



Д.В. БУРЦЕВ, О.И. КИТ, А.Ю. МАКСИМОВ

УДК 616.345-006.6-07

Областной консультативно-диагностический центр, г. Ростов на Дону
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

Эффективность и оптимизация эпигенетических методов при молекулярном скрининге рака толстой кишки

Бурцев Дмитрий Владимирович

кандидат медицинских наук, главный врач Областного консультативно-диагностического центра
344068, г. Ростов-на-Дону, ул. Фурмановская, д. 100, тел. (863) 220-63-01, e-mail: aad@aanet.ru

В статье представлены результаты изучения эффективности молекулярного скрининга рака толстой кишки путем определения эпигенетического маркера рака SEPT 9 в крови и в образцах крови и клетках опухоли в кале. Диагностическая чувствительность теста при определении метилированного гена в крови составила 87,1%, диагностическая специфичность — 96%, диагностическая эффективность — 90,6%, что превышало эффективность иммуногистохимического метода анализа кала на скрытую кровь (41,9%). Определение в крови метилированной ДНК гена SEPT9 эффективно при ранних стадиях рака толстой кишки, а также при проксимальной и дистальной локализациях опухоли.

Ключевые слова: рак толстой кишки, скрининг, метилированная ДНК гена, эпигенетика.

D.V. BURTSEV, O.I. KIT, A.Y. MAKSIMOV

Regional Consultative Diagnostic Center, Rostov-on-Don
Cancer research Institute, Rostov-on-Don

Effectiveness and optimization of epigenetic methods in molecular screening colon cancer

The paper presents the results of the study the effectiveness of molecular screening colon cancer by identifying cancer SEPT 9 epigenetic marker in blood and blood samples and tumors cells in faeces. Diagnostic sensitivity test in determining methylated gene in blood left 87,1%, diagnostic specificity — 96% and diagnostic efficiency — 90,6%, that exceed the efficiency immunohistochemical method analysis of feces occult blood test (41,9%). Identification in the blood of methylated DNA gene SEPT9 is effective at early stages of colon cancer, as well as of proximal and distal tumor sites.

Keywords: colon cancer, screening, methylatgene DNA, epigenetics.

Скрининг определяют как массовое обследование населения с целью выявления лиц с наличием определенного заболевания при отсутствии клинических симптомов [1]. Конечной целью онкологического скрининга принято считать снижение смертности больных, а непосредственным результатом — обнаружение рака до момента клинического проявления. Многие исследователи подчеркивают, что, если скрупулезно подходить к определениям, скрининг не является диагностической процедурой [2, 10]. Главной задачей скрининга авторы считают формирование групп риска, имеющих наибольшую вероятность заболевания и подлежащих диагностическим исследованиям с целью отбора лиц, действительно являющихся носителями рассматриваемой патологии [2]. Таким образом, скрининг при-

нято относить к мерам профилактики или предупреждения рака.

С этих общих позиций при скрининге рака толстой кишки колоноскопию не следует относить к основной методике, как это принято считать, а к наиболее надёжному методу ранней диагностики рака толстой кишки. Колоноскопия не может широко использоваться в профилактических целях вследствие своего полуинвазивного характера, риска осложнений, а также высокой себестоимости для массовых обследований [5]. Кроме того, к проведению колоноскопии большинство людей относится с настороженностью ввиду ее полуинвазивности и понятного дискомфорта при исполнении. Ввиду этого обстоятельства, большую распространенность при скрининге рака

толстой кишки получили биохимические и иммуногистохимические тесты, идея которых основывается на обнаружении скрытой крови в фекалиях пациента [6]. 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 многие неонкологические заболевания [6]. В связи с этим, большие надежды возлагаются на использование методов молекулярной медицины для ранней диагностики и скрининга рака толстой кишки, среди которых, по последним данным, перспективны эпигенетические методики [4]. За последнее десятилетие изучения 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. Вместо того, чтобы вносить в гены мутации, эпигенетические факторы помечают их таким образом, что изменяется их активность – в некоторых случаях необратимо. Эпигенетические изменения наследственного материала не имеют ничего общего с мутациями. Гены, в которых закодирована информация о синтезе белков, состоят из нуклеотидов. Замена одного нуклеотида может привести к синтезу дефектного белка. Эпигенетические изменения влияют на активность генов. Химические группы – эпигенетические маркеры – присоединяются либо к самой ДНК, либо к гистоновым комплексам, на которые эта ДНК намотана. Замена маркеров или их отсоединение могут повлиять на поведение генов, при этом заключенная в них информация не изменяется. Некоторые эпигенетические маркеры подавляют активность генов, способствуя уплотнению помеченной ими области хроматина и экранированию ее от белков, которые считывают генетическую информацию. Плотные упакованные участки ДНК, погруженные вглубь хромосом, находятся в неактивном состоянии. К маркерам подобного типа относятся метильные группы [9].

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 в клетках или цитокинез. 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 [8]. В связи с этим, эпигенетические методы определения метилированной ДНК гена SEPT9 могут помочь в организации молекулярного скрининга колоректального рака.

Целью работы явилось изучение эффективности молекулярного скрининга рака толстой кишки путем определения эпигенетического маркера рака SEPT 9 в сыворотке крови и в образцах крови и клетках опухоли в кале.

У 39 больных (22 мужчин и 17 женщин) основной группы с подтвержденным по результатам колоноскопии раком толстой кишки определяли в крови наличие метилированной ДНК гена SEPT9 с помощью ПЦР. Для проведения методики использовали EpiProColontest, разработанный в лаборатории немецкой компании EpiGenomics. EpiProColontest конвертирует все деметилированные остатки цитозина, обнаруженной

в образце крови циркулирующей ДНК в тимин. После чего количество фрагментов, несущих метилированную ДНК гена SEPT9, увеличивается до количества, обнаруживаемого анализатором [7]. В контрольную группу включены 25 пациентов без опухолевых образований толстой кишки. У больных без предварительной подготовки для анализа была взята кровь в объеме 10 мл. Подготовка плазмы крови включала двукратное центрифугирование в течение 12 минут при 1350 ± 150 г с 0,05 М раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре. Далее образцы плазмы хранились при температуре $-15(-25)^\circ\text{C}$ до 7 дней. Фракцию циркулирующих ДНК, связанных с клеточной поверхностью, получали последовательной обработкой клеток 5ММ фосфатным буфером и 0,125 % раствором трипсина. Образцы ДНК модифицировали путем бисульфитной конверсии по стандартному протоколу по DevosT. et al. [7], очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «BisulfiteSSDNAlsolationKit» 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.

На следующем этапе у больных КРР метилированная ДНК гена SEPT9 определялась в кале и в образцах опухолей, полученных в результате биопсии при колоноскопии. Из кала выделяли слущенный эпителий толстой кишки, экстрагировали ДНК и умножали с помощью полимеразной цепной реакции ДНК опухолевых клеток.

У 17 пациентов из основной группы присутствовал такой клинический симптом как ректальное кровотечение. У этих больных образец крови брали из фекалий больных и также определяли метилированную ДНК гена SEPT9 методом ПЦР после центрифугирования.

Определение анализа на скрытую кровь в кале (СКК) проводили с помощью фотометрического анализатора SentiFob и теста FOB Gold. Метод основан на реакции агглютинации антиген-антитело между присутствующим в образце гемоглобином человека и анти-гемоглобин-антителом на латексных частицах. Агглютинация измерялась как увеличение при абсорбции в 570 нм, единица которой пропорциональна количеству гемоглобина человека в образце. Данный тест является полностью автоматическим. Специальная пробирка для сбора образцов разработана как прибор для сбора и одновременно как гигиеничный и практичный контейнер для образцов, помещаемый прямо в биохимические контрольные приборы.

Для оценки эффективности молекулярного скрининга рассчитывали диагностическую чувствительность и специфичность теста, диагностическую эффективность метода по общепринятым в доказательной медицине формулам. Все статистические процедуры проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0.

В случае апоптоза раковых клеток или при высвобождении ДНК из неповрежденных либо претерпевших канцерогенез клеток в плазму крови высвобождаются фрагменты ДНК, которые затем начинают свободно циркулировать в плазме крови. При высвобождении из раковой клетки свободно циркулирующая ДНК (цДНК) характеризуется присутствием маркеров онкогенов и специфическими мутациями онкосупрессоров [3]. В связи с этим, для обнаружения эпигенетических онкологических маркеров можно брать образцы крови.

В основной группе у больных КРР в сыворотке крови метилированная ДНК гена SEPT9 была обнаружена у 34 пациентов, а у



Таблица 1.

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

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 EpiColo составил 87,1%, диагностическая специфичность – 96%, диагностическая эффективность – 90,6%. Прогностическая ценность положительного результата в этой группе была 91,4%. В клиническом исследовании, проведенном Lofton-Day C. 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% [9].

Среди больных 1 основной группы 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 определялся 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. 1). Результаты EpiColo теста не зависели от локализации рака толстой кишки. В труднодоступных местах толстой кишки, где при колоноскопии существуют определенные затруднения для

выявления опухоли, положительные результаты молекулярного теста выявлялись в 100%.

Результаты определения эпигенетического маркера КРР сравнивали с анализом кала на скрытую кровь (СКК) с использованием иммуногистохимического теста FOB Gold. Тест FOB Gold позволяет точно определить количественное содержание гемоглобина в кале без предварительного соблюдения пациентами диеты [6]. Были проанализированы 7853 истории болезни компьютерной базы данных регионального консультативно-диагностического центра Ростовской области за 2008-2011 гг. У 265 больных был идентифицирован рак толстой кишки. Среди больных раком толстой кишки положительный тест на СКК встречался при уровне 50 нг/мл у 111 пациентов, а при уровне 100 нг/мл у 167 больных. Среди 7588 пациентов, у которых при колоноскопии был отвергнут диагноз злокачественного новообразования толстой кишки, количество пациентов с положительным результатом СКК при критическом рубеже 50 нг/мл было 384, а при уровне 100 нг/мл – 676. При рубеже 50 нг/мл из 384 пациентов, у 278 (72,4%) была диагностирована тубулярная аденома, у 35 (9,1%) – сложная аденома и у остальных 71 (18,5%) пациентов – воспалительные заболевания кишки. При втором критическом уровне 100 нг/мл из 676 пациентов тубулярные аденомы были диагностированы у 479 (70,9%) больных, сложные аденомы у 111 (16,4%) и воспалительные заболевания кишечника у 86 (12,7%) пациентов. Таким образом, диагностическая чувствительность теста FOB Gold у пациентов для выявления рака толстой кишки при уровне 50 нг/мл составила 41,9%, а при уровне 100 нг/мл – 63%. Таким образом, диагностическая чувствительность теста, основанного на выявлении эпигенетического маркера в крови, была выше по сравнению с результатами определения скрытой крови в стуле иммуногистохимическим методом.

ДНК трансформированных опухолевых клеток обнаруживается во внеклеточных ДНК, циркулирующих в плазме крови [3], в результате чего кровь используется для малоинвазивной диагностики опухолей. Встречаемость метилированной ДНК



в образцах опухолей должна возрастать. У 39 больных КРР детекция метилированного гена SEPT9 в клетках опухолей, полученных из фекалий, была достигнута у 36 больных (диагностическая чувствительность 92,3%), а при исследовании образцов опухоли в 38 наблюдениях (диагностическая чувствительность 97,4%). Следовательно, одним из способов оптимизации определения эпигенетических маркеров рака толстой кишки является исследование фекальных или биопсийных образцов опухолевой ткани.

У больных раком толстой кишки с ректальным кровотечением в крови из кала метилированный ген ДНК SEPT9 был выявлен у 16 пациентов из 17. Следовательно, диагностическая чувствительность метода возросла и составила 94,1%. При этом, из 16 больных рак был локализован в 12 наблюдениях в прямой и сигмовидной кишке, у 1 больного в нисходящей кишке, у 1 в селезеночном изгибе, у 2 в поперечной ободочной кишке. Следовательно, при подозрении на дистальный рак толстой кишки, целесообразно брать образцы крови из кала, что повышает диагностическую чувствительность теста EpiroColon.

Следовательно, внедрение новых эпигенетических методов для активного выявления группы риска по колоректальному раку является перспективным, что позволяет значительно повысить результативность скрининга рака толстой кишки.

Выводы

1. Определение в крови эпигенетического маркера рака толстой кишки метилированной ДНК гена SEPT9 является эффективным скрининговым мероприятием с диагностической чувствительностью 87,1%, диагностической специфичностью 96%, диагностической эффективностью 90,6%.
2. Диагностическая чувствительность определения в крови метилированной ДНК гена SEPT9 выше по сравнению с иммуногистохимическим методом анализа кала на скрытую кровь (87,1% против 41,9%).
3. Определение в крови метилированной ДНК гена SEPT9 эффективно при ранних стадиях рака толстой кишки, а также при проксимальной и дистальной локализациях опухоли, что

позволяет использовать эпигенетический тест при затруднениях проведения колоноскопии.

4. Оптимизация скрининга рака толстой кишки с помощью методов эпигенетики связана с определением метилированной ДНК онкомаркеров в крови и клеточных элементах опухолей фекального происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.В. Общие вопросы скрининга // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11, № 2. — С.53-59.
2. Егоренков В.В., Моисеенко Ф.В. Скрининг рака толстой кишки // Практическая онкология. — 2010.—Т. 11, № 2. — С.81-87.
3. Залетаев Д.В. Системы молекулярных маркеров в ДНК-диагностике онкозаболеваний // Молекулярная медицина. — 2005. — № 1. — С. 10–17.
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. 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. — P. 659-676.
6. 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 p.
7. Devos T., Tetzner R., Model F., Weiss G. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer // Clin. Chem. — 2009. — Vol. 55. — P. 1337-1346.
8. Itzkowitz S.H., Jandorf L., Brand R. Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening // Clin. Gastroenterol. Hepatol. — 2007 — Vol. 5, №1. — P. 111-117.
9. Lofton-Day C., Model F., Devos T. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening // Clin. Chem. — 2008 — Vol. 54, №2. — P. 414-423.
10. Screening for colorectal cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement // Ann. Intern. Med. — 2008 — Vol. 149. — P. 627–637.

НОВОЕ В МЕДИЦИНЕ. ИНТЕРЕСНЫЕ ФАКТЫ

УЧЕНЫЕ ИЗ АНГЛИИ ПРЕДЛОЖИЛИ ЛЕЧИТЬ ВОЗРАСТНУЮ ТУГОУХОСТЬ С ПОМОЩЬЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Специалисты английского Университета Кили будут лечить возрастную тугоухость с помощью стволовых клеток. Как сообщает The Daily Telegraph, серию соответствующих экспериментов приготовилась провести исследовательская группа под руководством Дэйва Фернесса (Dave Furness).

Исследователи выяснили, что возрастное снижение остроты слуха связано с ухудшением состояния фиброцитов. Они являются предшественниками фибробластов (зрелых клеток соединительной ткани). В улитке внутреннего уха фиброциты регулируют ионный состав жидкости, по которой распространяются звуковые колебания.

В настоящее время группа Фернесса выращивает культуру фиброцитов в лаборатории из стволовых клеток. На следующем этапе работы выращенные таким образом фиброциты будут пересажены во внутренне ухо пациентов с возрастным снижением слуха.

Исследователи обсуждают технику проведения соответствующего хирургического вмешательства. По словам ученых, в Великобритании насчитывается более девяти миллионов больных возрастной тугоухостью, это расстройство наблюдается у каждого второго британца старше 60 лет.

В феврале 2011 года австралийские специалисты предложили использовать аналогичную методику для лечения нейросенсорной тугоухости, которая обусловлена нарушением волосковых клеток — нейронов, воспринимающих колебания жидкости в каналах внутреннего уха. Они пересадили мышам стволовые клетки, которые должны были заменить поврежденные нейроны. Через месяц после трансплантации мыши смогли воспринимать значительно более тихие звуки, чем до операции.

Источник <http://www.medlinks.ru> / Опубликовано 29-12-2011