

УДК 616.345

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОГНОЗА РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОГО ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СКРИНИНГОВЫХ ТЕСТОВ

¹Омельченко В.П., ²Бурцев Д.В., ³Кит О.И., ¹Демидова А.А.¹ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ», Ростов-на-Дону, e-mail: aad@aanet.ru;²ГБУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», Ростов-на-Дону, e-mail: aad@aanet.ru;³ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздравсоцразвития, Ростов-на-Дону, e-mail: aad@aanet.ru

Проведен анализ взаимосвязи риска прогнозирования рака толстой кишки после радикального хирургического лечения от исходных результатов скрининговых серологических, генетических и эпигенетических тестов с последующим построением математических моделей. Учитывались результаты определения гемоглобина в стуле, уровни раковоэмбрионального антигена (РЭА), онкоантигена СА 19-9, метилированной ДНК септина 9 в крови, фекального опухолевого метаболита Tumor M2-PK, наличие генных мутаций в ДНК кала. Наибольшее влияние на прогноз течения заболевания оказывали стадия болезни (Statistica Walda 19,4), осложнения опухолевого процесса (Statistica Walda 15,8), инвазия нервов и сосудов (Statistica Walda 15,8), кровь в стуле, определяемая лабораторным способом (Statistica Walda 11,6), превышение в крови уровня онкофетального белка РЭА выше 60 нг/мл (Statistica Walda 8,23), наличие метилирования ДНК гена SEPT9 (Statistica Walda 4,62). Методом логистической регрессии получено математическое выражение, позволяющее рассчитать риск прогрессирования рака толстой кишки в первые пять лет после операции по итогам выполнения скрининговых тестов до операции.

Ключевые слова: рак толстой кишки, моделирование, риск прогрессирования заболевания

MODELLING OF THE FORECAST OF THE CANCER OF THE THICK GUT AFTER RADICAL OPERATIVE TREATMENT BY RESULTS OF SCREENINGS TESTS

¹Omelchenko V.P., ²Burtsev D.V., ³Kit O.I., ¹Demidova A.A.¹Rostov state medical university, Rostov-on-Don, e-mail: aad@aanet.ru;²Regional consultative-diagnostic centre, Rostov-on-Don, e-mail: aad@aanet.ru;³Rostov Institute of cancer research, Rostov-on-Don, e-mail: aad@aanet.ru

Analysis of the relationship of risk prediction of colon cancer after radical surgical treatment of initial results of serological screening, genetic and epigenetic tests, followed by the construction of mathematical models. Take into account the results of the hemoglobin in stool, levels of carcinoembryonic antigen (CEA), oncoantigen SA 19-9, methylated DNA sept 9 in blood, fecal tumor metabolite Tumor M2-PK, the presence of gene mutation in the DNA of feces. The greatest influence on the prediction of the course of the disease by stage of disease (Statistica Walda 19,4), complications of tumor process (Statistica Walda 15,8), invasion of nerves and vessels (Statistica Walda 15,8), blood in stool, defined by laboratory methods (Statistica Walda 11,6), excess in the blood level of oncofetals protein of CEA above 60 ng/ml (Statistica Walda 8,23), the presence of DNA methylation SEPT9 gene (Statistica Walda 4,62). Logistic regression method received a mathematical expression. Logistic regression method received a mathematical expression, allowing to calculate the risk of colon cancer progression in the first five years after surgery, according to the results of the screening tests before surgery.

Keywords: colon cancer, modeling, risk of disease progression

Нарушения в опухолевых клетках экспрессии белков, контролирующих процессы апоптоза, пролиферации и ангиогенеза, эпигенетические изменения ДНК белков, контролирующих жизнедеятельность опухолевых клеток, влияют на клиническое течение опухолевого процесса [6]. Различия в экспрессии определенных белковых маркеров, эпигенетические изменения могут объяснить, почему сравнимые по стадии, гистологической структуре и степени злокачественности опухоли различаются по течению заболевания [4–5]. Большое внимание исследователей привлекает возможность создания молекулярной классификации опухолей, которая позволит вы-

делять группы больных с разным риском метастазирования. Проводимые в России в последние годы исследования по анализу генетических, биохимических и белковых изменений опухолевых клеток и их связи с прогнозом заболевания вносят значительный вклад в решение этой проблемы [1–3].

Целью работы явилось создание математических методов прогнозирования течения опухолевого процесса у больных раком толстой кишки на основе определения наличия крови в стуле, повышения концентрации в крови серологических маркеров, экспрессии онкобелков, контролирующих апоптоз, пролиферацию и ангиогенез, наличия метилированной ДНК белков наряду

с учетом общепризнанных факторов риска – возраст, пол, стадия заболевания, осложнения опухоли, инвазии нервов и сосудов, число пораженных лимфатических узлов.

Материал и методы исследования

Клиническую группу пациентов составили 204 больных, у которых рак толстой кишки был выявлен при проведении скрининговых мероприятий в ГБУ РО «Областной научно-консультативный центр» и подтвержден с помощью колоноскопии с гистологическим исследованием биоптатов. В клинической группе мужчин было 99 (48,5%), а женщин – 105 (51,5%). Средний возраст пациентов составил $61,4 \pm 1,56$ года и колебался от 33 до 76 лет (медиана 63 года). На момент постановки диагноза в основной группе преобладала II стадия заболевания ($n = 141$, 69,1%). I стадия встречалась у 45 (22,1%) больных, а III – у 18 (8,8%) больных. У пациентов чаще других локализаций выявлялся рак сигмовидной (25,5%) и прямой (21,6%) кишки. На третьем и четвертом месте по встречаемости были злокачественные новообразования поперечной ободочной (11,3%) и слепой (10,8%) кишки.

Характер оперативного вмешательства на первичной опухоли, а также объем лимфодиссекции определялся стадией процесса. Все больные раком толстой кишки были подвергнуты хирургическому лечению различного объема: право/левосторонняя гемиколэктомии, резекции сигмовидной, поперечно-ободочной, прямой кишки. Адьювантную химиотерапию после радикального хирургического лечения (оксалиплатин, кселода) назначали при II-III стадиях заболевания.

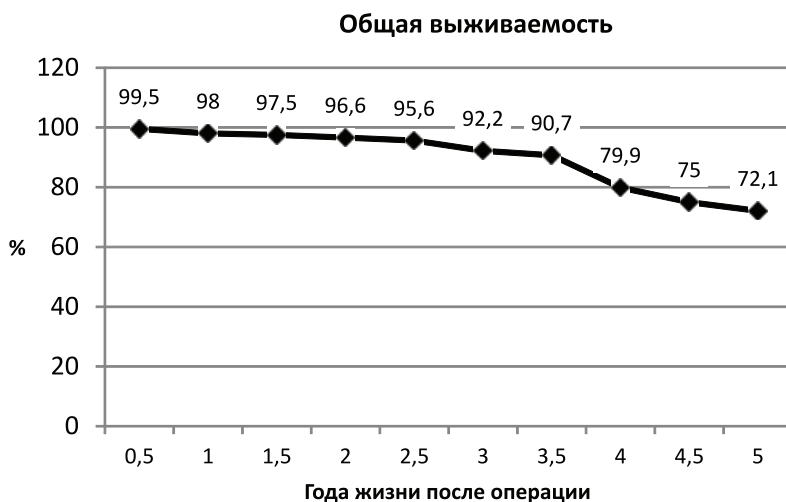
Анализ кала на скрытую кровь проводили с помощью иммунохроматографического теста (Hexagon

ОВТИ). Определение онкомаркера РЭА в крови базировалось на принципе твердофазового ферментносвязанного иммуносорбентного теста с использованием набора DRG CEA ELISA. Определение уровней онкоантигена СА 19-9, СА 242 в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом (ELISA) с использованием специфичного набора Calbiotech ELISA ИФА. Метилированную ДНК для синтеза белка септина 9 в крови определяли с помощью ПЦР в реальном времени на амплификаторе (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana). Опухолевый метаболит Tumor M2-PK в каловых экстрактах определяли иммунологически при помощи количественного ИФА-теста сэндвич-типа (ScheBo® Tumor M2-PK (TM)), который основан на использовании двух типов моноклональных антител (ScheBo® Biotech AG, Германия). Мутации в генах TP53 и KRAS методом ПЦР определяли в ДНК колоноцитов, полученных из кала путем иммуномагнитной сепарации клеточного материала с использованием магниточувствительных микросфер.

Влияние изученных факторов на выживаемость оценивалось с помощью регрессионной модели Кокса и метода логистической регрессии.

Результаты исследования и их обсуждение

Общее количество летальных исходов за пятилетний срок наблюдения составило 57 (27,9%). Выживаемость больных основной группы в течение четырех лет наблюдения была высокой и только к 4-му году снизилась с 99,5 до 79,9%, а к пятому году – до 72,1% (рисунок).



Динамика общей выживаемости в клинической группе

В табл. 1 представлены результаты статистического анализа влияния различных факторов на общую выживаемость больных основной группы.

Наибольшее влияние на прогноз течения заболевания оказывали стадия болезни (Statistica Walda 19,4), осложнения опухолевого процесса (Statistica Walda 15,8), инвазия нервов и сосудов (Statistica Walda

15,8), кровь в стуле, определяемая лабораторным способом (Statistica Walda 11,6), превышение в крови уровня онкофетального белка РЭА выше 60 нг/мл (Statistica Walda 8,23), наличие метилирования ДНК гена SEPT9 (Statistica Walda 4,62). Остальные факторы имели значимое, но не такое выраженное влияние на общую выживаемость.

Таблица 1

Результаты регрессионного анализа по Коксу влияния факторов на общую выживаемость больных основной группы

Показатели	β-стандартизированный критерий регрессии	Статистика Вальда	Критерий χ^2 Пирсона	p
Возраст	-0,89	4,78	4,03	0,047
Мужской пол	1,24	5,12	4,19	0,041
Стадия заболевания	3,27	19,4	19,1	0,00001
Опухолевые осложнения (непроходимость, перфорация)	6,72	17,3	15,8	0,0002
Инвазия нервов и сосудов	7,03	15,8	13,2	0,00001
Кровь в стуле по результатам FOBТ	5,43	11,6	10,8	0,024
РЭА крови выше 10 нг/мл	2,05	5,38	4,96	0,032
РЭА крови выше 30 нг/мл	3,46	7,95	5,92	0,021
РЭА крови выше 60 нг/мл	5,78	8,23	6,38	0,018
СА19-9 выше 40 ед./мл	1,45	4,93	4,39	0,05
Фекальная Tumor M2-РК выше 4 ед./мл	1,27	3,81	3,90	0,05
Точковые мутации в онкогене KRAS	1,14	4,16	3,94	0,05
Мутации в гене TP53	1,36	4,89	4,11	0,04
Метилирование ДНК гена SEPT9 в крови	1,78	4,62	4,48	0,03

Методом множественной логистической регрессии была объединена взаимосвязь между риском появления рецидивов и/или метастазов и такого комплекса показателей, как уровни в крови РЭА и СА 19-9, содержания фекального Tumor M2-РК и наличия метилированной ДНК белка SEPT9. Подобное объединение продуктивно потому, что в этом случае общая информативность

прогнозирования больше, чем простая аддитивная сумма информативностей отдельных предикторов. Это обусловлено тем, что предикторы взаимосвязаны между собой, наблюдается мультипликативный эффект взаимодействия, когда влияние одного предиктора усиливается другим предиктором.

Выражение, описывающее эту зависимость, имело вид:

$$z = \exp(-11,9 + (,036) \cdot x + (,2) \cdot y + (0,63) \cdot v + (2,6) \cdot w) / (1 + \exp(-11,9 + (,036) \cdot x + (,2) \cdot y + (0,63) \cdot v + (2,6) \cdot w)),$$

где z – вероятность появления рецидива или метастаза рака толстой кишки в долях единицы; x – уровень в крови РЭА в нг/мл; y – уровень в крови СА 19-9 в ед./мл; v – уровень фекального Tumor M2-РК в ед./мл; w – наличие или отсутствие метилированной ДНК белка SEPT9 в крови.

При достижении дискриминантных уровней онкомаркеров: РЭА крови 10 нг/мл, СА 19-9 40 ед./мл, уровня фекального Tumor M2-РК 4 ед./мл и наличии в крови метилированной ДНК SEPT9 вероятность появления рецидивов или метастазов равна 0,83.

Математические выражения, описывающие зависимость между вероятностью риска прогрессирования колоректального рака (в долях единицы) и онкомаркерами, отражены в табл. 2.

Полученные уравнения позволяли рассчитывать индивидуальный риск прогрессирования рака толстой кишки. Например, с повышением РЭА крови повышался риск

прогрессирования рака толстой кишки: при концентрации в плазме РЭА, равной 20 нг/мл, риск прогрессирования заболевания составлял 25,6%, а при уровне 30 и 40 нг/мл повышался соответственно, до 46,2 и 68,1%. При высоких концентрациях онкофетального белка – 50 и 60 нг/мл риск прогрессирования заболевания повышался соответственно до 84,2 и 93%.

Таким образом, с прогрессированием рака толстой кишки были ассоциированы повышение в крови уровня РЭА, онкогена СА 19-9, повышение содержания фекальной Tumor M2-РК, обнаружение в крови метилированной ДНК септина-9. Изучение влияния комплекса факторов на прогрессирование болезни в группе скрининга позволило создать инструмент для прогнозирования течения рака толстой кишки в зависимости от уровня биохимических, генетических, эпигенетических и молекулярных онкомаркеров.

Таблица 2

Уравнения математической аппроксимации между вероятностью риска прогрессирования рака толстой кишки (y) и онкомаркерами

Фактор (ы)	Уравнения экспоненциального роста величины риска прогрессирования КРР (y)	χ^2	p
РЭА крови в нг/мл (x)	$y = \exp(-2,8949 + (,091369) \cdot x) / (1 + \exp(-2,8949 + (,091369) \cdot x))$	6,43	0,011
СА19-9 крови в ед./мл (x)	$y = \exp(-6,3053 + (,182948) \cdot x) / (1 + \exp(-6,3053 + (,182948) \cdot x))$	3,78	0,05
Фекальная Tumor M2-РК в ед./мл (x)	$y = \exp(-4,0207 + (,956863) \cdot x) / (1 + \exp(-4,0207 + (,956863) \cdot x))$	5,88	0,015
РЭА крови в нг/мл (x) и СА19-9 крови в ед./мл (z)	$y = \exp(-6,6061 + (,083115) \cdot x + (,123839) \cdot z) / (1 + \exp(-6,6061 + (,083115) \cdot x + (,123839) \cdot z))$		
РЭА крови в нг/мл (x), СА19-9 крови в ед./мл (z), фекальная Tumor M2-РК в ед./мл (v), мДНК SEPT9 (1/0) (w)	$z = \exp(-11,9 + (,036) \cdot x + (,2) \cdot z + (0,63) \cdot v + (2,6) \cdot w) / (1 + \exp(-11,9 + (,036) \cdot x + (,2) \cdot z + (0,63) \cdot v + (2,6) \cdot w))$	3,85	0,05

Вывод

Проведение молекулярно-генетических методов скрининга рака толстой кишки позволяет не только своевременно выявить опухолевое заболевание, но еще по разработанным моделям определить риск прогрессирования заболевания.

Список литературы

1. Иванцов А.О., Мацко Д.Е. Возможности иммуногистохимического исследования в диагностике опухолей // Практическая онкология. – 2011. – Т.12, №4. – С. 185–193.
2. Имянитов Е.Н. Высокопроизводительные молекулярно генетические методы нового поколения в диагностике и лечении новообразований // Практическая онкология. – 2011. – Т.12, №4. – С. 194–202.
3. Сергеева Н.С., Маршуткина Н.В. Опухолеассоциированные маркеры в скрининговых программах, направленных на активное выявление рака яичников: реальность, проблемы и перспективы // Практическая онкология. – 2010. – Т.11. – №2. – С. 110–119.
4. El-Badry A., Sedrak H., Rashed L. Faecal Calprotectin in Differentiating between Functional and Organic Bowel Diseases // Arab Journal of Gastroenterology. – 2010. – Vol.11. – P. 70–73.
5. Engstrom P.F. Colorectal cancer // Clinical Oncology. – 2009. – Vol.79. – P. 361–370.

6. Kahlenberg M.S., Sullivan J.M., Witmer D.D., Petrelli N.J. Molecular prognostics in colorectal cancer // Surg. Oncol. – 2008. – Vol.12. – P. 173–186.

References

1. Ivantsov A.O., Matsko D.E. *Prakticheskaja onkologija*, 2011, vol. 12, no.4, pp. 185–193.
2. Imanyitov E.N. *Prakticheskaja onkologija*, 2011, vol. 12, no. 4, pp. 194–202.
3. Sergeyev N.S., Marshutina N.V. *Prakticheskaja onkologija*, 2010, vol. 11, no. 2, pp. 110–119.
4. El-Badry A., Sedrak H., Rashed L. *Arab Journal of Gastroenterology*, 2010, no. 11, pp. 70–73.
5. Engstrom P.F. *Clinical Oncology*, 2009, vol. 79, pp. 361–370.
6. Kahlenberg M.S., Sullivan J.M., Witmer D.D., Petrelli N.J. *Surg. Oncol.*, 2008, vol. 12, pp. 173–186.

Рецензенты:

Абоян И.А., д.м.н., профессор, главный врач МЛПУЗ «Клинико-диагностический центр «Здоровье», г. Ростов-на-Дону;

Фатхи В.А., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Вычислительные системы и информационная безопасность» ГБОУ ВПО «Институт энергетики и машиностроения Донского государственного технического университета», г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 03.08.2012.