

процесса предстательной железы. В то же время обращает на себя внимание относительно высокий процент случаев гиперметилирования гена RASSF1A в группе пациентов с ДГПЖ/ПИН. Использование данного гена в панели генетических маркеров может снизить специфичность метода дифференциальной диагностики РПЖ на основе тестирования гиперметилирования. Полученные в нашем исследовании данные в отношении статуса метилирования RASSF1A в целом соответствуют результатам других исследований. Из данных литературных источников следует, что гиперметилирование RASSF1A в группе пациентов с ПИН является частым событием и может встречаться также в нормальной ткани предстательной железы [9]. Учитывая это, для повышения чувствительности метода следует исключить ген RASSF1A из панели маркеров для дифференциальной диагностики патологии предстательной железы.

Таким образом, с учетом специфичности проявления и частоты встречаемости метилирования промоторных областей 11 генов-супрессоров в 3-х группах исследования для формирования диагностической панели маркеров могут быть использованы 5 генов: RAR $\beta$ , GSTP1, APC, CyclinD2 и HIN1. Тем не менее, принимая во внимание относительно небольшой объем выборки в группе ДГПЖ/ПИН, полученные данные позволяют рассматривать выбранные гены пока лишь в качестве кандидатов для формирования панели маркеров дифференциальной диагностики патологии предстательной железы. Для более точного анализа требуется продолжение исследования с увеличением количества анализируемых случаев, особенно в группе ДГПЖ/ПИН.

#### **Заключение**

С использованием метилспецифической полимеразной цепной реакции проведен сравнительный анализ статуса метилирования промоторных областей 11 различных генов-супрессоров в группах пациентов с доброкачественной гиперплазией, раком предстательной железы и лиц без патологии. Установлено, что

в группе лиц без патологии предстательной железы метилирование практически отсутствовало. В группе ДГПЖ/ПИН в большинстве случаев метилирование отсутствовало либо встречалось только в 1 из 11 генов. В пяти случаях выявлено метилирование 2 и более генов, по которым при дополнительном гистологическом исследовании отмечаются признаки карциномы *in situ*. Проведенный сравнительный анализ позволил определить 5 генов-кандидатов для формирования панели генетических маркеров дифференциальной диагностики патологии предстательной железы.

Данная работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация», подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина», раздел 2 «Изучение патогенетических основ социально-значимых заболеваний человека для разработки методов их диагностики, лечения и профилактики» (договор № 1.2.27 от 28.02.2011 г.).

#### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia / I. V. Baylin [et al.] // *Adv. Cancer Res.* — 1998. — Vol. 72. — P. 141–196.
2. Herman, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer / J. G. Herman // *Sem. Cancer Biol.* — 1999. — Vol. 9. — P. 359–367.
3. Метилирование ДНК и канцерогенез / Б. А. Лихтенштейн [и др.] // *Биохимия.* — 2001. — № 66. — С. 235–255.
4. Detection of Aberrant p16 Methylation in the Plasma and Serum of Liver Cancer Patients / D. E. Wong [et al.] // *Cancer Research.* — 1999. — Vol. 59. — P. 71–73.
5. Detection of Aberrant Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients / J. K. Esteller [et al.] // *Cancer Research.* — 1999. — Vol. 59. — P. 67–70.
6. Detection of Bladder Cancer in Urine by a Tumor Suppressor Gene Hypermethylation Panel / M. R. Dulaimi [et al.] // *Clinical Cancer Research.* — 2004. — Vol. 10. — P. 1887–1893.
7. Xing, M. Minireview: Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis / M. Xing // *Endocrinology.* — 2007. — Vol. 148, № 3. — P. 948–953.
8. Epigenetics in Prostate Cancer: Biologic and Clinical Relevance / F. S. Jeronimo [et al.] // *European Urology.* — 2011. — Vol. 60. — P. 753–766.
9. Molecular Biomarker in Prostate Cancer: The Role of CpG Island Hypermethylation / F. A. Bastian [et al.] // *European Urology.* — 2004. — Vol. 46. — P. 698–708.

Поступила 09.11.2012

УДК 616.155.34:616.345/.351-006.6

## **ФЕКАЛЬНЫЙ ЛАКТОФЕРРИН В ВЫЯВЛЕНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЕГО РАЗВИТИЯ**

**Е. И. Михайлова, Н. В. Филипенко**

**Гомельский государственный медицинский университет**

**Цель исследования:** оценка эффективности выявления колоректального рака на разных стадиях его развития на основе фекального лактоферрина.

**Материал исследования.** В группу исследования вошли 48 пациентов с колоректальным раком, 46 — с синдромом раздраженного кишечника и 25 здоровых добровольцев.

**Результаты исследования.** Установлено, что в неинвазивной диагностике ранних и поздних стадий колоректального рака фекальный лактоферрин обладал отличной диагностической значимостью с площадью под кривой (ППК) на уровне  $0,940 \pm 0,0327$  и ППК:  $0,956 \pm 0,032$  соответственно и не уступал по этому

показателю иммунохимическому тесту на скрытую кровь в кале (ППК:  $0,939 \pm 0,0342$  и ППК:  $0,931 \pm 0,0393$ ,  $p = 0,73$  и  $p = 0,62$  соответственно).

**Заключение.** Фекальный лактоферрин является эффективным маркером ранних и поздних стадий колоректального рака.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, диагностика, фекальный лактоферрин, иммунохимический тест на скрытую кровь в кале.

## FECAL LACTOFERRIN IN DETECTION OF COLON CANCER AT VARIOUS STAGES OF ITS DEVELOPMENT

E. I. Mihaylova, N. V. Filipenko

Gomel State Medical University

The purpose of the study was to evaluate the efficacy of detection of colorectal cancer at different stages of its development on the basis of fecal lactoferrin.

**Subject of study:** 48 patients with colorectal cancer, 46 patients with irritable bowel syndrome and 25 healthy volunteers were included in the study group.

**The results of the study:** it was found that fecal lactoferrin was diagnostically reliable with areas under the curve (AUC) at  $0,940 \pm 0,0327$  and AUC:  $0,956 \pm 0,032$ , respectively in non-invasive diagnosis of early and late-stage colorectal cancer, and was not inferior to the immunochemical test for faecal occult blood (AUC:  $0,939 \pm 0,0342$  and AUC:  $0,931 \pm 0,0393$ ,  $p = 0,73$  and  $p = 0,62$ , respectively).

**Conclusion:** fecal lactoferrin is an effective marker for early and late stages of colorectal cancer.

**Key words:** colorectal cancer, diagnostic, fecal lactoferrin, immunochemical fecal occult blood test.

### Введение

Высокий и постоянно растущий уровень заболеваемости колоректальным раком, охватывающий в основном трудоспособную часть общества, большой удельный вес поздних и осложненных стадий заболевания, высокая смертность от этой патологии диктуют необходимость поиска новых методов диагностики колоректального рака.

Своевременное выявление и лечение ранних форм этого заболевания являются одним из основных путей снижения уровня смертности от колоректального рака, улучшения прогноза и качества жизни пациентов.

Решающую роль в диагностике колоректального рака играют эндоскопические, гистологические и рентгенологические методы исследования. Однако они технически сложны, в известной степени инвазивны и имеют высокую стоимость. Значительные материальные и людские ресурсы, вложение которых необходимо для реализации этих методик, делают в настоящее время перспективу их использования в широкомасштабном режиме весьма сомнительной [1].

Большинство случаев колоректального рака сопровождается, как известно, кровотечениями разной степени интенсивности. Наличие крови в каловых массах пациентов с колоректальным раком может быть выявлено задолго до проявления первых клинических симптомов заболевания. Именно на этой особенности колоректального рака основываются в настоящее время основные скрининговые методики его выявления. Наиболее популярной из них и чаще других используемой является модернизи-

рованная Грегором гваяковая проба, которая знакома большинству врачей под названием «гемокульт-тест». Он позволяет снизить смертность от колоректального рака на 15–33 % [2]. Однако при одноразовом применении чувствительность этого метода составляет всего 50–60 %, а при ранних формах заболевания этот показатель не достигает даже 30 % [3–5].

По этой причине в настоящее время по-прежнему активно ведется поиск простых и неинвазивных способов ранней диагностики колоректального рака, которые помогут определить показания к дальнейшему углубленному обследованию пациентов, в том числе с проведением и эндоскопического исследования толстой кишки.

### Цель исследования

Оценка эффективности использования фекального лактоферрина в сравнении с иммунохимическим тестом на скрытую кровь в кале в выявлении колоректального рака на разных стадиях его развития.

### Материал и методы исследования

В исследование вошли 48 пациентов с колоректальным раком (Me = 67,50 года; 95 % ДИ: 64,91–70,0), 46 — с синдромом раздраженного кишечника (Me = 50,50 года; 95 % ДИ: 43,0–56,88) и 25 здоровых добровольцев (Me = 58,0 года; 95 % ДИ: 55,0–72,22).

Диагноз колоректального рака во всех случаях имел морфологическую верификацию. Она включала гистологическое исследование препаратов, полученных из биоптатов толстой кишки и операционного материала [5]. Выделение стадий колоректального рака осуществ-

лялось на основе разработанной Международным Противораковым Союзом системы TNM [6].

Диагноз синдрома раздраженного кишечника был основан на Римских критериях III [7]. Все здоровые добровольцы, включенные в исследование, не подвергались абдоминальным хирургическим вмешательствам и не имели симптомов заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Лактоферрин определяли в образцах кала, взятых из одной дефекации, иммуноферментным анализом (ELISA) с использованием наборов ELISA TEST KIT Hycult Biotechnology (Netherlands).

Наличие скрытой крови в кале определялось с помощью иммунохимического теста на скрытую кровь в кале наборами фирмы «Biotech Atlantic, Inc.» (США).

Статистическая обработка данных проведена с применением пакета прикладных программ «Statistica», 6 фирмы StatSoft Inc. (США) и MedCalc Software (Belgium). Для проверки формы распределения использовался тест Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении вычислялись среднее значение и стандартная ошибка среднего; при отсутствии

такового — медиана и 95 % доверительные интервалы (95 % ДИ). Сопоставление двух независимых групп по количественному признаку производили с помощью теста Манна-Уитни, по качественному (бинарному) признаку — двустороннего точного критерия Фишера. Для определения информативности метода строились характеристические кривые (ROC-кривые) с вычислением площади под кривой (ППК) и ошибки среднего (СО). В качестве диагностических характеристик использовались чувствительность, специфичность, отношение правдоподобия положительного результата (ОППР), отношение правдоподобия отрицательного результата (ОПОР), положительная прогностическая ценность (ППЦ) и отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ). Статистически значимыми считали различия на уровне  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты, полученные при постановке иммунохимического теста у больных колоректальным раком на разных стадиях заболевания, пациентов с синдромом раздраженного кишечника и здоровых добровольцев, представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты постановки иммунохимического теста на скрытую кровь в кале у пациентов с колоректальным раком на разных стадиях заболевания, пациентов с синдромом раздраженного кишечника и здоровых добровольцев

Результаты постановки иммунохимического теста на скрытую кровь в кале	Стадии колоректального рака		Синдром раздраженного кишечника	Здоровые добровольцы
	I–II	III–IV		
Положительный	23	19	0	3
Отрицательный	2	2	46	22

Установлено, что у пациентов с I–II стадиями колоректального рака по сравнению с больными с III–IV стадиями заболевания статистические различия в результатах постановки иммунохимического теста на скрытую кровь в кале отсутствовали ( $p = 1,00$ ). Маркер чаще показывал положительный результат у больных колоректальным раком с I–II и III–IV стадиями заболевания по сравнению с пациентами контрольной группы ( $p < 0,000001$ ,  $p < 0,000001$  соответственно). Различий между группами больных синдромом раздраженного

кишечника и здоровыми добровольцами не обнаружено ( $p = 0,04$ ).

ППК для иммунохимического теста на скрытую кровь в кале при колоректальном раке I–II стадий составила  $0,923 \pm 0,0367$ , при III–IV стадиях —  $0,931 \pm 0,0393$ . Достоверные статистические различия между группами не установлены ( $p = 0,88$ ). Диагностические характеристики иммунохимического теста на скрытую кровь в кале в диагностике колоректального рака на разных стадиях развития представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Диагностические характеристики иммунохимического теста на скрытую кровь в кале в диагностике колоректального рака на разных стадиях его развития

Стадии колоректального рака	Диагностические показатели							
	чувствительность	95 % доверительный интервал	специфичность	95 % доверительный интервал	ОППР	ОПОР	ППЦ	ОПЦ
I–II	88,89	70,8–97,5	95,77	88,1–99,1	21,04	0,12	88,9	95,8
III–IV	90,48	69,6–98,5			21,41	0,099	86,4	97,1

Примечание. В таблице 2 и далее в подобных ситуациях чувствительность, специфичность, 95 % доверительный интервал, ОПЦ, ППЦ даны в процентах, ОППР, ОПОР — в относительных единицах.

Изучение уровней фекального лактоферрина в исследуемых группах показало, что медиана значений маркера для I–II стадий колоректального рака составила 29,17 мкг/г (95 % ДИ: 16,39–49,10), для III–IV стадий — 29,67 мкг/г (95 % ДИ: 22,64–39,84). Достоверные статистические различия между группами не установлены ( $p = 0,70$ ).

ППК для пробы на фекальный лактоферрин при I–II стадиях колоректального рака составила  $0,940 \pm 0,0327$ , при III–IV стадиях —  $0,956 \pm 0,032$ . Достоверные статистические различия между показателями не выявлены ( $p = 0,73$ ).

В качестве иллюстрации приведем следующий клинический случай. Больной К., 64 года, обратился за медицинской помощью с жалобами на схваткообразные боль по всему животу, связанные с актом дефекации, жидкий стул без патологических примесей до 3–4 раз в сутки, общую слабость и недомогание в течение 3 недель. Пациенту был выполнен тест на скрытую кровь в кале с использованием антител к человеческому гемоглобину. Результат оказался положительным. Уровень фекального лакто-

феррина был также выше нормы и составил 58,92 мкг/г. Проведенная впоследствии колоноскопия обнаружила кольцевидное сужение просвета в среднеампулярном отделе прямой кишки. Гистологическое исследование препаратов, полученных из биоптатов кишки и операционного материала, выявило у больного тубулярную аденокарциному. Первичный опухолевый процесс и метастазирование согласно международной классификации соответствовал  $T_1N_0M_0G_2$ .

Диагностические характеристики фекального лактоферрина в диагностике колоректального рака на разных стадиях развития представлены в таблице 3.

Точка деления для фекального лактоферрина соответствовала 15,25 мкг/г и наиболее оптимально отражала соотношение чувствительности и специфичности.

Результаты постановки пробы на фекальный лактоферрин у пациентов с колоректальным раком на разных стадиях развития заболевания, пациентов с синдромом раздраженного кишечника и здоровых добровольцев представлены в таблице 4.

Таблица 3 — Диагностические характеристики фекального лактоферрина в диагностике колоректального рака на разных стадиях развития

Стадии колоректального рака	Диагностические показатели							
	чувствительность	95 % доверительный интервал	специфичность	95 % доверительный интервал	ОППР	ОПОР	ППЦ	ОПЦ
I–II	74,07	53,7–88,8	90,14	80,7–95,9	7,50	0,29	74,1	90,1
III–IV	85,71	63,6–96,8			8,69	0,16	72,0	95,5

Таблица 4 — Результаты постановки пробы на фекальный лактоферрин у пациентов с колоректальным раком на разных стадиях развития, пациентов с синдромом раздраженного кишечника и здоровых добровольцев

Результаты постановки пробы на фекальный лактоферрин	Стадии опухолевого процесса		Синдром раздраженного кишечника	Здоровые добровольцы
	I–II	III–IV		
Положительный	20	18	7	0
Отрицательный	7	3	39	25

У пациентов с I–II стадиями колоректального рака по сравнению с больными с III–IV стадиями заболевания достоверные статистические различия в результатах постановки теста отсутствовали ( $p = 0,48$ ). Маркер чаще показывал положительный результат у больных колоректальным раком с I–II и III–IV стадиями заболевания по сравнению с лицами, страдающими синдромом раздраженного кишечника, и здоровыми добровольцами ( $p < 0,000001$ ,  $p < 0,000001$  соответственно).

При сравнении диагностической значимости пробы на фекальный лактоферрин и иммунохимического теста на скрытую кровь в кале в выявлении колоректального рака в зависимо-

сти от стадии заболевания установлено, что фекальный лактоферрин имел тенденцию к повышению диагностической значимости по сравнению с иммунохимическим тестом на скрытую кровь в кале при III–IV стадиях колоректального рака, которая достоверных статистических различий не достигла ( $p = 0,62$ ). При I–II стадиях заболевания показатели маркеров не имели между собой достоверных статистических различий ( $p = 0,73$ ).

При III–IV стадиях колоректального рака проба на фекальный лактоферрин не уступала иммунохимическому тесту на скрытую кровь в кале по чувствительности ( $p = 1,00$ ), при I–II стадиях заболевания маркер имел тенденцию к

понижению этого показателя по сравнению с иммунохимическим тестом на скрытую кровь в кале, которая достоверных статистических различий не достигла ( $p = 0,29$ ). Фекальный лактоферрин в диагностике колоректального рака не имел достоверных статистических различий в специфичности по сравнению с иммунохимическим тестом на скрытую кровь в кале ( $p = 0,33$ ).

Таким образом, проведена сравнительная оценка эффективности пробы на фекальный лактоферрин и иммунохимического теста на скрытую кровь в кале в диагностике разных стадий колоректального рака. Установлено, что фекальный лактоферрин не имел достоверных статистических различий в эффективности выявления I–II и III–IV стадий заболевания. Он, подобно иммунохимическому тесту на скрытую кровь в кале, способен результативно диагностировать как ранние, так и запущенные стадии злокачественного опухолевого роста в толстой кишке. Научные публикации с результатами похожих исследований нами не были обнаружены. Для сравнения можно привести лишь данные, полученные М. Hoshimoto с соавторами, которые изучали диагностическую эффективность количественного определения иммуноферментным анализом уровней фекального лактоферрина и гемоглобина в фекалиях пациентов с ранними стадиями колоректального рака. При этом пациенты с запущенными стадиями развития злокачественного процесса в исследовании отсутствовали, что позволяет нашему исследованию претендовать на мировую новизну. Согласно полученным японскими авторами результатам, скрытая кровь в кале имела место в 2 из 17 случаев колоректального рака на ранних стадиях развития, в то время как повышенный уровень фекального лактоферрина выявлялся в 5 из 17 случаев. Однако у 14 из 17 обследованных пациентов, как отмечали авторы, скрытая кровь в кале все-таки была выявлена, но несколько ранее, в других клиниках. Именно данный фактор стал поводом для направления этих пациентов в клинику М. Hoshimoto для дополнительного обследования. Причиной такой изменчивости результатов теста, по мнению авторов, явилась склонность ранних злокачественных опухолей к прерывистому, а не постоянному кровотечению. Этот факт позволил исследователям предложить в качестве маркера колоректального рака комбинированное использование обоих маркеров, позволяющее нивелировать их недостатки и тем самым улучшить диагно-

стические характеристики каждого теста в отдельности [8].

Следовательно, полученные результаты позволяют сделать заключение, что фекальный лактоферрин обладает высокой эффективностью в выявлении как ранних, так и запущенных стадий колоректального рака. Маркер не уступает в результативности иммунохимическому тесту на скрытую кровь в кале. Следовательно, он может наряду с иммунохимическим тестом на скрытую кровь в кале использоваться в практической медицине для неинвазивной диагностики злокачественных новообразований толстой кишки.

Обобщая представленные результаты исследования, можно сделать следующие **выводы**:

1. В неинвазивной диагностике ранних и запущенных стадий колоректального рака фекальный лактоферрин обладал отличной диагностической значимостью (ППК:  $0,940 \pm 0,0327$  и ППК:  $0,956 \pm 0,032$  соответственно) и не уступал по этому показателю иммунохимическому тесту на скрытую кровь в кале (ППК:  $0,939 \pm 0,0342$  и ППК:  $0,931 \pm 0,0393$ ,  $p = 0,73$  и  $p = 0,62$  соответственно).

2. По чувствительности в выявлении ранних и запущенных стадий колоректального рака фекальный лактоферрин (74,07 %, 95 % ДИ: 53,7–88,8; 85,71 % и 95 % ДИ: 63,6–96,8 соответственно) не уступал иммунохимическому тесту на скрытую кровь в кале (88,89 %, 95 % ДИ: 70,8–97,5 и 90,48 %, 95 % ДИ: 69,6–98,5 соответственно).

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Имянитов, Е. Н.* Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения / Е. Н. Имянитов // Практическая онкология. — 2005. — Т. 6, № 2. — С. 65–70.
2. *Haug, U.* New stool tests for colorectal cancer screening: A systematic review focusing on performance characteristics and practicalness / U. Haug, H. Brenner // Int. J. Cancer. — 2005. — № 117. — P. 169–176.
3. Diagnostic accuracy of fecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review / J. A. Burch [et al.] // J. Med. Screen. — 2007. — № 14. — P. 132–137.
4. *Moayyedi, P.* Does fecal occult blood testing really reduce mortality? A reanalysis of systematic review data / P. Moayyedi, E. Achkar // Am. J. Gastroenterol. — 2006. — № 101. — P. 380–384.
5. Рак толстой кишки / Дж. Мейерхардт [и др.]; под ред. Дж. Мейерхардта, М. Сандерза. — СПб.: Рид Элсивер, 2009. — 188 с.
6. TNM. Классификация злокачественных опухолей. 6-е издание [Электронный ресурс] / МПРС; перевод и редакция Н. Н. Блинова. — 2008. — Режим доступа: [http://onco.debryansk.ru/library/TNM\\_6ed.pdf](http://onco.debryansk.ru/library/TNM_6ed.pdf). — Дата доступа: 12.10.2010.
7. *Румянцев, В. Г.* Синдром раздраженного кишечника: путь к Римским критериям III / В. Г. Румянцев // Фарматека. — 2008. — № 10. — С. 16–23.
8. Usefulness of fecal lactoferrin and hemoglobin in diagnosis of colorectal diseases / M. Hoshimoto [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2007. — № 13(10). — P. 1569–1574.

Поступила 19.11.2012