetzner .R, Model F., Weiss G. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer // ClinChem, 2009; 55: 1337-1346.
7. El-Badry A., Sedrak H., Rashed L. FaecalCalprotectin in Differentiating between Functional and Organic Bowel Diseases // Arab Journal of Gastroenterology. – 2010. – Vol.11. – P.70-73.
8. Lofton-Day C., Model F., Devos T. DNa methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening // Clin Chem., 2008; 54(2): 414-423.
9. Mandel J. S., Smith R. Principles of Cancer Screening. Cancer. Principles & Practice of Oncology / Eds. V.T. De Vita, Jr. S. Hellman, S.A. Rosenberg. – Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 659-676.
10. Rheenen P. V., Van-De-Vijve E., Fidler V. FaecalCalprotectin for Screening of Patients with Suspected Inflammatory Bowel Disease: Diagnostic Meta-Analysis // BMJ. – 2010. – Vol. 341. – P.567-569.
11. Roon A.C.V. Diagnostic Precision of Fecal Calprotectin for Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Malignancy // Am. J. Gastroenterol. – 2007. – Vol.102. – P. 803-813.

12. Van Rheine P. F., Van de Vijver E., Fidler V. Fecal Calprotectin a Sign of Inflammatory Bowel Disease // BMJ. – 2010. – Vol.341. – P. 33-59.

Рецензенты:

Касаткин В. Ф., доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заслуженный врач РФ, заслуженный деятель науки, заведующий торакоабдоминальным отделением ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону.

Воробьев Б. И., доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, профессор кафедры внутренних болезней №2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России», Ростов-на-Дону.