

*На правах рукописи*

**БУТРОВИЧ**

**Галина Михайловна**

**НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА  
НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДНК,  
ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ФЕКАЛИЙ**

Специальность: 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург– 2021

**Работа выполнена в** федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

**Научный руководитель:** кандидат химических наук доцент **Вострюхина Ольга Альбертовна**

**Официальные оппоненты:**

**Кушлинский Николай Евгеньевич**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, лаборатория клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. заведующий;

**Вонский Максим Сергеевич**, кандидат биологических наук, научно-исследовательского отдел государственных эталонов и стандартных образцов в области биоаналитических и медицинских измерений Федерального государственного унитарного предприятия «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева», и.о. руководителя.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «26» апреля 2022 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, дом 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков д. 54 и на сайте <https://www.nrscrm.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследований**

Колоректальный рак (КРР) – злокачественная опухоль из элементов эпителия толстой кишки. КРР занимает третье место по распространенности (6,1%) и второе по уровню смертности (9,2%) в мире (Schoen R.E., Machicado J.D., 2015) среди онкологических заболеваний. В России в 2015 году зафиксировано более 68000 случаев рака толстой кишки (Каприн А.Д. и др., 2015). На данный момент в лечебные заведения России поступают преимущественно пациенты с III-IV стадиями (в соответствии с TNM классификацией) колоректального рака. Это объясняется в первую очередь тем, что большинство случаев КРР диагностируется на поздних стадиях из-за бессимптомного протекания начала заболевания.

Для пациентов, у которых при начале хирургического лечения выявляют I стадию КРР, когда опухоль ограничена локализацией только в соответствующем органе, прогнозируемая 5-летняя выживаемость составляет около 90% (Etzioni et al., 2003). Тогда как для пациентов, заболевание которых выявлено только на IV стадии и начато соответствующее лечение, пятилетняя выживаемость составляет примерно 10% (Duffy et al., 2011).

Высокий уровень встречаемости колоректального рака и явная связь успешного излечения с ранней диагностикой заболевания объясняют необходимость регулярного обследования здоровых индивидуумов, особенно входящих в группу риска. По этой причине становится все более актуальной разработка неинвазивных методов ранней диагностики КРР, которые возможно использовать в скрининговых программах.

Нами предлагается способ диагностики КРР на основе изучения молекулярно-генетического состава ДНК, выделенной из фекалий, как маркера КРР, что представляется актуальной задачей клинической лабораторной диагностики.

### **Степень разработанности темы исследований**

Наиболее точным методом первичного выявления рака толстой кишки

является колоноскопия с последующей биопсией и гистологической верификацией. Однако этот метод и его возможные вариации, такие как сигмоскопия и др., травматичны для пациента и требуют определенной предварительной подготовки. Среди неинвазивных методов наиболее широко распространены тесты на скрытую кровь в фекалиях (GFOBT – тест на основе гваяковой смолы и FIT – иммунохимический тест).

Среди методов диагностики, связанных с анализом фекальной ДНК, наибольший интерес вызывают следующие. Фирмой Exact Sciences был разработан, но не внедрен в клиническую диагностику коммерческий набор, получивший название PreGenPlus (Berger et al., 2006). Данный тест был основан на анализе фекальной ДНК. В него входили маркер микросателлитной нестабильности генома, маркер оценки целостности ДНК и исследование 23-х возможных мутаций, локализованных в 3-х генах. Чувствительность предложенного набора для обнаружения КРР составила 59% - 69% при специфичности около 98%. Также этой компанией был разработан еще один коммерческий набор, основанный на анализе фекальной ДНК и названный Cologuard. В него входит набор маркеров: определение метилирования генов *NDRG4*, *BMP3*,  *$\beta$ -actin* (в качестве контроля) и семи мутаций в гене *KRAS*. Разработка была осуществлена Imperiale T.F. с соавторами (Imperiale et al., 2014). Данный тест показал высокую чувствительность и хорошую специфичность (92,3% и 89,8% соответственно), но обладает высокой себестоимостью и технической сложностью.

Коммерческий тест фирмы Diatech был разработан коллективом итальянских авторов и представлен в 2018 году (Rengucci et al., 2018; Rengucci et al., 2020). Тест основан на выявлении шести фрагментов ДНК от 139 до 344 п.н. (три фрагмента гена *APC* и три фрагмента гена *TP53*). Заявленная чувствительность теста составляет 80%. Упоминания в литературе о разработанных способах диагностики такого типа на территории России отсутствуют (Полянская и др., 2018).

### **Цель исследования**

Разработать способ неинвазивной диагностики колоректального рака методом анализа длины фрагментов ДНК в фекалиях на основе полимеразной цепной реакции.

#### **Задачи исследования**

1. Выбрать количество, размер и локализацию в геноме протяженных фрагментов ДНК, способных служить маркерами КРР.
2. Провести сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК, выделенной из фекалий больных КРР и здоровых волонтеров.
3. Разработать поэтапную схему предложенного способа диагностики.
4. Оценить зависимость эффективности разработанного способа диагностики от демографических данных пациентов и клинико-патологоанатомических характеристик опухолей.
5. Сравнить характеристики разработанного способа диагностики с характеристиками анализа на скрытую кровь (ИммуноХром-ГЕМ-Экспресс).

#### **Научная новизна**

Разработан и апробирован способ неинвазивной диагностики на основе выявления протяженных фрагментов ДНК в фекалиях пациентов. Впервые в качестве маркеров были использованы фрагменты 2-х генов, повреждения которых связаны с двумя разными путями развития КРР и редко встречаются одновременно.

Впервые был использован в качестве маркера КРР фрагмент ДНК более 2000 н.п., что обеспечило высокую специфичность способа диагностики.

Впервые проанализирована зависимость наличия протяженных фрагментов в фекалиях больных от клинико-патологоанатомических характеристик заболевания на территории Российской Федерации.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведена оценка значимости выявления протяженных (более 800 н.п.) фрагментов ДНК в фекалиях пациента для диагностирования КРР.

Показано, что при нарушении механизма апоптоза не подвергаются деградации при прохождении через кишечный тракт даже фрагменты ДНК

размером более 2000 н.п.

Показано, что наличие протяженных фрагментов ДНК в фекалиях не зависит от стадии и молекулярного патогенеза данного заболевания. Впервые была проанализирована зависимость наличия протяженных фрагментов опухолевых клеток кишечника в фекалиях от некроза, типа роста и локализации опухоли. Показана возможность использования метода для ранней диагностики КРР.

Возможность удаленного анализа пациента благодаря использованию стабилизирующего раствора и экономическая доступность метода (техническая выполнимость в любой ПЦР-лаборатории) делает его пригодным для широкомасштабного скрининга населения.

Предложен, апробирован и запатентован способ неинвазивной диагностики колоректального рака с целью внедрить его в клиническую практику.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработан способ диагностики колоректального рака на основе выявления фрагментов ДНК, молекулярный вес которых превышает 800 н.п., в фекалиях пациента.

2. Чувствительность предложенного способа диагностики не зависит от стадии и молекулярного патогенеза колоректального рака, и существенно выше при локализации опухоли в левом отделе толстой кишке.

3. Одновременное применение двух протяженных фрагментов ДНК, повреждения которых обычно взаимно исключают друг друга, повышает общую чувствительность диагностики по сравнению с использованием в качестве маркера одного фрагмента.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных в ходе работы результатов обеспечивается адекватными молекулярно-генетическими методами и хорошо охарактеризованной выборкой пациентов, достаточной для статистически значимых выводов. Результаты исследования коррелируют с данными,

опубликованными в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов.

Результаты работы были доложены на V Российском конгрессе по молекулярной медицине «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2020), IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2018), XVII Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2015), III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Угловские чтения: Инновации в хирургии» (Санкт-Петербург, 2015).

Работа поддержана грантами:

Программа Минобрнауки «Развитие научного потенциала высшей школы (2006-2008 годы)», грант № РНП. 2.2.1.1.4663 (соисполнитель);

Программа Минобрнауки «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)», грант № РНП. 2.2.1.1.1166 (соисполнитель);

Программа Минобрнауки «Развитие научного потенциала высшей школы (2011 год)», грант № РНП. 2.2.1.1.12882 (соисполнитель).

### **Публикации по результатам исследования**

По теме диссертационного исследования было опубликовано 16 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, содержащихся в перечне Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации, 1 патент на изобретение.

### **Личный вклад автора**

Диссертантом самостоятельно выполнен анализ зарубежной и отечественной литературы по теме исследования. Все этапы диссертационной работы, кроме забора материала, выполнены непосредственно автором. Диссертантом самостоятельно осуществлены статистическая обработка данных, интерпретация собранных материалов и сформулированы выводы, а также подготовлены публикации.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Тема работы, использованные материалы и методы, полученные результаты и выводы соответствуют паспорту специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика (пункты 1,6 и 7).

### **Внедрение результатов в практику**

Полученные результаты исследования внедрены в учебную работу кафедры хирургии госпитальной №2 с клиникой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова и в учебную работу Высшей школы биомедицинских систем и технологий СПбПУ.

### **Структура диссертации**

Диссертация изложена на 116-ти страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы, включающий 152 источника (из них 20 отечественных и 132 зарубежных). Работа содержит 23 рисунка и 16 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы.** *Отбор и транспортировка образцов.* Образцы фекалий были предоставлены ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» и ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр». Образцы были получены у 116 человек, из них 82 пациента с КРР и 34 добровольца без новообразований желудочно-кишечного тракта (контрольная группа).

Около 5 г фекалий было отобрано у каждого индивидуума. Пробу помещали в герметичный пластиковый контейнер, содержащий 1 мл буферного раствора 0,5 М ЭДТА при pH=8,0, транспортировали и хранили при +4°C. Выделение геномной ДНК производили в течение 24 часов после отбора пробы.

Для пациентов с КРР были предоставлены демографические данные, диагноз был подтвержден гистологически и получены клинко-патологоанатомические данные опухолей.



Наличие или отсутствие опухоли у пациентов и контрольной группы было установлено методом колоноскопии.

*Продолжительность срока и условия хранения образцов фекалий.* Была проанализирована эффективность метода диагностики в зависимости от продолжительности и условий хранения образцов фекалий. Десять образцов фекалий от пациентов с КРР и здоровых волонтеров инкубировали в течение десяти дней при +4°C с последовательным отбором части проб и выделением ДНК из них через каждые трое суток. Выделенная ДНК была охарактеризована методами спектрофотометрии и ПЦР с последующим электрофорезом. По итогам проделанной работы было рекомендовано хранить образцы до семи суток.

*Выделение ДНК.* Выделение геномной ДНК производили с использованием набора «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва).

*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 протяженных фрагмента: фрагмент гена *TP53* длиной 800 н.п. (*TP53* 800) и фрагмент гена *MLH1* длиной 2340 н.п. (*MLH1* 2340). Полимеразную цепную реакцию проводили при помощи набора «Encyclo Plus PCR kit» («Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

*Визуализация полученных результатов.* Для визуализации полученных продуктов амплификации проводили одномерный электрофорез в 6%-м ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра.

Для анализа полученных изображений использовали ПО ImageJ.

*Real-Time PCR.* Для образцов от 40 пациентов была проведена полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для проведения реакции использовали HS Taq ДНК-полимеразу («Евроген», Москва) при амплификации

коротких фрагментов (TP53 141 и BLM 153) и набор «Encyclo Plus PCR kit» при амплификации протяженных фрагментов (TP53 800 и MLH1 2340). Для визуализации результатов использовали интеркалирующий краситель SYBR Green I («Евроген», Москва). Реакцию проводили на детектирующем амплификаторе CFX96 (BioRad, США). В качестве стандарта в ПЦР-РВ применяли коммерческую ДНК человека («Евроген», Москва).

Анализ эффективности проводили с использованием программного приложения CFX96 («BioRad», США).

*Статистический анализ.* Для анализа данных использовали программу Graphpad Instat. Различия между группами считали достоверными на уровне 95% вероятности при  $p < 0,05$ .

ROC-кривые (англ. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve), помогающие оценить эффективность метода, были построены при помощи онлайн приложения (<http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html>), разработанного в Университете Джона Хопкинса (Балтимор, США).

Анализ на скрытую кровь проводили при помощи теста FIT (ИммуноХром-ГЕМ-Экспресс производства ООО «МЕД-Экспресс-Диагностика»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность выделять ДНК человека из образцов фекалий и проводить ее анализ была продемонстрирована за два последних десятилетия многочисленными группами исследователей (Carozzi et al., 2013). Колоректальные раковые клетки наряду с нормальными попадают в фекалии человека, предоставляя таким образом материал для исследования.

Отбор фекальных образцов у пациентов и условия их хранения до начала следующего этапа работы являются важным пунктом нашего протокола. Биомолекулы в фекальных массах подвергаются действию ряда активных соединений и разрушаются, соответственно, возможная деградация ДНК в образцах влечет за собой и снижение эффективности молекулярного анализа.

Помещение образцов фекалий в стабилизирующий буферный раствор в первые минуты после отбора пробы способно предотвратить разрушение ДНК и обеспечить пригодность образцов для анализа в течение более длительного промежутка времени. Нами предложены следующие условия хранения и транспортировки образцов фекалий, обеспечивающие максимальную их сохранность до 7-ми суток в буферном растворе 0,5 М ЭДТА при рН=8,0 и +4°C.

Для наиболее эффективного выделения ДНК было испытано пять различных методик.

Оптимальным вариантом выделения ДНК по нашим данным является метод с использованием набора «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Москва), который и применяли в дальнейшей работе.

Для ДНК, полученной из образцов фекалий, возможно ингибирование ПЦР примесями, встречающимися в пробах данного типа (Stauffer et al., 2008). С целью проверки успешности выделения ДНК и отсутствия ингибирования ПЦР предварительно производили амплификацию двух коротких фрагментов длиной менее 200 н.п. для ДНК, полученной из образцов пациентов с КРР и из контрольной группы. Полученные короткие ПЦР-фрагменты свидетельствуют о выделении достаточного количества ДНК для проведения дальнейших экспериментов (намножения протяженных фрагментов) и об отсутствии ингибирования ПЦР-реакции. Примеры полученных электрофореграмм представлены на рисунке 1.а.

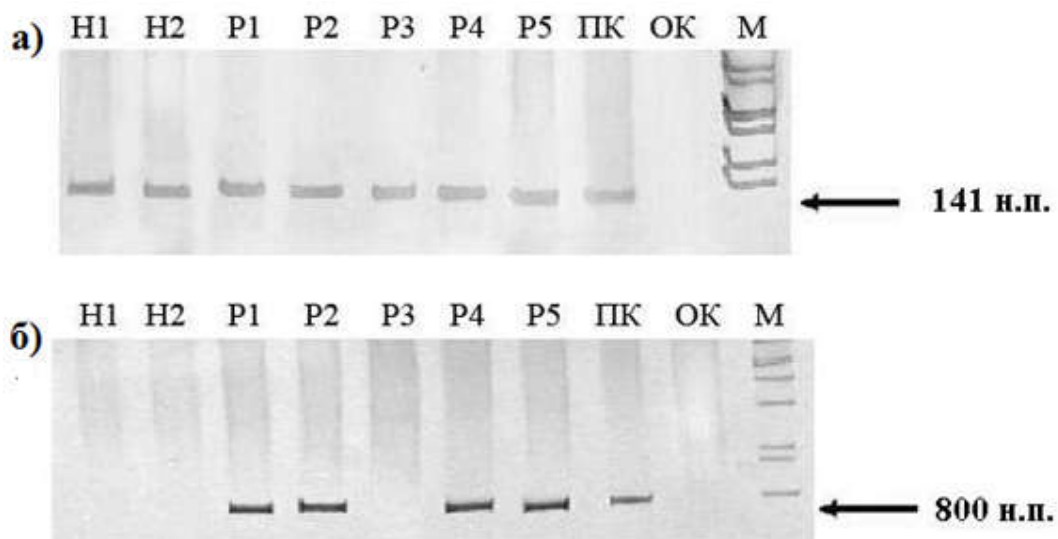


Рисунок 1. Примеры электрофоретического анализа продуктов амплификации фрагментов ДНК, выделенной из стула

H1, H2 – продукты амплификации ДНК, выделенной из стула здоровых индивидуумов; P1, P2, P3, P3, P5 – продукты амплификации ДНК, выделенной из стула пациентов с колоректальным раком; ПК– положительный контроль амплификации; ОК – отрицательный контроль амплификации; М – маркер молекулярного веса (DNA Ladder «Евроген», Москва).

а) TP 53 141 – фрагмент ДНК длиной 141 н.п. расположен в кодирующей области гена *TP53*);

б) TP53 800 – фрагмент ДНК длиной 800 н.п.

Амплификация коротких фрагментов происходила как в случае использования образцов ДНК, полученных из кала больных с колоректальным раком, так и здоровых индивидуумов. Интенсивность электрофоретических зон коротких фрагментов ДНК практически не отличалась у группы больных и контрольной группы (проанализировано при помощи ПО ImageJ).

Использование двух фрагментов из разных участков генома (BLM – фрагмент гена *BLM*, расположенного на хромосоме 15q26.1 и B9 – фрагмент гена *TP53*, расположенного на хромосоме 17p13.1) позволило повысить достоверность полученных результатов.

На следующем этапе методом ПЦР-анализа выявляли протяженные фрагменты ДНК, по присутствию которых судили о наличии у пациента КРР (Рисунок 1.б). Данные фрагменты ДНК были обнаружены в фекалиях 63-х из 82-х пациентов с КРР, в том числе фрагменты гена *TP53* – в 53-х случаях, гена *MLH1* – в 50-ти случаях. В контрольной группе из 34-х человек протяженные

фрагменты ДНК в фекалиях были выявлены в одном случае.

Визуализация результатов с помощью электрофореза является более наглядной, так как позволяет оценить длину фрагментов, в то время как использование ПЦР в реальном времени ускоряет процесс анализа. Результаты, полученные при анализе протяженных фрагментов с использованием ПЦР-РВ (группа из сорока пациентов), были идентичны результатам, полученным для той же группы пациентов при проведении стандартной ПЦР. Таким образом, была продемонстрирована возможность применения предлагаемого способа диагностики как с использованием техники ПЦР-электрофореза, так и техники ПЦР-РВ.

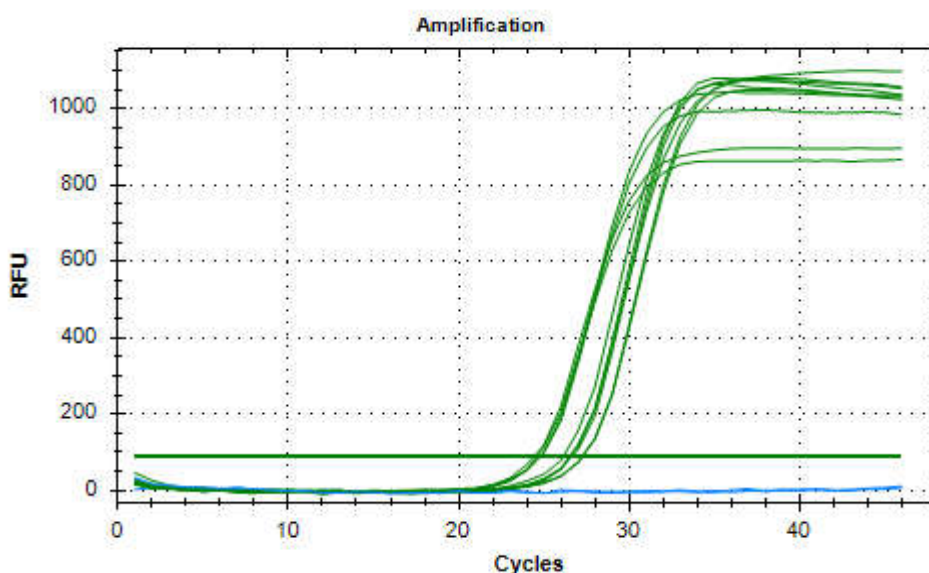


Рисунок 2. Кривые флуоресценции протяженного фрагмента TP53 для пяти образцов фекальной ДНК (краситель SYBR Green I)

Зеленые линии – продукты амплификации ДНК, выделенной из фекалий пациентов с колоректальным раком; синие линии – продукты амплификации ДНК, выделенной из фекалий здоровых индивидуумов (фрагмента TP53 800).

Были проанализированы эффективность амплификации и возможное ингибирование примесями в фекальной ДНК. Для расчета эффективности реакции применяли программное обеспечение Bio-Rad CFX. Эффективность ПЦР протяженных фрагментов составила 80-88 % для ДНК-матриц от разных биообразцов, что является хорошим показателем, учитывая большой размер фрагмента и то, что фекальная ДНК является сложным объектом для

амплификации.

Анализ возможного ингибирования ПЦР проводили в двух вариантах: последовательным разбавлением исходной матрицы и с использованием стандартов ДНК. По результатам проведенной работы можно говорить об отсутствии значимого ингибирования ПЦР. При проведении теста рекомендуется использовать полученный при выделении раствор ДНК без разбавлений.

Итоговая схема предлагаемого способа диагностики представлена на рисунке 3.

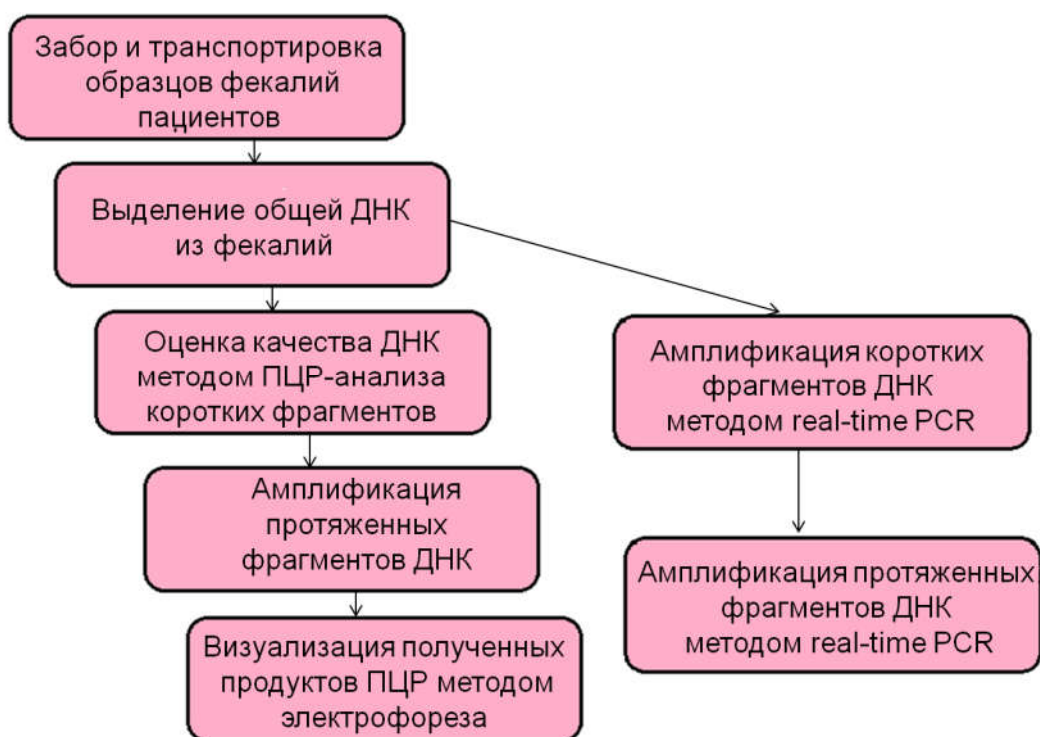


Рисунок 3. Основные этапы предложенного способа диагностики

Полученные результаты были статистически обработаны при помощи программы Graphpad Instat. Для пациентов, входящих в тестируемую группу, были подсчитаны следующие параметры:  $P$  - вероятность случайности (определенная с использованием точного метода Фишера), чувствительность, специфичность, позитивные и негативные предсказательные значения. Полученные данные представлены в таблицах 1,2 и 3.

Таблица 1. Статистические данные по стадиям заболевания и эффективности использования фрагментов генов в тесте

Параметры	Пациенты	Стадии заболевания		Фрагменты генов	
		I-II	III-IV	TP53	MLH1
Вероятность случайности ( $P$ ) <sup>1</sup>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Чувствительность <sup>2</sup> 95% CI	0,7683 0,6624 – 0,8541	0,7632 0,5980 – 0,8857	0,77270 0,6219 – 0,8854	0,6463 0,5325 – 0,7484	0,6098 0,4955 – 0,7160
Специфичность <sup>3</sup> 95%CI	0,9706 0,8467 – 0,9993	0,9706 0,8467 – 0,9993	0,9706 0,8467 – 0,9993	0,9706 0,8467 – 0,9993	0,9706 0,8467 – 0,9993
Позитивное предсказательное значение <sup>4</sup> 95% CI	0,9844 0,9161 – 0,9996	0,9667 0,8276 – 0,9992	0,9714 0,8508 – 0,9993	0,9815 0,9010 – 0,9995	0,9804 0,8955 – 0,9995
Негативное предсказательное значение <sup>5</sup> 95% CI	0,6346 0,4892 – 0,7640	0,7857 0,6315 – 0,8971	0,7674 0,6139 – 0,8824	0,5323 0,4008 – 0,6606	0,5077 0,3804 – 0,6338

Примечания:

- 1 - представлены значения вероятности ( $P$ ), определенной с использованием точного метода Фишера;
- 2 - чувствительность - доля истинных положительных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом;
- 3 - специфичность - доля истинных отрицательных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом; представлены средние значения и 95%-ный доверительный интервал.
- 4 - позитивное предсказательное значение - доля истинно положительных результатов среди всех положительных значений теста;
- 5 - негативное предсказательное значение - доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных значений теста.

Отдельно для фрагмента TP53 чувствительность составила 65%, а для фрагмента MLH1 61%.

При использовании двух фрагментов совместно чувствительность повышалась. Диагностические параметры для комплекса из двух маркеров составили соответственно 77% для чувствительности и 97% для специфичности ( $P < 0,0001$ ).

Для оценки эффективности теста были построены ROC-кривые (Receiver Operator Characteristic) и вычислены площади под ними (Area Under Curve, AUC) (см. Рис.4). Для обоих фрагментов совокупно величина AUC составляет

0,87, тогда как при использовании одного фрагмента площадь составляла 0,8 для TP53 800 и 0,79 для MLH1 2340.

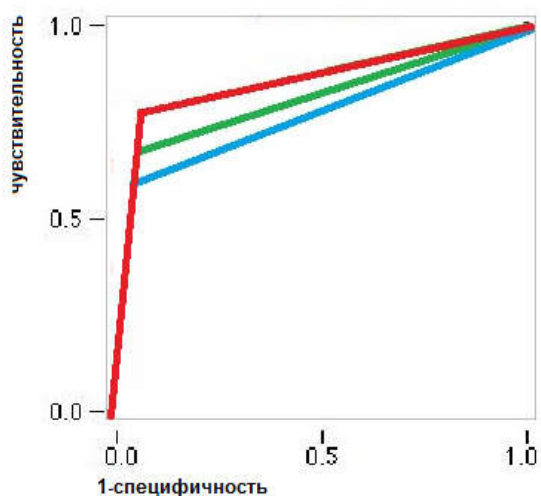


Рисунок 4. Характеристические ROC кривые, построенные для рассматриваемого метода

Примечания. Красная линия – кривая для двух фрагментов суммарно. Зеленая линия – для фрагмента TP53 800. Синяя линия – для фрагмента MLH1 2340.

Таблица 2. Статистические данные по полу и возрасту пациентов

Параметры	Пациенты	Возраст		Пол	
		>50 лет	<50 лет	Ж	М
Вероятность случайности ( $P$ ) <sup>1</sup>	<0,0001	< 0.0001	< 0.0001	<0,0001	<0,0001
Чувствительность <sup>2</sup> 95% CI	0,7683 0,6624 – 0,8541	0,7813 0,6603 – 0,8748	0,7222 0,4655 – 0,9030	0,7895 0,6264 – 0,9044	0,7500 0,5971 – 0,8681
Специфичность <sup>3</sup> 95% CI	0,9706 0,8467 – 0,9993	0,9706 0,8467 – 0,9993	0,9706 0,8467 – 0,9993	1,000 0,8317 – 1,000	0,9286 0,6611 – 0,9982
Позитивное предсказательное значение <sup>4</sup> 95% CI	0,9844 0,9161 – 0,9996	0,9804 0,8955 – 0,9995	0,9286 0,6611 – 0,9982	1,0000 0,8843 – 1,000	0,9706 0,8467 – 0,9993
Негативное предсказательное значение <sup>5</sup> 95% CI	0,6346 0,4892 – 0,7640	0,7021 0,5510 – 0,8267	0,8684 0,7195 – 0,9558	0,7143 0,5135 – 0,8676	0,5417 0,3285 – 0,7448

Примечания: см. примечания к Таблице 1

С уровнем статистической достоверности более 95% не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода для



пациентов с I–II (76%) и III –IV (77%) стадией ( $P=1,0000$ ), что демонстрирует возможности метода для ранней диагностики КРР.

С уровнем статистической достоверности более 95% не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода для пациентов разного возраста ( $P=0,7523$ ) и пола ( $P=0,7948$ ).

Многими исследователями показано, что правосторонний и левосторонний рак толстой кишки имеют различную клиническую картину и биологические особенности и должны рассматриваться как два различных заболевания. Мы проанализировали зависимость чувствительности разработанного метода диагностики КРР от локализации опухоли (Бутрович и др., 2018). Для получения статистически достоверного результата объединили данные по сигмовидной, слепой, поперечно-ободочной, восходящей ободочной и нисходящей ободочной кишке. В нашей выборке встречаемость КРР, определенная методом колоноскопии в разных отделах, была следующей: прямая кишка – 59 %, остальные отделы толстой кишки – 41%. Выявлена статистически значимая разница в чувствительности метода диагностики для прямой кишки по сравнению с другими отделами толстой кишки ( $P=0,0314$ )– 85% против 65 % (Табл. 3). Это в определенной степени ожидаемый результат, принимая во внимания принцип действия рассматриваемого метода.

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 расщепляется сильнее. Это и определяет несколько меньшую чувствительность метода для опухолей, локализованных в проксимальных отделах кишечника.

Таблица 3. Статистические данные по клинико-патологоанатомическим характеристикам опухолей

Параметры	Локализация		Некроз		Направление роста	
	Прямая кишка	Остальные отделы толстой кишки	Есть	Нет	Экзо	Эндо
Вероятность случайности ( $P$ ) <sup>1</sup>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Чувствительность <sup>2</sup>	0,8542	0,6471	0,8868	0,5517	0,8000	0,7188
95% CI	0,7221 – 0,9394	0,4647 – 0,8026	0,7695 – 0,9573	0,3570 – 0,7357	0,6631 – 0,8998	0,5325 – 0,8627
Специфичность <sup>3</sup>	0,9706	0,9706	0,9706	0,9706	0,9706	0,9706
95% CI	0,8467 – 0,9993	0,8467 – 0,9993	0,8467 – 0,9993	0,8467 – 0,9993	0,8467 – 0,9993	0,8467 – 0,9993
Позитивное предсказательное значение <sup>4</sup>	0,9762	0,9565	0,9792	0,9412	0,9756	0,9583
95%CI	0,8742 – 0,9994	0,7807 – 0,9989	0,8893 – 0,9995	0,7133 – 0,9985	0,8715 – 0,9994	0,7886 – 0,9989
Негативное предсказательное значение <sup>5</sup>	0,8250	0,7333	0,8462	0,7174	0,7674	0,7857
95% CI	0,6722 – 0,9266	0,5808 – 0,8541	0,6945 – 0,9413	0,5658 – 0,8403	0,6139 – 0,8824	0,6315 – 0,8971

Примечания: см. примечания к Таблице 1.

Чувствительность метода диагностики КРР при выявленном в опухоли некрозе составила 89 %, а в отсутствие некроза – 55%; однако статистически значимых различий между чувствительностью метода для пациентов с некрозом опухоли и без него ( $P=0,0562$ ) не выявлено. Тем не менее, можно говорить о наличии выраженной тенденции повышения чувствительности в случае некроза.

Не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода в отношении опухолей с эндофитным или экзофитным ростом ( $P=0,4302$ ).

Метод, который обеспечивает анализ целостности ДНК в образцах фекалий пациентов, позволяет проводить неинвазивную диагностику колоректального рака. Степень сохранности ДНК в таких образцах напрямую зависит от корректной работы апоптотических механизмов. Поскольку одной из характеристик осуществления апоптоза может быть расщепление ДНК на фрагменты около 200 н.п. (Boynnton et al., 2003), наличие высокомолекулярных фрагментов ДНК в стуле раковых больных может указывать на то, что определенная популяция клеток избежала апоптоз-индуцированной деградации ДНК. Одно из возможных предположений состоит в том, что это явление может быть следствием защиты от нуклеаз. Хроматиновая структура раковых клеток не может быть деградирована и, таким образом, ДНК оказывается недоступной для вызванного нуклеазами расщепления.

Процедура диагностики КРР, основанная на анализе целостности фекальной ДНК, привлекла внимание исследователей быстротой, дешевизной и возможностью проводить неинвазивную диагностику КРР.

В работе Yehya A.H. с соавторами (Yehya et al., 2012) для анализа протяженных фрагментов ДНК использовали фрагмент гена *TP53* (1476 н. п.), при этом чувствительность и специфичность метода при выявлении КРР составили 56,3% и 100% соответственно.

В данном исследовании для определения целостности геномной ДНК в качестве маркеров используются два протяженных (молекулярный вес которых превышает 800 н.п.) фрагмента (генов *TP53* и *MLH1*), что обеспечивает более высокую чувствительность теста. Целесообразность применения двух маркеров связана с наличием двух преимущественных путей развития КРР, в которые вовлечены две разные группы генов. Характерными представителями этих путей и являются гены *TP53* и *MLH1*, одновременное повреждение которых встречается с небольшой вероятностью (Fearon, 2011). Так, если у пациента поврежден ген *TP53*, фрагмент этого гена может не амплифицироваться, однако в предложенном нами тесте будет выявляться фрагмент гена *MLH1*, что уменьшает вероятность ложноотрицательного заключения (Бутрович и др.,

2016; Бутрович и др., 2017). В исследовании Zhang Y. с соавторами (Zhang et al., 2015) для скрининга КРР проводили ПЦР-анализ протяженных (800 п. о.) фрагментов генов *APC*, *KRAS*, *BRAF* и *TP53*. Чувствительность анализа для диагностики КРР с использованием комбинации из четырех фрагментов была выше чем при использовании каждого фрагмента по отдельности. Тем не менее, общая чувствительность не превысила 56%. Специфичность составила 96% ( $P < 0,0001$ ).

Высокая специфичность в упомянутых работах объясняется в том числе и выбором фрагмента высокой протяженности, что, возможно, снижает чувствительность, но задает высокий порог для отсеивания ложно положительных результатов.

Было проведено сравнение предлагаемого теста с таким вариантом диагностики КРР, как FIT. Анализ был проведен для 30-ти пациентов с диагнозом КРР и контрольной группы. На основе полученных результатов были подсчитаны чувствительность и специфичность с использованием критерия Фишера. Чувствительность составила 73,3 %, специфичность 90% ( $P=0,0007$ ). Кроме того, была построена ROC-кривая и подсчитана площадь под ней (см. рисунок 5).

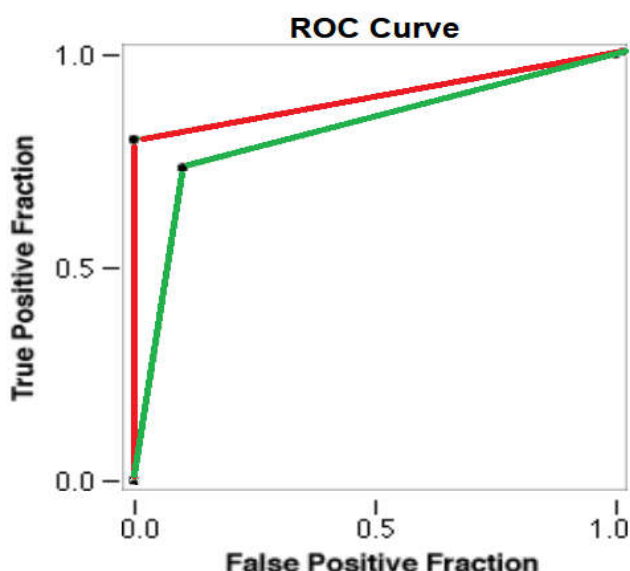


Рисунок 5. Характеристические ROC кривые, построенные для рассматриваемого метода и теста FIT. Красная кривая- метод протяженных фрагментов. Зеленая кривая - тест FIT.

Для теста на скрытую кровь величина AUC была равна 0,82, что согласуется с данными литературы; так, в работе Guimaraes значение AUC для FIT составила 0,8 (Guimaraes et al., 2019). Для разработанного в данном исследовании метода протяженных фрагментов значение AUC составляет 0,87. Данные результаты позволяют говорить о большей эффективности метода протяженных фрагментов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Фрагменты ДНК размером более 800 п. н. встречаются преимущественно в фекалиях людей со злокачественными новообразованиями из эпителиальной ткани толстой кишки. Фрагменты ДНК размером менее 200 н.п. выявляются как в фекалиях людей, больных колоректальным раком, так и у людей, не имеющих новообразований толстой кишки.

2. Одновременное применение двух протяженных фрагментов ДНК, повреждения которых обычно взаимно исключают друг друга, повышает общую чувствительность диагностики по сравнению с использованием в качестве маркера одного фрагмента.

3. Разработан способ неинвазивной ПЦР-диагностики колоректального рака, основанный на оценке целостности ДНК, имеющейся в фекалиях пациента. Он включает способ хранения и транспортировки образцов, позволяющий дистанционный анализ пациента, выделение ДНК из фекалий и анализ ее целостности.

4. Чувствительность разработанного способа диагностики составила 77%, а его специфичность 97%. На чувствительность разработанного теста не оказывают влияние возраст, пол пациентов и направление роста опухоли (экзофитный или эндофитный тип), а также стадия заболевания, что делает возможным раннее выявление данной патологии.

5. Чувствительность разработанного способа диагностики зависит от локализации новообразования в толстой кишке. При локализации опухоли в прямой кишке чувствительность выше и составляет 85%.

6. Произведено сравнение эффективности разработанного способа

диагностики и теста на скрытую кровь (ИммуноХром-ГЕМ-Экспресс). Площадь AUC под характеристическими кривыми составляет 0,87 для представленного теста и 0,82 для теста на скрытую кровь, что свидетельствует о большей эффективности метода протяженных фрагментов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Терапевтам, хирургам, гастроэнтерологам и онкологам в рамках установленных сроков диспансеризации для всего населения, а также при обследовании лиц из группы риска развития КРР (возраст более пятидесяти лет, наследственные синдромы, отягощенный семейный анамнез, перенесенный ранее колоректальный рак или полипы, воспалительные заболевания кишечника) рекомендуется использовать способ диагностики на основе анализа протяженных фрагментов ДНК в фекалиях пациентов в качестве альтернативы (или дополнительно) к анализам кала на скрытую кровь (FOBT или FIT). Обнаружение протяженных фрагментов в кале пациентов свидетельствует о возможном наличии злокачественных новообразований эпителиального происхождения в толстой кишке пациента с 77%-ой чувствительностью и 97%-ой специфичностью. Следует учитывать, что тест обладает меньшей чувствительностью при выявлении новообразований в верхних отделах кишечника. В случаях положительного результата ДНК-теста, независимо от результата теста на скрытую кровь, если оба теста были использованы совместно, рекомендуется назначение фиброколоноскопии.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

В качестве следующего этапа работы планируется дальнейшая апробация предложенного способа диагностики методом двойного слепого тестирования на базе поликлиники СПб больницы РАН.

Отдельно планируется оценить эффективность разработанного теста на группе пациентов с доброкачественными новообразованиями толстой кишки.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи, опубликованные в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых российских научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика**

1. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Хабарова И. Г., Вострюхина О.А. Неинвазивная диагностика колоректального рака: молекулярно-генетический анализ фекальной ДНК // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П.Павлова. – 2014. – Т.21. – С.8-13.

2. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Грозов Р.В., Хабарова И.Г., Вострюхина О.А. ПЦР-анализ фекальной ДНК для скрининга колоректального рака // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П.Павлова. – 2014– Т.21. – С. 58-59.

3. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вербенко В.Н., Хабарова И.Г., Вострюхина О.А. Разработка ПЦР-диагностики колоректального рака на основе целостности ДНК, выделенной из фекалий пациента // Клиническая лабораторная диагностика – 2017. – Т.62. – С.359-362.

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень SCOPUS:**

4. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вербенко В.Н., Хабарова И. Г., Вострюхина О.А. Чувствительность метода диагностики колоректального рака в зависимости от клинко-патологоанатомических характеристик опухоли // Цитология – 2018. – Т.60. – С.524-526.

### **патент**

5. Бутрович Г.М., Вербенко В.Н., Вострюхина О.А., Киль Ю.В., Киселева Е.В., Мирлина Е.Д., Хабарова И. Г. Способ неинвазивной диагностики колоректального рака // Патент на изобретение №2586775, Россия. – 2016.

### **Тезисы**

6. Бутрович Г.М., Гуляев А.В., Вострюхина О.А. Фекальное тестирование ДНК для диагностики колоректального рака // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2010». – 2010. – С.20-23.

7. Бутрович Г.М., Вострюхина О.А. Диагностика колоректального рака методом анализа протяженных фрагментов ДНК, выявленной в стуле пациентов // Научно-практическая конференция с международным участием «Биохимия–Биофизика–Информатика–три кита лабораторной медицины XXI века». Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум». – 2011. –Т. 2(38). – С.87.

8. Бутрович Г.М., Вострюхина О.А. Выявление ассоциированных с колоректальным раком повреждений ДНК, выделенной из стула пациентов // Материалы III научной конференции «Молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня» (Бреслеровские чтения – III). – 2011.

9. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д. Анализ целостности ДНК, выделенной из стула пациентов, в диагностике колоректальных карцином // Тезисы докладов XXV Международной зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – 2013. – Т.1. – С.114.

10. Бутрович Г.М. Диагностика карцином кишечника методом анализа целостности ДНК, выделенной из стула пациентов // Сборник научных трудов ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова». Тезисы докладов конференции молодых ученых – 2013. – С.7-9.

11. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Хабарова И.Г., Вострюхина О.А. Неинвазивная ПЦР-диагностика колоректального рака // Программа и научные труды Научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА. – 2016. – С. 32-33.

12. Бутрович Г.М. Молекулярный тест для скрининга колоректального рака // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. – 2016. – С.25-26.

13. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вострюхина О.А. Влияние клинко-патологоанатомических характеристик опухоли на чувствительность неинвазивной ПЦР-диагностики колоректального рака // Успехи молекулярной онкологии. Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5(4). – С.114.

14. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вострюхина О.А. Диагностика рака толстой кишки на основе целостности молекул ДНК // Актуальная биотехнология. – 2019. – Т. 30(3). – С.395-396.

15. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Хабарова И.Г., Вострюхина О.А. Ранняя диагностика колоректального рака на основе анализа молекул ДНК в фекалиях пациентов // Евразийский онкологический журнал – 2020. – Т8. Пр. 2. – С.793-794.

16. Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Хабарова И.Г., Вербенко В.Н., Вострюхина О.А. ПЦР-анализ фекальной ДНК для диагностики колоректального рака. – Сборник материалов V российского Конгресса по молекулярной медицине «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное». – 2020. – С.46-47.