

УДК 616.349/35-006.6-074

Эволюция копро-тестов в активном выявлении колоректального рака

В.И. Чиссов, Н.С. Сергеева, Е.В. Зенкина, Н.В. Маршутина

ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена»
Минздравсоцразвития РФ, отделение прогноза эффективности консервативного лечения

Evolution of copro-tests in active detection of colorectal cancer

V.I. Chissov, N.S. Sergeyeva, Ye.V. Zenkina, N.V. Marshutina

Federal State government-financed institution «Hertsen Moscow oncological scientific research institute»,
Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, department of prognosis
of conservative treatment efficacy

Цель обзора. Представить современное состояние проблемы активного выявления группы риска наличия *колоректального рака* (КРР) с помощью лабораторных методов скринингового типа – биохимических и иммуноферментных.

Основные положения. Высокая заболеваемость и смертность в мире от КРР обуславливают важность активного выявления данного заболевания, при этом первым этапом обследования предполагается использование неинвазивных лабораторных методов. Показано, что биохимические тесты для выявления скрытой крови в кале (гемоккульт-тесты) – гваяковая проба Вебера (gFOBT) и реакция Грегерсена, при соблюдении условий подготовки к анализу, пригодны для активного выявления КРР и некоторых других заболеваний желудочно-кишечного тракта. Однако низкая специфичность биохимических тестов и необходимость длительной подготовки к анализу ограничивают их применение в клинической практике. Поиски лабораторных подходов, позволяющих преодолеть это ограничение, привели к разработке нескольких качественных (экспресс) и количественных иммуноферментных анализов для выявления гемоглобина в кале (FIT).

Существенным отличием иммуноферментных тестов от биохимических является использование

The aim of review. To present state-of-the-art in active detection of risk group for *colorectal cancer* (CRC) by screening laboratory methods – biochemical and immunoenzyme.

Key points. The high morbidity and a mortality in the world from CRC makes active detection of this disease very important, thus the first stage of investigation supposes application of non-invasive laboratory methods. It was demonstrated, that biochemical methods for fecal occult blood testing (hemoccult tests) – guaiac Weber's test (gFOBT) and Gregersen test, at adherence to rules of procedure technique, are applicable for active detection of CRC and some other gastro-intestinal diseases. However, low specificity of biochemical tests and necessity of long preparation for analysis limit their clinical application. Searches of the laboratory methods, that allow to overcome this restriction, resulted in development several qualitative (rapid) and quantitative enzyme-linked immunoassays for detection of hemoglobin in feces (FIT).

Essential difference of immunoenzyme tests from biochemical is application of antibodies, specific to human hemoglobin and complex of human hemoglobin with haptoglobin. These tests are deprived of some disadvantages of biochemical method. Besides that, detection of the tumor-specific pyruvate kinase type M2

Чиссов Валерий Иванович – академик РАМН, профессор, директор ФГБУ МНИОИ им. П.А. Герцена Минздравсоцразвития РФ

Сергеева Наталья Сергеевна – доктор биологических наук, профессор, руководитель отделения прогноза эффективности консервативного лечения

Маршутина Нина Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения прогноза эффективности консервативного лечения

Зенкина Евгения Викторовна – младший научный сотрудник отделения прогноза эффективности консервативного лечения. Контактная информация: prognos.06@mail.ru; 125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, д. 3

Zenkina Evgeniya V. – junior research associate, department of prognosis of conservative treatment efficacy. Contact information: prognos.06@mail.ru; 125284, Moscow, 2-nd Botkinsky proezd, 3

антител, специфичных к гемоглобину человека и комплексу гемоглобина человека с гаптоглобином. Эти тесты лишены ряда недостатков биохимического метода. Кроме того, известен метод выявления в кале опухолевой формы пируваткиназы М2-типа (fTu M2-PK), которая, как продемонстрировано в ряде исследований, также может использоваться в скрининговых программах, направленных на активное выявление КРР.

Заключение. В настоящее время имеется ряд копро-тестов, перспективных для использования в качестве лабораторных методов скринингового типа для активного выявления групп повышенного риска наличия КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, копро-тест, гемокульт-тест, fTu M2-PK.

in feces (fTu M2-PK) also can be used in the screening programs for active detection of CRC, as it was shown in series of studies.

Conclusion. Now series of copro-tests are available, that are promising for application as screening laboratory methods for active detection of high risk groups for CRC.

Key words: colorectal cancer, copro-tests, hemocult test, fTu M2-PK.

Колоректальный рак (КРР) относится к социально значимым злокачественным новообразованиям, занимающим одно из лидирующих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности как в западных странах, так и в России [6]. Кумулятивный риск КРР в течение жизни составляет 5–6% [6, 23]. Это является обоснованием разработки Национальных скрининговых программ для его активного/раннего выявления [18, 21, 35]. В первой линии таких программ рассматриваются два основных подхода к формированию группы риска наличия КРР или предраковых состояний: использование копро-тестов, выявляющих скрытую кровь в кале, и *фиброколоноскопия* (ФКС) [73].

ФКС, несмотря на высокую специфичность, возможность визуализации и взятия биоптата, как скрининговый метод обладает рядом недостатков — большой сложностью, высокой стоимостью и главное недостаточной чувствительностью. Так, в ряде работ показано, что чувствительность ФКС не превышает 50% из-за низкой выявляемости новообразований проксимальных отделов кишки [44, 53, 57, 62, 64]. В целом количество так называемых «интервальных КРР» (т. е. обнаруживаемых в течение года после ФКС) близко к количеству опухолей, выявленных при ФКС [53, 62]. Ряд исследователей полагают, что это частично вызвано и с нерадикальностью удаления аденом (нераспознанным малигнизированных) в процессе первой скрининговой ФКС [58, 66].

В связи со сказанным при разработке первых этапов скрининговых программ в настоящее время акцент смещается в сторону копро-тестов, центральное место среди которых занимают методики обнаружения скрытой крови в кале. Основанием для разработки колопроктологических тестов, направленных на активное распознавание КРР, является то, что колоректальные аденомы и карциномы в той или иной степени кровоточат, что может быть

выявлено в кале задолго до появления клинической симптоматики.

Биохимические тесты для определения скрытой крови в кале

Уже более 20 лет назад в ряде российских и зарубежных работ было показано, что биохимический тест на обнаружение скрытой крови в кале при соблюдении условий подготовки к анализу пригоден для активного выявления КРР и некоторых других заболеваний *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ). Исторически для этих целей первой была предложена *гваяковая проба* (gFOBT — guaiac fecal occult-blood test, или гемокульт-тест), основанная на выявлении в кале гемоглобина по его псевдопероксидазной активности [4]. Применяемая для этого методика основана на том, что гемоглобин обладает свойствами катализатора окислительно-восстановительных реакций. Подбирают такие пары окислителей с восстановителями, реакция между которыми происходит только при наличии катализатора, в частности гемоглобина.

Показано, что гваяковая проба (Вебера — Ван-Деена) становится положительной в кале при кровопотере объемом 30–50 мл. При ее проведении 3–5 г кала растирают с уксусной кислотой в количестве, достаточном для получения полужидкой кашицы, из которой получают эфирный экстракт. Затем прибавляют к нему пероксид водорода и титруют свежеприготовленной настойкой гваяковой смолы. В присутствии крови появляется синее или фиолетовое окрашивание [4, 10].

Установлено, что при проведении скрининга среди формально здорового населения от 2 до 6% обследованных имеют положительный гемокульт-тест. При их дообследовании КРР выявляется не более чем в 5–10%, а аденомы — в 20–40%. В 50–70% позитивных случаев тест таким образом

оказывался ложноположительным [8]. В то же время в нескольких рандомизированных контролируемых скрининговых исследованиях по выявлению КРР с использованием gFOBT, проводившихся в Германии, США, Японии, было показано, что раннее обнаружение КРР с помощью этого теста возможно, а в выявленной когорте наблюдалось снижение смертности от этого заболевания на 15–33% в сравнении с общей популяцией [15, 25, 36, 39, 52].

С 1977 г. гемокульт-тест стал, например в ФРГ обязательным стандартным методом массового обследования населения [8]. К основным его достоинствам следует отнести простоту в исполнении и относительную дешевизну. Однако практически все авторы отмечали недостаточную чувствительность gFOBT (менее 30% для КРР и 15% — для аденом) и много ложноположительных результатов (т. е. низкую специфичность), что в определенной мере ограничивало его широкое применение в рутинной клинической практике [22, 51].

В проведенных исследованиях были выявлены и другие недостатки гемокульт-теста. Прежде всего поскольку тест gFOBT как биохимическая реакция выявляет гемоглобин не только человека, но и животных, это требует при подготовке к анализу соблюдения диеты, исключающей мясную пищу в течение нескольких дней. Кроме того, псевдопероксидазной активностью обладает не только гемоглобин, но и ряд компонентов растительной пищи (редиса, хрена, брокколи и др.), что диктует дополнительные ограничения в питании в течение нескольких суток, предшествующих анализу. Для исключения части ложноположительных результатов некоторые авторы предлагают при позитивном тесте повторить его еще дважды, более строго соблюдая диету [30, 72]. Очевидно, что положительная реакция кала на скрытую кровь может встречаться и у больных с варикозно-расширенными венами пищевода, эрозивным эзофагитом и пептическими язвами пищевода, при обострении язвенной болезни, эрозивном гастродуодените, опухолях и дивертикулах желудка, при дивертикулезе кишечника, болезни Крона, неспецифическом язвенном колите, гельминтозах, болезнях крови и других заболеваниях, которые необходимо исключать при оценке результатов пробы. Положительной эта проба может стать и при носовых кровотечениях, кровотечениях из десен и глотки [2]. При этом отрицательные результаты не исключают полностью возможность эрозивно-язвенного или опухолевого поражения органов ЖКТ, так как кровотечения из изъязвленных участков носят интермиттирующий характер [10, 11].

С целью повышения чувствительности биохимического метода для выявления скрытой крови в кале немецким ученым М. Греггерсеном была разработана модификация гваяковой пробы — бензидиновая проба («реакция Греггерсена») с использо-

ванием бензидина вместо гваяковой смолы и пероксида бария вместо перекиси водорода [2, 3, 33].

Бензидин (4,4'-диаминодифенил) впервые был получен Н.Н. Зининым в 1845 г. и традиционно используется в аналитической химии для качественного и количественного выявления ряда окислителей. В медицинской практике бензидин нашел применение для обнаружения следов крови. В основе методики лежит способность окисления бензидина пероксидом бария при каталитическом содействии гемоглобина с появлением синей или зеленой окраски [7].

В наиболее простой качественной модификации этой реакции неразведенный кал тонким слоем наносят на предметное стекло и покрывают его реактивом Греггерсена (приготовленная *ex tempore* смесь равных количеств 1% раствора бензидина в 50% уксусной кислоте и пероксида водорода). При наличии крови появляется зеленое или синее окрашивание, которое тем ярче и быстрее проявляется, чем больше примесь крови. Реакция Греггерсена становится положительной уже при кровопотере объемом 2–5 мл, т. е. более чувствительна, чем гваяковая проба [2, 3].

В части работ [20, 26, 51], посвященных изучению диагностической чувствительности биохимических тестов на скрытую кровь в кале, был использован более чувствительный полуколичественный тест Hemoccult SENSE. В клинических исследованиях с применением этого теста приняли участие более 339 000 человек. Смертность от КРР в группе обследованных снизилась по сравнению с необследованным населением более чем на 33% при проведении теста 1 раз в год и на 15–21% при его выполнении 1 раз в 2 года [52]. Чувствительность биохимических методов в отношении КРР составила 90% при ежегодном проведении анализа в когорте старше 50 лет [20, 26]. В целом проспективные рандомизированные контролируемые исследования, продолжавшиеся более 18 лет, показали, что биохимические тесты на скрытую кровь эффективны для выявления крови в кале как одного из ранних признаков КРР [20, 26, 36, 47, 51].

В одной из пяти скрининговых программ Великобритании, посвященных КРР, используется около 1 млн gFOBT-наборов ежегодно [18]. Применяемые gFOBT-наборы состоят из 6 тестовых полосок для исследования кала на скрытую кровь. При позитивном результате первого gFOBT-набора (наличии 5 или 6 положительно окрашенных полос) обследуемого направляли на ФКС. При наличии от 1 до 4 окрашенных полос результат считался сомнительным и обследуемому выдавали еще один gFOBT-набор. При наличии окрашенных 1 или более полос второго gFOBT-набора обследуемого также направляли на ФКС; при отрицательных результатах второго gFOBT-набора выдавался третий gFOBT-набор. В слу-

чае негативных результатов второго и третьего gFOBT-наборов скрининговый эпизод считали закрытым. Таким образом, в целом применение многоступенчатого первого этапа скрининга с использованием gFOBT оправдывает себя ввиду частичного снижения количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов [18].

Тем не менее, широкое использование в клинике биохимических тестов на выявление скрытой крови в кале все-таки ограничивается необходимостью длительных ограничений при подготовке к анализу и большим процентом ложноположительных результатов, причины которых систематизированы выше.

Иммуноферментные тесты для выявления скрытой крови в кале

Поиски лабораторных подходов, позволяющих преодолеть ограничения, свойственные биохимическому методу, привели к разработке нескольких качественных (экспресс) и количественных, основанных на *иммуноферментном анализе* (ИФА), тестов для выявления гемоглобина в кале с первоначально обозначенным общим названием iFOBT (immunochemical fecal occult-blood test) или FIT (fecal immunochemical test) — рекомендованным в настоящее время.

Использование FIT-систем с разной аналитической чувствительностью к разным эпитопам гемоглобина, разных буферов для разведения кала закономерно заставляет унифицировать способы обработки проб, протоколы анализов, а также интерпретацию результатов, что и было предложено Рабочей экспертной группой (EWG) на очередном съезде Всемирной организации эндоскопистов (WEO) в Сан-Диего в 2012 г., посвященном скринингу КРР. Рекомендовано применять условные обозначения качественного — *Qualitative FIT* и количественного — *Quantitative FIT* тестов без дополнительных аббревиатур.

Согласно выработанным рекомендациям, все качественные и количественные FIT-системы должны подвергаться внутреннему и внешнему контролю качества, в связи с чем необходимо документальное представление всех лотов реагентов, количества использованного буфера для экстракции гемоглобина из образцов, условий хранения реагентов и образцов, а также указание единиц измерения концентраций гемоглобина в кале. Предложено использовать единую единицу измерения — *мкг (гемоглобина) / г (кала)*, что равно результату следующего уравнения: $(\text{ng гемоглобина} / \text{ml}) \times (\text{объем буфера в ml}) / (\text{масса образца, взятого в mg})$ [13]. Публикации проведенных исследований в журналах должны соответствовать критериям STARD (Standards the Reporting of Diagnostic Accuracy) [34].

Существенным отличием иммуноферментных тестов от биохимических является использование антител, специфичных к гемоглобину человека — hHb (h — human), позволяющих исключить многие из описанных выше типов ложноположительных результатов. Ниже приведены данные наиболее крупных исследований с использованием FIT [41].

Целью исследования С.Г. Fraser и соавт. [31] была оценка возможности использования ИФА в группе обследуемых с положительным результатом традиционного гваякового теста на скрытую кровь в кале (gFOBT). У 800 человек с подозрением на злокачественные новообразования толстой и прямой кишки, имеющих положительный результат gFOBT, был исследован уровень гемоглобина в кале с применением ИФА (в двух пробах у каждого). Результат считался «положительным» только в случае обеих положительных ИФА-проб (+/+). «Отрицательными» считались результаты как с обеими негативными ИФА-пробами (—/—), так и при наличии у пациента негативной и позитивной ИФА-пробы (—/+).

При использовании метода ИФА было получено положительных (+/+) результатов 498, отрицательных (—/—) — 173 и (—/+) — 129. Во время последующей ФКС у обследуемых с положительной ИФА-пробой (+/+) диагноз КРР был установлен в 95% случаев. То есть чувствительность метода FIT в группе, имеющей положительный gFOBT в отношении КРР, составила 95%. При наличии одной или двух отрицательных FIT-проб (—/+) или (—/—) в 78% случаев в процессе ФКС не было обнаружено КРР. То есть большая часть этих пациентов составила группу с ложноположительными результатами, подтверждая низкую специфичность gFOBT.

Итогом проделанной работы стал закономерный вывод авторов о том, что использование FIT в группе с положительным gFOBT значительно снижает количество ложноположительных результатов, что следует учитывать при проведении скрининговых программ. В то же время необходимо отметить, что в обследованной группе по окончательным диагнозам почему-то не оказалось больных с такими заболеваниями, как язвенный колит, болезнь Крона, а также с опухолями других отделов и органов ЖКТ, что и обусловило высокую специфичность тестов в отношении КРР.

Пилотные исследования, направленные на раннее выявление КРР при обследовании населения старших возрастных групп (55–75 лет) с использованием FIT, были проведены уже в 2003 г. в Австралии. Результатом этих исследований явилось создание скрининговых программ, которые помогают обнаружению рака на ранних стадиях и снижению смертности от данного заболевания [21].

В последние годы для FIT создано и автоматизированное обеспечение [35].

Наряду с FIT были разработаны иммуноферментные тесты для выявления в кале комплекса гемоглобина человека с гаптоглобином (hHb/Нр). Гаптоглобин (Нр) — (*греч.* hapto — привязывать, прикреплять) является гликопротеином плазмы крови, по своей электрофоретической подвижности относящимся к $\alpha 2$ -глобулиновой фракции. Он способен с высокой специфичностью связывать свободный гемоглобин человека [50]. Гаптоглобин был открыт в 1938 г. М. Polonovski и М. F. Joyle [59]. Этот белок синтезируется и разрушается в печени. В сыворотке крови человека его содержание увеличивается с возрастом: у новорожденных оно составляет 50–480 мг/л, у детей от 6 мес до 16 лет — 250–1380, у взрослых до 60 лет — 150–2000, а у лиц старше 60 несколько снижается до 350–1750 мг/л [9]. В целом гаптоглобин составляет 1,2–1,4% от общего количества всех протеинов сыворотки крови.

М. F. Jayle и соавт. в 1946 г. показали существование трех наследственных типов гаптоглобина, отличающихся по молекулярной массе [42]. О. Smithies и соавт. в 1956 г. установили, что наследование гаптоглобина зависит от сочетания двух аутосомных кодоминантных аллельных генов — НР1 и НР2, что определяет фенотипы: Нр 1-1, Нр 2-2, Нр 2-1 [67, 68]. У европейцев чаще встречается Нр 2-1 и реже Нр 2-2, а у представителей африканского континента и индейцев Америки выявляется Нр 1-1. Кроме того, известно существование Нр 0 фенотипа. У таких людей гаптоглобин в крови отсутствует или его содержание значительно снижено. При Нр 0 фенотипе отмечается крайне тяжелое течение заболеваний, связанных с гемолизом эритроцитов [48, 49].

Гаптоглобин способен образовывать комплексы со свободным гемоглобином через его белковую часть — глобин. Гаптоглобин и гемоглобин в комплексе проявляют новые свойства, не присущие этим отдельным белкам. Так, обнаружено [50], что гаптоглобин в комплексе эффективно ингибирует свободнорадикальную активность гемоглобина, перекисное окисление липидов или разложение экзогенной перекиси водорода. Гаптоглобин, связывая гемоглобин при распаде эритроцитов, играет важную роль в сохранении железа в организме, поскольку в отличие от гемоглобина размеры молекул комплекса hHb/Нр слишком велики, чтобы пройти через гломерулярную мембрану.

В названном исследовании было определено и местонахождение гемоглобин-связывающего участка молекулы гаптоглобина методом селективного протеолиза. Авторы провели расщепление молекулы гаптоглобина рядом ферментов (плазмином, трипсином, химотрипсином, стафилококковой протеазой и термолизинном). Участки протеолитического расщепления были идентифицированы с помощью заново синтезированных NH₂-концов. Анализ взаимодействия самого комплекса hHb/

Нр с этими ферментами позволил также выявить участки тяжелой цепи гаптоглобина, защищенные от расщепления присоединенным в них гемоглобином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что аминокислотные остатки с 128 по 131, 136 и 137 тяжелой цепи гаптоглобина могут быть задействованы в осуществлении взаимодействия с гемоглобином, вследствие чего меняется конформация всей белковой структуры, что обуславливает протеолитическую устойчивость комплекса [50]. Одновременно было проведено еще несколько исследований, направленных на изучение свойств гаптоглобина и доказывающих обоснованность утверждения о существовании специфических участков связывания у обоих белков и о протеолитической устойчивости комплекса [40, 48].

Уровень гаптоглобина в плазме может возрастать при острых или хронических воспалительных процессах, а также при состояниях, сопровождающихся деструкцией тканей, причем при воспалении он является главной варьирующей составляющей 1-глобулиновой фракции [43]. Установлено, что изменения концентрации гаптоглобина в сыворотке крови возникают уже на ранних стадиях развития патологических процессов, что делает возможным использование его в качестве клинически значимого показателя [1]. В этом аспекте особого внимания заслуживают результаты изучения гаптоглобина при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. В ряде работ показаны возрастание содержания гаптоглобина при ишемической болезни сердца и корреляция его уровней со степенью тяжести поражения сердца, в частности размерами инфаркта миокарда [5, 16] и летальностью от него. Однако доказать ценность концентрации гаптоглобина в аспекте долгосрочного прогноза у пациентов с инфарктом миокарда не удалось [19].

Гемоглобин-связывающие свойства гаптоглобина используются не только в медицинской практике. Так, в настоящее время в судебной медицине выявление комплекса hHb/Нр применяется для установления наличия крови в пятнах неясного генеза. Содержимое пятна экстрагируют раствором, содержащим мочевины, и в эту вытяжку добавляют гаптоглобин. При наличии в пятне гемоглобина на фореграмме выявляются полосы комплекса hHb/Нр [12].

Принимая во внимание то, что комплекс hHb/Нр (в отличие от гемоглобина) более устойчив к действию пищеварительных протеолитических ферментов, можно предположить, что это свойство будет полезным для обнаружения гемоглобина в кале при скрытых кровотечениях не только из нижних, но и из верхних отделов ЖКТ.

В исследовании Т. Meguro и соавт. [55] имунорадиометрическим методом были оценены диагностические возможности hHb, Нр и комплекса hHb/Нр (в сравнении с биохимическим gFOBT)

в разных биологических жидкостях. Диапазон выявляемых концентраций — от 3,1 до 800 нг/мл. Авторами установлено, что комплекс hHb/Нр в желудочном соке или фекальном экстракте более стабилен, чем свободный hHb. Из 48 образцов кала пациентов с КРР 44 (91,7%) дали положительный результат (выше 10 нг/мл) на содержание комплекса hHb/Нр, причем в 35 из них (72,9%) был положительный результат и на свободный hHb. Из 64 копрологических образцов от пациентов с колоректальными аденомами в 56 (87,5%) отмечены повышенные значения комплекса hHb/Нр, в 46 (71,9%) повышен уровень hHb, в 28 (43,8%) — hHb и лишь в 33 (51,5%) был положительным биохимический gFOBT. Полученные результаты свидетельствуют о том, что измерение концентрации комплекса hHb/Нр в кале может быть более чувствительным (чем другие тесты) для выявления злокачественных новообразований нижних отделов ЖКТ на ранних стадиях [55].

Исследование, проведенное в Германии в 2008 г., было посвящено изучению шести разных копрологических тестов, каждый из которых в отдельности или в комбинации друг с другом могли бы, по мнению авторов, быть пригодными для лабораторной диагностики КРР [45]. В образцах кала 186 пациентов с КРР, 113 — с колоректальными аденомами и 252 доноров исследовали следующие маркёры — hHb (iFOBT), комплекс hHb/Нр, кальпротектин, *раковомэмбриональный антиген* (РЭА), *тканевой ингибитор металлопротеиназы-1* (TIMP-1) и белок S100A12. Установлено, что наилучшей диагностической значимостью в отношении КРР обладает S100A12, а далее в порядке убывания TIMP-1, комплекс hHb/Нр, hHb, кальпротектин и РЭА. В качестве математической модели оценки чувствительности и специфичности авторами использована Байесовская регрессия, по результатам которой наибольшими чувствительностью (88%) и специфичностью (95%) в отношении КРР обладала пара S100A12 и hHb/Нр. При заданной специфичности 98% наилучшей оказалась комбинация из трех маркёров — S100A12, комплекс hHb/Нр и TIMP-1, которая обеспечила диагностическую чувствительность 82%. Кроме того, показано, что любая из двух комбинаций маркёров обладает большей чувствительностью в отношении КРР по сравнению с iFOBT [45].

В сходном исследовании А. Seig и соавт. [65] изучалась чувствительность метода ИФА для выявления в кале гемоглобина человека и комплекса hHb/Нр в отношении злокачественных новообразований нижних отделов ЖКТ и аденоматозных полипов толстой кишки. Уровни маркёров определили у 621 пациента с подозрением на злокачественные опухоли нижних отделов ЖКТ. Оптимальным *дискриминационным уровнем* (ДУ) для комплекса hHb/Нр был признан

2,0 мкг/г кала, обеспечивающий 83 и 73% чувствительности в отношении КРР и аденоматозных полипов, соответственно при специфичности 96%. Чувствительность теста hHb в отношении КРР составила 87%, а для аденоматозных полипов — 54% при специфичности 99%. Таким образом, авторы заключают, что оба теста отличаются примерно одинаковой чувствительностью в отношении КРР, а наибольшей в отношении аденоматозных полипов обладает комплекс hHb/Нр.

Представленные выше исследования находят у истоков мультипараметрического подхода к выявлению злокачественных новообразований нижних отделов ЖКТ, основанного на оценке скрытой крови в кале разными методами. Описанная рядом авторов устойчивость комплекса hHb/Нр к разрушающему действию протеолитических ферментов ЖКТ открывает перспективы исследования уровней этого маркёра в отношении опухолей и вышележащих отделов (например, рака пищевода, рака желудка).

Иммуноферментные тесты для выявления в кале опухолевой формы пируваткиназы (М2-РК)

Одним из ключевых ферментов в анаэробном этапе клеточного дыхания (гликолиза) при расщеплении глюкозы до пировиноградной кислоты или лактата является *пируваткиназа* — РК (pyruvate kinase). РК обеспечивает перенос фосфатной группировки с фосфоэнолпирувата на АДФ, что сопровождается синтезом аденозинтрифосфата и пирувата.

Описаны две формы РК: высокоактивная, тетрамерная, для которой характерно высокое сродство к собственному субстрату — фосфоэнолпирувату, и менее активная, димерная, с низким сродством к этому субстрату — М2-РК [54, 56, 57]. Много лет назад было установлено, что интенсивность анаэробного гликолиза в раковых клетках в 10–15 раз выше, чем в норме. Поэтому закономерно было ожидать, что преобладать в них будет М2-РК, которая теперь называется опухолевой — Tu М2-РК (Tu — tumor) [27, 54, 57].

Переход тетрамерной формы РК в димерную индуцируется онкопротеинами, в частности активированной pp60v-src-киназой (белок гена src) и другими онкопротеинами, работающими путем прямого связывания М2-РК [28, 61]. Протеинкиназа pp60v-src катализирует присоединение ионов фосфата к остаткам тирозина белков в реакции фосфорилирования [28]. Было показано, что в результате трансфекции клеток геном src количество фосфорилированного тирозина в них увеличивается в 10 раз. Взаимодействие онкопротеинов с М2-РК в опухолевых клетках ведет к накоплению всех фосфометаболитов в количестве, превышающем возможности пируваткиназы, и они

вовлекаются в синтетические процессы, включая синтез нуклеиновых кислот [14].

Таким образом, в канцерогенезе имеет место метаболический атипизм, направленный на обеспечение роста и приспособление к относительному дефициту кислорода, что сопровождается формированием опухолевого фенотипа клеток. Одним из обязательных этапов при этом является переход к функционированию в процессах энергетического обмена тетрамерной формы РК к димерной. Поэтому одним из новых метаболических маркеров, для которого был разработан иммуноферментный метод выявления в кале, явилась опухолевая форма пируваткиназы М2-типа. К настоящему времени осуществлен ряд исследований уровней М2-РК в кале при КРР [38, 46, 69].

Целью работы С. Topus и соавт. [69] было изучение возможности использования в повседневной клинической практике пируваткиназы М2-типа, определяемой в кале, — fTu М2-РК (f — fecal), для предварительного отбора лиц, направляемых на эндоскопическое исследование для выявления новообразований толстой или прямой кишки. Уровни fTu М2-РК были оценены твердофазным ИФА у 33 пациентов с аденокарциномой толстой кишки и у 21 — с опухолью прямой кишки. В группу контроля вошли 42 условно здоровых донора. Авторы показали, что при ДУ, равном 4 Ед/мл, специфичность fTu М2-РК составила 93%. Выявлена корреляция уровня fTu М2-РК со стадией заболевания согласно TNM классификации и Duke's стадированию. Так, чувствительность fTu М2-РК для КРР повышалась от 60% при T1 стадии до 100% при T4 стадии и от 60% при Duke's A до 90% при Duke's D. Медиана составила 23,1 Ед/мл для аденокарциномы толстой кишки, 6,9 Ед/мл — для рака прямой кишки и 14,7 Ед/мл — для КРР в целом. По результатам исследования авторы сделали вывод, что с увеличением стадии КРР сопряжено повышение уровня fTu М2-РК [69].

В другом исследовании диагностической значимости fTu М2-РК, проведенном U. Naug и соавт., приняли участие 65 пациентов с КРР и 917 человек, асимптомных по данной нозологии [38]. При ДУ fTu М2-РК, равном 4 Ед/мл, чувствительность метода для рака толстой и прямой кишки составила соответственно 85 и 56% при специфичности 79%. Получив в целом обнадеживающие результаты, авторы считают этот маркер перспективным для дальнейшего изучения. В 2008 г. опубликовано сходное исследование fTu М2-РК, проведенное K. Koss и соавт. [46]. В протокол были включены 32 пациента с КРР, 10 с полипами толстой кишки и 13 человек контрольной группы. При ДУ, равном 3,33 Ед/мл, чувствительность метода составила 91% для КРР, 60% — для полипов размером более 1 см, 20% — для полипов менее 1 см при специфичности относительно группы контроля 92%. В одной из работ

было отмечено повышение уровней fTu М2-РК в 80% случаев и для рака желудка [37]. Однако эти данные нуждаются в подтверждении.

Дальнейшие исследования рассматриваемого маркера проводились в Германии в аспекте скрининга КРР. По результатам 6 исследований, в которых приняли участие 1906 человек, отмечено, что у 90,4% из них уровень fTu М2-РК находится в пределах нормы. В итоге рекомендуется выполнение этого анализа как первого этапа скрининга с последующей ФКС при дообследовании органов ЖКТ [29, 38].

Определенные надежды в разработке подходов к надежному скринингу КРР связывают с успехами метаболомики с помощью ядерно-магнитного резонанса, в частности с выявлением специфических метаболитов в кале и моче [17, 71], а также с обнаружением ряда гиперметилированных генов и их продуктов в сыворотке крови и кале [24, 32, 60, 70]. В результате исследования аберрантного метилирования опухолевого супрессорного гена Septin 9 в плазме крови у 92 пациентов с КРР, прошедших ФКС, и у 92 практически здоровых лиц было выявлено, что уровни этого маркера повышены в 95,6% случаев КРР и у 15,2% здоровых лиц. Кроме того у этих же категорий обследованных были оценены уровни РЭА и осуществлен gFOBT: РЭА превышал ДУ в 51,8% у больных КРР и в 14,8% у здоровых лиц, gFOBT оказался положительным в 68,2% при КРР против 29,4% у здоровых людей. Отмечено, что концентрации всех трех маркеров чаще повышены при локализации колоректальной аденомы в правых отделах толстой кишки, чем в левых [70].

Заключение

Согласно данным литературы, не вызывает сомнений, что иммуноферментные гемокульт-тесты и fTu М2-РК являются перспективными для определения риска наличия опухолей и предопухолевых состояний в нижних отделах ЖКТ, т. е. выявления контингента для дообследования. В то же время использование тест-систем к разным эпитомам, в частности гемоглобина (различающихся по биодоступности, устойчивости и действию пищеварительных ферментов), разная аналитическая чувствительность FIT-систем, использование различных буферов для разведения кала не позволяют пока составить окончательное представление о сравнительной чувствительности копро-тестов при КРР разных стадий и при предраковых заболеваниях кишечника. Недостаточно данных по исследованию кала и при других опухолевых и неопухолевых заболеваниях ЖКТ, что не позволяет судить о специфичности этих тестов. Тем не менее, целесообразность их использования в первых этапах скрининговых программ признается сегодня многими исследователями.

Список литературы

- Бейсембаева Р.У. Гаптоглобин и его клиническое значение // Клин. мед. — 1986. — № 1. — С. 13–15.
- Beysembayeva R.U. Haptoglobin and its clinical value // Klin. med. — 1986. — N 1. — P. 13–15.
- Гуришберг Л. Техника исследования и клиническое значение скрытой крови в испражнениях // Врач. газета. — 1922. — № 9.
- Girshberg L. Technic of investigation and clinical value of occult blood in stool // Vrach. gazeta. — 1922. — N 9.
- Кулибакин Б.В. Большая медицинская энциклопедия. — 1976. — Изд. 3-е / Под ред. Б.В. Петровского. — Т. 3. — С. 38.
- Kulibakin B.V. Large medical encyclopedia. — 1976. — 3 ed. / ed. B.V. Petrovsky. — Vol. 3. — P. 38.
- Кулибакин Б.В. Там же. — Т. 5. — С. 68.
- Kulibakin B.V. Ibid. — Vol. 5. — P. 68.
- Мовшович Б.Л., Русаков В.М. Исследование сывороточного гаптоглобина и внеэритроцитарного гемоглобина при некрозах миокарда // Кардиология. — 1972. — № 5. — С. 116.
- Movshovich B.L., Rusakov V.M. Investigation of serum haptoglobin and ectoglobular hemoglobin at necroses of myocardium // Cardiology. — 1972. — N 5. — P. 116.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2008 г. / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — М., 2009. — 190 с.
- A state of oncologic aid to the population of Russia in 2008 / eds. V.I. Chissov, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. — M., 2009. — 190 p.
- Степанов Б.И. Большая медицинская энциклопедия, 1976. — Изд. 3-е / Под ред. Б.В. Петровского. — Т. 8. — С. 446.
- Stepanov B.I. Large medical encyclopedia, 1976. — 3 ed. / ed. B.V. Petrovsky. — Vol. 8. — P. 446.
- Тимофеев Ю.М. Колоректальный рак: современные аспекты диагностики и лечения // РМЖ. Независ. изд. практ. вр. — 2004. — Т. 12, № 11. — С. 653–656. — http://www.rmj.ru/articles_304.htm.
- Timofeyev Yu.M. Colorectal cancer: modern aspects of diagnostics and treatment // RMZ. independent publication for practitioners. — 2004. — Vol. 12, N 11. — P. 653–656. — http://www.rmj.ru/articles_304.htm.
- Туз Н.У. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. — М.: Лабинформ, 1997. — 942 с.
- Tiets N.U. Encyclopedia of clinical laboratory tests. — M.: Labinform, 1997. — 942 p.
- Трифонов Е.В. Психофизиология человека // Русско-англо-русская энциклопедия. — 2009. — 13-е изд. — <http://www.tryphonov.ru/tryphonov1/terms1/ideal.htm>.
- Trifonov Ye.V. Human psychophysiology // Russian-English-Russian encyclopedia. — 2009. — 13 ed. — <http://www.tryphonov.ru/tryphonov1/terms1/ideal.htm>.
- Чиссов В.И., Дарьялова С.Л. Онкология: учебник. — 2007. — 560 с.
- Chissov V.I., Daryalova S.L. Oncology: the textbook. — 2007. — 560 p.
- Энциклопедический словарь по судебной медицине и смежным проблемам / Под ред. Корсакова С.А. — <http://www.med-pravo.ru/SudMed/Dictionary/letterGag.htm>.
- The encyclopedic dictionary on forensic medicine and adjoining problems / ed. Korsakov S.A. — <http://www.med-pravo.ru/SudMed/Dictionary/letterGag.htm>.
- Allison J.E. et al. Comparing fecal immunochemical tests: improved standardization is needed // Gastroenterology. — 2012. — Vol. 142. — P. 422–424.
- Atkinson D.E., Walton C.M. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation // J. Biol. Chem. — 1967. — Vol. 10. — P. 3239–3241.
- Bertario L. Reducing colorectal cancer mortality by repeated faecal occult blood test a nested case-control study // Eur. J. Cancer. — 1999. — Vol. 35. — P. 973–977.
- Bilgrami G., Tyagi S.P., Qasum A. Serum haptoglobin in cases of ischemic heart diseases // Jpn. Heart J. — 1980. — Vol. 21, N 4. — P. 505–510.
- Bresaller R.S. Blood-Based Biomarkers: Key Concepts in development and Clinical validation for CRC in Population screening // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
- Burtonwood C. Monitoring faecal occult blood test positivity in the NHS Bowel Cancer Screening Programme // Ibid.
- Chapelle J.P., Albert A., Smeets J.P. et al. Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct // New Engl. J. Med. — 1982. — Vol. 307, N 8. — P. 457–463.
- Church T.R. et al. Fecal occult blood screening in the Minnesota Study: Sensitivity of the screening test // J. Natl. Cancer Inst. — 1997. — Vol. 91. — P. 1440–1448.
- Cole S.R. Cancer Downstaging As a Consequence of the Australian National Bowel Cancer Screening Program // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
- Collins J.F., Lieberman D.A., Durbin T.E. et al. Accuracy of screening for fecal occult blood on a single stool sample obtained by digital rectal examination: a comparison with recommended sampling practice // Ann. Intern. Med. — 2005. — Vol. 142 (2). — P. 81–85.
- Dekker E. How to deal with patients with a positive family history for CRC in population screening // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
- De Vos T. Septin 9 DNA Methylation Biomarker for the Detection of Colorectal Cancer in Blood // Ibid.
- Duffy M.J. Use of biomarkers in screening for cancer // Tumor Biol. — 2011. — Vol. 32 (suppl. 1). — P. 5–56; O16.4 (S49).
- Ederer F. et al. Fecal occult blood screening in the Minnesota Study: Role of chance detection of lesions // J. Natl. Cancer Inst. — 1997. — Vol. 89. — P. 1423–1428.
- Eigenbrodt E., Kallinowski F., Ott M. et al. Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors // Anticancer Res. — 1998. — Vol. 18. — P. 3267–3274.
- Eigenbrodt E., Mazurek S., Friis R.R. Double role of pyruvate kinase type M2 in the regulation of phosphometabolite pools // Cell Growth and Oncogenesis. — 1998. — P. 15–30.
- Ewald N., Shaller M., Bayer M. et al. Fecal pyruvate kinase-M2 (tumor M2-PK) measurement: a new screening concept for colorectal cancer // Anticancer Res. — 2007. — Vol. 27 (4A). — P. 1949–1952.
- Faivre J., Tazi M.A. Fecal occult blood screening and reduction of colorectal cancer mortality; a case control study // Br. J. Cancer. — 1999. — Vol. 79. — P. 680–683.
- Fraser C.G., Matthew C.M., Mowat N.A. et al. Immunochemical testing of individuals positive for guaiac fecal occult blood test in a screening program for colorectal cancer: an observation study // Lancet Oncol. — 2006. — Vol. 7 (2). — P. 127–131.
- Goodenow D. Validation of Low Serum GTA-446 Levels for Identifying Subjects with High CRC Risk // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
- Gregersen T. Untersuchungen tiber okkulte Blutungen // Arch. f. Ver-dauungs-krankheiten, B. XXV, 1919.
- Halloran S., Launoy G., Zappa M. Faecal occult blood testing // European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Cancer Screening and Diagnosis. — 2010. — First Edition.
- Halloran S., Pearson S. OC-Sensor DIANA immunochemical faecal occult blood test analytical performance // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
- Hardcastle J.D. et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer // Lancet. — 1996. — Vol. 348. — P. 1471–1477.

37. *Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B.* et al. Fecal pyruvate kinase (ELISA based on a combination of clone 1 and 3 antibodies) for gastric cancer // *Anticancer Res.* — 2003. — Vol. 23. — P. 851–854.
38. *Haug U., Rothenbacher D., Wente M.N.* et al. Tumor M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients // *Br. J. Cancer.* — 2007. — Vol. 7; 96 (9). — P. 1329–1334.
39. *Hewitson P., Glasziou P.P., Irwig L.* et al. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* — 2007. — Issue 1. — Art. No.: CD001216. DOI: 10.1002/14651858.CD001216.pub2. (Copyright © 2011 The Cochrane Collaboration Published by John Wiley & Sons, Ltd).
40. *Hwang P.K., Greer J.* // *J. Biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P. 3038–3041.
41. *Imperiale T.F.* Molecular markers — are they ready yet? // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
42. *Jayle M.F., Judas O.* Formule glycoprotéidique du plasma sanguine // *Helv. Chim. Acta.* — 1946. — Vol. 29. — P. 1310–1314.
43. *Johansson B.G., Kindmark C.O., Irele E.Y.* et al. Sequential changes of plasma proteins after myocardial infarction // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1972. — Vol. 124. — P. 117–126, 134–141.
44. *Jover R.* et al. Factors related with detection of adenomas in screening colonoscopy // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
45. *Karl J., Wild N., Take M.* et al. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* — 2008. — Vol. 6 (10). — P. 1122–1128.
46. *Koss K., Maxton D., Jankowski J.A.* Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention // *Colorectal Dis.* — 2008. — Vol. 10 (3). — P. 224–228.
47. *Kronborg O.* et al. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test // *Lancet.* — 1996. — Vol. 348. — P. 1467–1471.
48. *Kurosky A., Barnett D.R., Lee T.-H.* et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1980. — Vol. 77. — P. 3388–3392.
49. *Lange V.* Haptoglobin polymorphism — Not only a genetic marker // *Anthropol.* — 1992. — Vol. 50. — P. 281–302.
50. *Lustbader J.W., Arcoleo J.P.* et al. Hemoglobin-binding site on haptoglobin probed by selective proteolysis // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258 (2). — P. 1227–1234.
51. *Mandel J.S.* et al. Colorectal cancer mortality: Effectiveness of biennial screening for fecal occult blood // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1999. — Vol. 91. — P. 434–437.
52. *Mandel J.S.* et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood // *N. Engl. J. Med.* — 1993. — Vol. 328. — P. 1365–1371.
53. *Matsuda T.* The Characteristics of Interval Cancers and Right-sided Lesions from the Japanese Perspective // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
54. *Mazurek S., Grimm H., Oehmke M.* et al. Tumor M2-PK and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells // *Anticancer Res.* — 2000. — Vol. 20. — P. 5151–5154.
55. *Meguro T.* Measurement of fecal hemoglobin-haptoglobin complex as a new diagnostic tool of lower GIT diseases // *Hokkaido Igaku Zasshi.* — 1994. — Vol. 69 (4). — P. 995–1009.
56. *Melo R.F., Stevan F.R., Campello A.P.* et al. Occurrence of the crabtree effect in HeLa cells // *Cell Biochem. Funct.* — 1998. — Vol. 16. — P. 99–105.
57. *Oremek C.M., Teigelkamp S., Kramer W.* et al. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma // *Anticancer Res.* — 1999. — Vol. 19. — P. 2599–2602.
58. *Pohl H.* Incomplete adenoma resection during colonoscopy. The Complete Adenoma Resection Study (CARE Study) // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
59. *Polonovski M., Jayle M.F.* Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydase, l'haptoglobine // *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* — 1938. — Vol. 129. — P. 457–460.
60. *Prdersen S.K.* et al. Discovery and validation of novel DNA methylation biomarkers for colorectal cancer with application to blood testing // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
61. *Presek P., Reinacher M., Eigenbrodt E.* Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus // *FEBS Letters.* — 1988. — Vol. 242. — P. 194–198.
62. *Rex D.K.* Serrated lesions, variable detection, pathologic interpretation and interobserver variation // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
63. *Sanduleanu S.* Incidence and potential explanations of interval cancers after colonoscopy // *Ibid.*
64. *Schoen E.R.* Interval Cancers in the PLCO Trial // *Ibid.*
65. *Seig A., Thoms C., Lüthens K.* et al. Detection of colorectal neoplasms by the highly sensitive hemoglobin-haptoglobin complex in feces // *Int. J. Colorectal Dis.* — 1999. — Vol. 14 (6). — P. 267–271.
66. *Senore C.* The burden for surveillance of population screening programs // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
67. *Smithies O.* Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults // *Biochemistry.* — 1955. — Vol. 61. — P. 629–641.
68. *Smithies O., Walker N.F.* Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance // *Nature.* — 1956. — Vol. 178. — P. 694–695.
69. *Tonus C., Neupert G., Sellinger M.* Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12 (43). — P. 7007–7011.
70. *Toth K.* et al. Plasma methylated Septin9 is a screening marker in both left- and right-sided colon cancer. Comparison to FOBT and CEA results // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.
71. *Wang H.* et al. A New And Highly Sensitive Screening Tool For Colorectal Adenomatous Polyps Using A Spot Urine Metabolomics Test // *Ibid.*
72. *WGO Practice Guidelines.* — 2008.
73. *Zauber A.G.* Adherence to Screening in a Randomized Controlled Trial of a One-Time Screening Colonoscopy versus Program of Annual Fecal Occult Blood Test (gFOBT): Implications of Lower gFOBT Adherence to Screening on Colorectal Cancer Mortality Reduction // WEO Colorectal Cancer Screening Committee Meeting, May 18, 2012.