

# ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ СЫВОРОТОЧНЫХ ОНКОМАРКЕРОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЕПАТИТОМ С

DOI: 10.17691/stm2021.13.1.03

УДК 616.36–006.6–092.6–071–079.1

Поступила 3.10.2020 г.



**С.И. Малов**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней<sup>1</sup>; старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>;

**И.В. Малов**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней<sup>1</sup>;

**А.Г. Кувшинов**, к.м.н., ассистент кафедры онкологии и лучевой терапии<sup>1</sup>;

**P.N. Marche**, PhD, Professor, Vice Director of Research Center<sup>3</sup>;

**T. Decaens**, PhD, Professor, Research Director, Laboratory Head of Department of Hepatology and Gastroenterology<sup>4</sup>;

**Z. Macek-Jilkova**, PhD, Researcher of Department of Hepatology and Gastroenterology<sup>4</sup>;

**Н.Д. Ющук**, д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Иркутский государственный медицинский университет, ул. Красного восстания, 1, Иркутск, 664003;

<sup>2</sup>Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, м/р Юбилейный, 100, Иркутск, 664049;

<sup>3</sup>Institute for Advanced Biosciences, Site Santé, Allée des Alpes, La Tronche, 38700, France;

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Avenue Maquis du Grésivaudan, La Tronche, 38700, France;

<sup>5</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, ул. Делегатская, 20/1, Москва, 127473

**Цель исследования** — по совокупности диагностических характеристик и корреляционных связей определить наиболее эффективные сывороточные онкомаркеры для ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находились 55 больных хроническим гепатитом С в стадии цирроза печени с верифицированным диагнозом гепатоцеллюлярной карциномы. Группу сравнения составили 55 больных хроническим гепатитом С в стадии цирроза печени без гепатоцеллюлярной карциномы, сопоставимых по основным клиническим характеристикам с опытной группой. В обеих группах определяли следующие онкомаркеры: альфа-фетопротейн (AFP), альфа-фетопротейн L3 (AFP-L3), аннексин A2 (ANXA2), гепарин-связывающий фактор роста Midkine (MDK), глипикан-3 (GPC3), дез-гамма-карбоксипротромбин (DCP, PIVKA-II), диккопф-подобный протеин 1 (DKK-1), остеопонтин (OPN), протеин Гольджи-73 (GP73). Оценивали такие показатели, как диагностическая чувствительность, специфичность, положительное прогностическое значение, отрицательное прогностическое значение, отношение правдоподобия положительного результата, наличие корреляции между альфа-фетопротейном и другими онкомаркерами. Расчет площади под ROC-кривой (AUC) проводили при уровне доверительного интервала 95%.

**Результаты.** Наибольшая чувствительность выявлена при использовании гепарин-связывающего фактора роста, аннексина A2, остеопонтина. Наилучшими показателями специфичности характеризовались альфа-фетопротейн, альфа-фетопротейн L3, глипикан-3, дез-гамма-карбоксипротромбин, диккопф-подобный протеин 1. Показатель AUC>0,75 выявлен у аннексина A2, гепарин-связывающего фактора роста, глипикана-3, дез-гамма-карбоксипротромбина, остеопонтина, протеина Гольджи-73. Отношение правдоподобия положительного результата оказалось самым высоким у глипикана-3. Значимая корреляция обнаружена между альфа-фетопротейном и альфа-фетопротейном L3, аннексином A2, дез-гамма-карбоксипротромбином.

**Заключение.** По совокупным показателям диагностической эффективности к наиболее перспективным из исследованных следует отнести гепарин-связывающий фактор роста, глипикан-3 и остеопонтин. Уровень этих онкомаркеров в крови больных гепатоцеллюлярным раком не коррелирует с альфа-фетопротейном, интегральный показатель AUC при их использовании показывает значения выше среднего. Они применимы для диагностики рака печени у AFP-негативных больных. Комбинированное использование AFP+GPC3, AFP+OPN уже показало их преимущество. Однако эффективность комбинации AFP+MDK, GPC3+OPN еще не определена, поэтому оценку значимости комбинированного использования указанных онкомаркеров в диагностике рака печени следует ожидать в ближайшем будущем.

**Ключевые слова:** гепатоцеллюлярная карцинома; гепатит С; онкомаркеры; протеомика.

**Как цитировать:** Malov S.I., Malov I.V., Kuvshinov A.G., Marche P.N., Decaens T., Macek-Jilkova Z., Yushchuk N.D. Search for effective serum tumor markers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(1): 27–34, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.1.03>

**Для контактов:** Малов Сергей Игоревич, e-mail: lynx2000@mail.ru

## Search for Effective Serum Tumor Markers for Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis C

**S.I. Malov**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Infectious Diseases<sup>1</sup>; Senior Researcher, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>;

**I.V. Malov**, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases<sup>1</sup>;

**A.G. Kuvshinov**, MD, PhD, Assistant, Department of Oncology and Radiation Therapy<sup>1</sup>;

**P.N. Marche**, PhD, Professor, Vice Director of Research Center<sup>3</sup>;

**T. Decaens**, PhD, Professor, Research Director, Laboratory Head of Department of Hepatology and Gastroenterology<sup>4</sup>;

**Z. Macek-Jilkova**, PhD, Researcher, Department of Hepatology and Gastroenterology<sup>4</sup>;

**N.D. Yushchuk**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Irkutsk State Medical University, 1 Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003, Russia;

<sup>2</sup>Irkutsk State Medical Academy of Post-Graduate Education, a Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, 100 Yubileyny Microdistrict, Irkutsk, 664049, Russia;

<sup>3</sup>Institute for Advanced Biosciences, Site Santé, Allée des Alpes, La Tronche, 38700, France;

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Avenue Maquis du Grésivaudan, La Tronche, 38700, France;

<sup>5</sup>A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia

**The aim of the study** was to identify the most effective serum tumor markers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma based on the combination of diagnostic characteristics and correlations.

**Materials and Methods.** There were observed 55 patients with chronic hepatitis C in the stage of liver cirrhosis with a verified diagnosis of hepatocellular carcinoma. The control group consisted of 55 patients with chronic hepatitis C at the stage of liver cirrhosis without hepatocellular carcinoma, comparable to the experimental group in terms of basic clinical profile. The following tumor markers were estimated in both groups: alpha-fetoprotein (AFP), alpha-fetoprotein-L3 (AFP-L3), annexin A2 (ANXA2), heparin-binding growth factor Midkine (MDK), glypican-3 (GPC3), des-gamma-carboxyprothrombin (DCP, PIVKA-II), dickkopf-related protein 1 (DKK-1), osteopontin (OPN), and Golgi protein 73 (GP73). There were also evaluated such indices as diagnostic sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, likelihood ratio of a positive test, the possible correlation between alpha-fetoprotein and other tumor markers. The area under the ROC curve (AUC) was calculated at the 95% confidence interval.

**Results.** The greatest sensitivity was revealed when using heparin-binding growth factor, annexin A2, osteopontin. Alpha-fetoprotein, alpha-fetoprotein-L3, glypican-3, des-gamma-carboxyprothrombin, dickkopf-related protein 1 had the best specificity. AUC>0.75 was found in annexin A2, heparin-binding growth factor, glypican-3, des-gamma-carboxyprothrombin, osteopontin, Golgi protein 73. The likelihood ratio of a positive test result was the highest for glypican-3. A significant correlation was found between alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein-L3, annexin A2, des-gamma-carboxyprothrombin.

**Conclusion.** According to the aggregate indicators of diagnostic efficiency, heparin-binding growth factor, glypican-3, and osteopontin are the most promising tumor markers of those studied. When they are used, integral AUC values are above the average, the level of these tumor markers in the blood of patients with hepatocellular cancer does not correlate with alpha-fetoprotein. They are applicable for diagnosing liver cancer in AFP-negative patients. The combined use of AFP + GPC3, AFP + OPN has already shown their advantages. However, the efficacy of the combination of AFP + MDK, GPC3 + OPN has not been determined yet; therefore, significance of the combined use of these tumor markers in the diagnosis of liver cancer should be investigated in the near future.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; hepatitis C; tumor markers; proteomics.

### Введение

Среди причин смерти онкологических больных гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) занимает второе место в мире [1]. Такой высокий показатель обусловлен поздней диагностикой заболевания, так как на ранней стадии ГЦК протекает бессимптомно и может быть выявлена уже на стадии роста опухолевого узла при проведении ультразвукового обследования печени.

Основным фактором риска развития ГЦК является инфицирование вирусами гепатитов В и С. В связи с появлением в 90-х годах вакцины против гепатита В и массовой вакцинацией населения значение гепатита В значительно уменьшилось. В результате в оценке этиологической значимости акценты сместились в сторону гепатита С, который сегодня стал основной инфекционной причиной развития ГЦК [2].

Патогенез рака печени при гепатите С предполагает

в качестве первого этапа развитие цирроза печени, на фоне которого риски возникновения ГЦК многократно увеличиваются. Так, даже после элиминации вируса в результате противовирусной терапии у больных сохраняются риски возникновения ГЦК, которые составляют при циррозе класса А по шкале Чайлда–Пью 2,1% в год, а класса В — 7,8% в год [3].

В этих условиях совершенствование методов раннего обнаружения ГЦК является актуальной задачей современного здравоохранения, решение которой позволит выстроить эффективную систему оказания помощи больным и снизить смертность от этого заболевания.

В соответствии с клиническими рекомендациями Европейской ассоциации по изучению болезней печени (EASL) [4] и методическим руководством Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации онкологов России [5] ранняя диагностика ГЦК основывается на ультразвуковом исследовании печени и определении уровня гликопротеина альфа-фетопротеина (AFP) в сыворотке крови.

Ультразвуковое исследование брюшной полости широко распространено в медицинских учреждениях, но его эффективность зависит от класса аппарата, опыта врача и размера опухоли. Чувствительность этого метода достигает 90% для опухолей более 5 см в диаметре, 70% — для узлов диаметром 1–2 см и только 50% — при размере опухоли менее 1 см [6].

Второй диагностический компонент — AFP, синтезируемый эндодермальными клетками желточного мешка зародыша, а в последующем — эмбриональными гепатоцитами [7]. Повышение уровня AFP в сыворотке крови наблюдается при различных онкологических заболеваниях, но в большей степени характерно для ГЦК [8]. Анализ литературы, оценивающей AFP в качестве биомаркера ГЦК, показал диапазон его чувствительности и специфичности на разных стадиях развития ГЦК 26–65 и 80–94 соответственно [9, 10]. В связи с низкой чувствительностью AFP в некоторых национальных версиях клинических рекомендаций он исключен из диагностического алгоритма ГЦК [11, 12].

В связи с этим в последние годы во всех странах мира ведутся интенсивные поиски молекул и веществ, определение которых в биологических средах организма позволило бы на ранней стадии и с высокой степенью эффективности диагностировать ГЦК. Такие разработки осуществляются в области протеомики, геномики и метаболомики. Наиболее перспективно определение белковых молекул, так как методы индикации различных протеинов достаточно хорошо автоматизированы, имеют высокую чувствительность и воспроизводимость.

**Цель исследования** — по совокупности диагностических характеристик и корреляционных связей определить наиболее эффективные сывороточные онкомаркеры для ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы.

## Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 110 больных хроническим гепатитом С (ХГС) в стадии цирроза печени, в том числе 55 — без признаков ГЦК и 55 — с верифицированным диагнозом ГЦК.

Диагноз гепатита С устанавливали на основании данных анамнеза, клинического обследования, определения активности печеночных трансаминаз, выявления анти-HCV IgG и РНК вируса гепатита С. Стадию фиброза печени определяли с помощью аппарата FibroScan 502 (Echosens, Франция). Генотип 1 вируса был выявлен у 56 больных (50,9%), генотип 2 — у 7 (6,4%), генотип 3 — у 47 (42,7%). В анамнезе противовирусную терапию указанные пациенты не получали. Цирроз печени был подтвержден на основании клинико-лабораторных данных, эластометрии печени, результатов УЗИ, компьютерной и/или магнитно-резонансной томографии. Степень тяжести цирроза определяли по шкале Чайлда–Пью [13, 14].

Диагноз ГЦК устанавливали с учетом критериев EASL [4]. Больные наблюдались и лечились в Областной клинической инфекционной больнице, Областном клиническом консультативно-диагностическом центре и Областном онкологическом диспансере (Иркутск). У всех больных диагноз был верифицирован морфологически. У 10 человек (18,2%) заболевание было выявлено на I стадии болезни по классификации TNM, у 45 (81,8%) — на II–IIIА стадии. Настоящая работа была проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2013) и одобрена комитетом по этике Иркутского государственного медицинского университета. Информированное согласие было получено от каждого участника.

Для лабораторных исследований использовали пробы крови, полученные до проведения оперативного лечения или процедуры локальной деструкции опухоли. Группа больных ХГС была сопоставима по основным клиническим характеристикам с группой больных ГЦК (табл. 1).

Диспансерное наблюдение за пациентами с ХГС осуществлялось в среднем в течение 12 мес и включало клинический осмотр, общеклинические и биохимические анализы, эластометрию печени, УЗИ органов брюшной полости. При необходимости выполнялась компьютерная или магнитно-резонансная томография печени. Таким образом, в контрольной группе было подтверждено отсутствие ГЦК как минимум в течение одного года после забора крови на определение онкомаркеров.

После забора крови все образцы сыворотки центрифугировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для определения уровня онкомаркеров использовали иммунохимический анализатор с хемилюминесцентной технологией Architect i2000SR (Abbott Diagnostics, Корея) и иммуноферментный анализатор Victor3 Plate Reader (PerkinElmer, США). Производители диагностических наборов и

Таблица 1

## Клиническая характеристика больных хроническим гепатитом С с гепатоцеллюлярной карциномой и без нее (M±m)

| Показатель  | Больные гепатоцеллюлярной карциномой (n=55) | Больные хроническим гепатитом С (n=55) | p     |
|---|---|--|-------|
| Средний возраст, лет  | 59,9±4,5                                    | 57,7±10,5                              | >0,05 |
| Пол, n (%):   |   |  |       |
| мужской   | 38 (69,1±6,2)                               | 35 (63,6±5,7)                          | >0,05 |
| женский   | 17 (30,9±6,2)                               | 20 (36,4±5,7)                          | >0,05 |
| Боли в животе, n (%)  | 10 (18,2±5,2)                               | 8 (14,5±4,5)                           | >0,05 |
| Потеря массы, n (%)   | 45 (81,8±5,2)                               | 45 (81,8±5,2)                          | >0,05 |
| Средний индекс массы тела                                     | 25,7±11,0                                   | 23,8±8,0                               | >0,05 |
| Слабость, n (%)   | 52 (94,5±3,1)                               | 45 (81,8±5,2)                          | 0,038 |
| Переливание крови в анамнезе, n (%)                           | 7 (12,7±4,5)                                | 6 (10,9±3,8)                           | >0,05 |
| Наличие желтухи в анамнезе, n (%)                             | 3 (5,4±3,1)                                 | 1 (1,8±2,0)                            | >0,05 |
| Класс по Чайлд-Пью, n (%):                                    |   |  |       |
| А   | 11 (20,0±5,4)                               | 13 (23,6±5,7)                          | >0,05 |
| В   | 25 (45,5±6,7)                               | 22 (40,0±6,6)                          | >0,05 |
| С   | 19 (34,5±6,4)                               | 20 (36,4±6,5)                          | >0,05 |
| Злоупотребление алкоголем (>16 баллов по шкале Audit), n (%)  | 7 (12,7±4,5)                                | 9 (16,4±4,5)                           | >0,05 |
| Количество тромбоцитов, среднее значение, ×10 <sup>9</sup> /л | 124±40                                      | 138±50                                 | >0,05 |
| Общий билирубин, среднее значение, мкмоль/л                   | 47,9±18,7                                   | 27,2±8,6                               | >0,05 |
| Альбумин, среднее значение, г/л                               | 28,9±1,3                                    | 32,0±4,0                               | >0,05 |
| Активность АЛТ, среднее значение, МЕ/л                        | 76,6±33,8                                   | 65,5±10,9                              | >0,05 |
| Активность АСТ, среднее значение, МЕ/л                        | 98,5±40,1                                   | 88,0±9,8                               | >0,05 |
| TNM, стадия, n (%):   |   |  |       |
| I   | 10 (18,2±5,2)                               | —                                      | —     |
| II  | 37 (67,3±6,1)                               | —                                      | —     |
| IIIA  | 8 (14,5±4,6)                                | —                                      | —     |

технические характеристики тест-систем для определения онкомаркеров представлены в табл. 2.

Лабораторные исследования осуществляли в НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета и в лаборатории аналитической иммунологии Института передовых биологических наук Университета Гренобль-Альпы (Франция).

**Методы статистической обработки.** Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Meta-DiSc 1.4 Software, которая находится в открытом доступе по ссылке: <https://meta-disc.software.informer.com/1.4/>. Статистический анализ включал в себя сравнение двух выборок и корреляционный анализ. Определение порогового значения (cut-off) для каждого онкомаркера проводили путем расчета наибольшего значения индекса Юдена [15]. Оценивали такие показатели, как диагностическая чувствительность (Se), специфичность (Sp), положительное прогностическое значение (PPV), отрицательное прогностическое значение (NPV) и отношение правдоподобия положительного результата (PLR). Значимость различий изучаемых показателей в группах определяли по критериям хи-квадрат ( $\chi^2$ ) и точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

Для оценки диагностической

Таблица 2

## Технические характеристики тест-систем для определения онкомаркеров, использованных в работе

| Онкомаркер (его аббревиатура)                  | Наименование тест-системы; каталожный номер (производитель)   | Чувствительность, нг/мл |
|--|---|-------------------------|
| Альфа-фетопроtein (AFP)                        | Architect AFP; В3р360 (Abbott Diagnostics, Корея)   | 2,0                     |
| Альфа-фетопроtein L3 (AFP-L3)                  | ELISA Kit for Alpha-Fetoprotein Lens Culinaris Agglutinin; SEB117Hu (Cloud-Clone Corp., США)                | 0,239                   |
| Аннексин А2 (ANXA2)                            | ELISA Kit for Annexin A2; SEB944Hu (Cloud-Clone Corp., США)   | 0,061                   |
| Гепарин-связывающий фактор роста Midkine (MDK) | ELISA Kit for Midkine; SEA63Hu (Cloud-Clone Corp., США)   | 0,055                   |
| Глипикан-3 (GPC3)                              | ELISA Kit for Glypican 3; SEA971Hu (Cloud-Clone Corp., США)   | 0,057                   |
| Дез-гамма-карбокситротромбин (DCP, PIVKA-II)   | Human protein induced vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) ELISA Kit; CSB-E13343h (Cusabio, Китай) | 0,312                   |
| Диккопф-подобный протеин 1 (DKK-1)             | ELISA Kit for Dickkopf related protein 1; SEA74Hu (Cloud-Clone Corp., США)                                  | 0,056                   |
| Остеопонтин (OPN)                              | Human Osteopontin Platinum ELISA Kit; BMS 2066 (Affymetrix/eBioscience, США)                                | 0,260                   |
| Протеин Гольджи-73 (GP73)                      | ELISA Kit for Gogi protein 73; SEB668Hu (Cloud-Clone Corp., США)  | 0,229                   |

эффективности отдельных онкомаркеров использовали ROC-анализ [15]. Расчет площади под ROC-кривой (AUC) проводили при уровне доверительного интервала 95% (confidence interval, 95% CI). Показатели AUC оценивали по следующим критериям:  $AUC \leq 0,75$  — низкая диагностическая эффективность;  $0,75 < AUC < 0,90$  — средняя;  $AUC \geq 0,90$  — высокая. Уровнем статистической значимости считали  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

На первом этапе были определены оптимальные пороговые значения (cut-off) для каждого онкомаркера по наибольшему значению индекса Юдена (табл. 3). Выбранное пороговое значение соответствовало оптимальному соотношению чувствительности и специфичности. Наибольшая чувствительность ( $\geq 80,0\%$ ) выявлена при использовании для диагностики ГЦК маркеров MDK, ANXA2, OPN. В то же время наилучшими показателями специфичности ( $\geq 80,0\%$ ) характеризовались маркеры AFP, AFP-L3, GPC3, DCP (PIVKA-II), DKK-1, GP73 (табл. 4).

У шести маркеров из девяти исследуемых такой интегральный показатель, как AUC, оказался выше среднего значения: у ANXA2, MDK, GPC3, DCP (PIVKA-II), OPN, GP73. Это характеризует их как потенциально перспективные в диагностическом плане белки. Вместе с тем PLR оказалось самым высоким у GPC3 (см. табл. 4). Это означает, что вероятность положительного теста у больных ХГС с ГЦК в 16,67 раза выше, чем у больных ХГС без ГЦК, что свидетельствует о существен-

ном диагностическом преимуществе использования данного онкомаркера.

Для определения эффективной комбинации маркеров с AFP важно знать степень корреляции между ними. В случае отсутствия корреляции и при  $AUC > 0,75$  каждый онкомаркер вносит свой дополнительный вклад в диагностическую эффективность, а не дублирует показатели AFP. Значимая корреляция обнаружена между AFP и AFP-L3, ANXA2, DCP (PIVKA-II), что заставляет усомниться в целесообразности их совместного использования (см. табл. 3).

Еще одним критерием для отбора перспективных диагностических онкомаркеров ГЦК является частота положительных результатов выявления онкомаркера у больных с AFP-негативной ГЦК [10]. В этом плане наилучшие результаты показали MDK, OPN, GP73 и GPC3 (см. табл. 3).

Таблица 3

Оптимальное пороговое значение и взаимосвязь между AFP и другими онкомаркерами

| Онкомаркер    | Кoeffициент корреляции (r) | p коэффициента корреляции | Частота положительных результатов при AFP < 20 нг/мл, % | Оптимальное cut-off, нг/мл |
|---------------|----------------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| AFP           | —                          | —                         | —   | 20,0                       |
| AFP-L3        | 0,576                      | 0,0003                    | 13,3  | 13,5                       |
| ANXA2         | 0,337                      | 0,048                     | 33,3  | 16,0                       |
| MDK           | 0,241                      | 0,16                      | 73,3  | 0,8                        |
| GPC3          | 0,190                      | 0,27                      | 50,0  | 2,0                        |
| DCP, PIVKA-II | 0,490                      | 0,0029                    | 20,0  | 20,0                       |
| DKK-1         | 0,272                      | 0,11                      | 43,3  | 1,2                        |
| OPN           | 0,145                      | 0,41                      | 66,7  | 100,0                      |
| GP73          | 0,262                      | 0,13                      | 53,3  | 1,2 МЕ/мл                  |

Таблица 4

Оценка диагностической эффективности онкомаркеров гепатоцеллюлярной карциномы при оптимальном cut-off

| Онкомаркер    | Se, n (%) | Sp, n (%) | AUC   | 95% CI (p AUC)    | PPV, % | NPV, % | PLR   |
|---------------|-----------|-----------|-------|-------------------|--------|--------|-------|
| AFP           | 25 (45,5) | 52 (94,5) | 0,630 | 0,57–0,70 (0,002) | 89,3   | 63,4   | 8,27  |
| AFP-L3        | 16 (29,1) | 53 (96,4) | 0,679 | 55,5–79,1 (0,002) | 88,9   | 57,6   | 6,33  |
| ANXA2         | 44 (80,0) | 38 (69,1) | 0,793 | 67,4–89,0 (0,001) | 72,1   | 77,6   | 2,59  |
| MDK           | 47 (85,5) | 35 (63,6) | 0,795 | 67,4–89,0 (0,001) | 70,1   | 81,4   | 2,35  |
| GPC3          | 33 (60,0) | 53 (96,4) | 0,836 | 72,1–92,5 (0,001) | 91,7   | 70,7   | 16,67 |
| DCP, PIVKA-II | 30 (54,6) | 49 (88,6) | 0,760 | 64,4–86,6 (0,001) | 83,3   | 66,2   | 4,79  |
| DKK-1         | 28 (50,9) | 44 (89,1) | 0,707 | 58,4–81,7 (0,002) | 71,8   | 62,0   | 4,67  |
| OPN           | 44 (80,0) | 42 (76,6) | 0,787 | 74,1–83,5 (0,001) | 77,2   | 79,3   | 3,42  |
| GP73          | 35 (63,6) | 44 (80,0) | 0,764 | 64,4–86,6 (0,001) | 76,1   | 68,8   | 3,18  |

## Обсуждение

За последнее время для ранней диагностики ГЦК предложено несколько десятков онкомаркеров, находящихся на различных стадиях клинической апробации [16–18]. Как следует из отдельных публикаций и комплексных обзоров, достичь 80% уровня чувствительности позволяет использование таких специфических белков, как ANXA2, MDK,  $\alpha$ -1-фукозидаза (AFU), иммунный комплекс IgM-антиген плоскоклеточного рака (SCCA-IgM). Однако при высокой чувствительности диагностическая специфичность определения этих онкомаркеров достаточно низкая и варьирует от 50,0 до 70,5% [16, 19–22]. И наоборот, высокоспецифичные (>90%) белковые маркеры (AFP-L3, рецептор-активатор плазминогена (suPAR), DCP (PIVKA-II)) показывают низкую чувствительность — 28–76% [16, 22–25]. Таким образом, в настоящее время ни один онкомаркер, взятый по отдельности, не обеспечивает на ранней стадии ГЦК высокой диагностической эффективности [26].

По этим причинам основной поиск идет в направлении комбинированного использования двух, трех и даже четырех онкомаркеров с различными механизмами экспрессии в процессе канцерогенеза [27–30]. Описаны комбинации, включающие AFP, AFP-L3, DCP (PIVKA-II), ANXA2, OPN, DKK-1, рецептор тирозинкиназы sAx1 (AXL), тиоредоксин (Trx1) [22, 26, 27, 31, 32]. Это в большинстве случаев позволяет несколько повысить эффективность диагностики. Однако комбинация тех или иных онкомаркеров, как правило, осуществляется интуитивно, произвольным образом. Кроме того, необходимо учитывать, что в методическом плане многие исследования выполнены с использованием неоднородных по этиологическому фактору ГЦК клинических групп. Нередко в исследования включаются пациенты, находящиеся на разных стадиях болезни. Очевидно, что присутствие в анализируемых группах больных, находящихся как на ранней, так и на продвинутой стадии болезни, не позво-

ляет оценить значение маркера именно для ранней диагностики ГЦК (I–II стадия по классификации TNM), тем более, что при размере опухолевого узла более 2,0 см достаточно эффективны инструментальные методы диагностики (УЗИ, компьютерная и магнитно-резонансная томография) и необходимость определения сывороточных онкомаркеров отпадает [4].

В настоящей работе были исследованы наиболее информативные параметры, влияющие на диагностическую эффективность онкомаркеров, и возможность их комбинированного использования с AFP (табл. 5).

Оказалось, что наибольшим набором диагностических преимуществ обладают MDK, GPC3 и OPN. По отдельности эти онкомаркеры уже были в той или иной степени апробированы в диагностике ГЦК [17, 19, 26, 33].

MDK является фактором роста, стимулирующим пролиферацию и дифференцировку клеток. Установлено, что уровень MDK у больных ГЦК в среднем в 5 раз выше, чем у больных циррозом печени без ГЦК. При этом Se изолированного определения MDK составила 90%, а AFP — лишь 50% [19].

GPC3 принадлежит к семейству глипиканов-протеогликанов. Повышенный уровень GPC3 выявляется у 50–55% пациентов с ГЦК и только у 5% больных с циррозом печени [34]. Самостоятельное значение GPC3 для диагностики ГЦК ограничено в связи с низкой чувствительностью [35]. GPC3 определяется иммуногистохимически в биоптатах печени, что используется в клинике при дифференциальной диагностике ГЦК и других поражений печени [36].

OPN представляет собой интегрин-связывающий гликофосфопротеин, который продуцируется в повышенном количестве при многих злокачественных новообразованиях [37]. OPN повышается за 6–12 мес до инструментального обнаружения ГЦК и обладает лучшей чувствительностью, чем AFP [38].

Уровень данных онкомаркеров в крови больных ГЦК не коррелирует с AFP, интегральный показатель AUC при их использовании показывает значения выше

Таблица 5

## Показатели диагностической эффективности онкомаркеров

| Онкомаркер    | Показатель                           |          |         |  | Сумма показателей диагностических преимуществ |
|---------------|--------------------------------------|----------|---------|--|---|
|               | Отсутствие значимой корреляции с AFP | AUC>0,75 | PLR>4,0 | Более 60% положительных результатов у больных с уровнем AFP<20 нг/мл |   |
| AFP           | —                                    | —        | +       | —  | —   |
| AFP-L3        | —                                    | —        | +       | —  | 1   |
| ANXA2         | —                                    | +        | —       | —  | 1   |
| MDK           | +                                    | +        | —       | +  | 3   |
| GPC3          | +                                    | +        | +       | —  | 3   |
| DCP, PIVKA-II | —                                    | +        | +       | —  | 2   |
| DKK-1         | +                                    | —        | +       | —  | 2   |
| OPN           | +                                    | +        | —       | +  | 3   |
| GP73          | +                                    | +        | —       | —  | 2   |

среднего, они применимы для диагностики ГЦК у AFP-негативных больных. Кроме того, GPC3 отличается от остальных онкомаркеров существенно более высоким показателем PLR, что ставит его в ряд перспективных при комбинированном использовании.

Комбинированное использование AFP+GPC3 и AFP+OPN уже показало их преимущество (AUC равно 0,85 и 0,90 соответственно) [29, 33]. Однако исследования MDK, а также комбинации AFP+MDK, GPC3+OPN до настоящего времени не проводились, поэтому оценку эффективности комбинированного использования указанных онкомаркеров следует ожидать в ближайшем будущем.

## Заключение

В результате исследования выявлены кандидатные белки, количественное определение которых в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С имеет ряд диагностических преимуществ по сравнению с другими онкомаркерами. Среди них наиболее перспективными являются MDK, GPC-3 и OPN. ROC-анализ и исследование корреляционных связей дают основание ожидать высокоэффективных результатов от использования онкомаркеров в сочетании с AFP, а также в комбинации друг с другом.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы проведения исследований по приоритетным направлениям с участием научно-исследовательских организаций и университетов российско-французской Партнерской программы Юбера Кюрьена «Колмогоров» (контракт №14.616.21.0098; уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI61618X0098).

**Конфликт интересов.** У авторов статьи конфликт интересов отсутствует.

## Литература/References

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
2. Kim H.S., El-Serag H.B. The epidemiology of hepatocellular carcinoma in the USA. *Curr Gastroenterol Rep* 2019; 21(4): 17, <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0681-x>.
3. Calvaruso V., Cabibbo G., Cacciola I., Petta S., Madonia S., Bellia A., Tinè F., Distefano M., Licata A., Giannitrapani L., Prestileo T., Mazzola G., Di Rosolini M.A., Larocca L., Bertino G., Digiacoimo A., Benanti F., Guarneri L., Averna A., Iacobello C., Magro A., Scalisi I., Cartabellotta F., Savalli F., Barbara M., Davì A., Russello M., Scifo G., Squadruto G., Cammà C., Raimondo G., Craxì A., Di Marco V.; Rete Sicilia Selezione Terapia-HCV (RESIST-HCV). Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated cirrhosis treated with direct-acting antiviral agents.

*Gastroenterology* 2018; 155(2): 411–421.e4, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.008>.

4. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; 69(1): 182–236, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.

5. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Каприн А.Д., Арапов М.Ю., Андреев Д.Н., Водолеев А.С., Жаркова М.Ю., Королев М.П., Кучерявый Ю.А., Лапина Т.Л., Маевская М.В., Охлобыстин А.В., Павлов Ч.С., Параскевова А.В., Пирогов С.С., Полуэктова Е.А., Румянцева Д.Е., Трухманов А.С., Царьков П.В., Шептулин А.А., Шифрин О.С. Раннее выявление онкологических заболеваний органов пищеварения (методическое руководство Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации онкологов России для врачей первичного звена здравоохранения). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии* 2019; 29(5): 53–74, <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-5-53-74>.

Ivashkin V.T., Mayev I.V., Kaprin A.D., Agapov M.Yu., Andreev D.N., Vodoleev A.S., Zharkova M.Yu., Korolev M.P., Kucheryavii Yu.A., Lapina T.L., Mayevskaya M.V., Okhlobystin A.V., Pavlov C.S., Paraskevova A.V., Pirogov S.S., Poluektova E.A., Rummyantseva D.E., Trukhmanov A.S., Tsarkov P.V., Sheptulin A.A., Shifrin O.S. Early detection of oncological diseases of the digestive system (guidelines of the Russian Gastroenterological Association and the Russian Association of Oncologists for primary care physicians). *Rossiiskij zurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* 2019; 29(5): 53–74, <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-5-53-74>.

6. Singal A., Volk M.L., Waljee A., Salgia R., Higgins P., Rogers M.A., Marrero J.A. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30(1): 37–47, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04014.x>.

7. Abelev G.I. Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. *Cancer Res* 1968; 28(7): 1344–1350.

8. Bai D.S., Zhang C., Chen P., Jin S.J., Jiang G.Q. The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2017; 7(1): 12870, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12834-1>.

9. Zhang K., Song P., Gao J., Li G., Zhao X., Zhang S. Perspectives on a combined test of multi serum biomarkers in China: towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage. *Drug Discov Ther* 2014; 8(3): 102–109, <https://doi.org/10.5582/ddt.2014.01026>.

10. Shu H., Li S., Shang S., Qin X., Zhang S., Liu Y. Diagnosis of AFP-negative early-stage hepatocellular carcinoma using Fuc-PON1. *Discov Med* 2017; 23(126): 163–168.

11. Aubé C., Oberti F., Lonjon J., Pageaux G., Seror O., N'Kontchou G., Rode A., Radenne S., Cassinotto C., Vergniol J., Bricault I., Leroy V., Ronot M., Castera L., Michalak S., Esvan M., Vilgrain V.; CHIC Group. EASL and AASLD recommendations for the diagnosis of HCC to the test of daily practice. *Liver Int* 2017; 37(10): 1515–1525, <https://doi.org/10.1111/liv.13429>.

12. Frenette C.T., Isaacson A.J., Bargellini I., Saab S., Singal A.G. A practical guideline for hepatocellular carcinoma screening in patients at risk. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes* 2019; 3(3): 302–310, <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2019.04.005>.

13. Child C.G., Turcotte J.G. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964; 1: 1–85.
14. Pugh R.N., Murray-Lyon I.M., Dawson J.L., Pietroni M.C., Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60(8): 646–649, <https://doi.org/10.1002/bjs.1800600817>.
15. Старовойтов В.В., Голуб Ю.И. Сравнительный анализ оценок качества бинарной классификации. *Информатика* 2020; 17(1): 87–101, <https://doi.org/10.37661/1816-0301-2020-17-1-87-101>.
- Starovoitov V.V., Golub Yu.I. Comparative study of quality estimation of binary classification. *Informatika* 2020; 17(1): 87–101, <https://doi.org/10.37661/1816-0301-2020-17-1-87-101>.
16. Reichl P., Mikulits W. Accuracy of novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma: an update for clinicians (review). *Oncol Rep* 2016; 36(2): 613–625, <https://doi.org/10.3892/or.2016.4842>.
17. Sengupta S., Parikh N.D. Biomarker development for hepatocellular carcinoma early detection: current and future perspectives. *Hepat Oncol* 2017; 4(4): 111–122, <https://doi.org/10.2217/hep-2017-0019>.
18. Hemken P.M., Sokoll L.J., Yang X., Dai J., Elliott D., Gawel S.H., Lucht M., Feng Z., Marrero J.A., Srivastava S., Chan D.W., Davis G.J. Validation of a novel model for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Clin Proteomics* 2019; 16: 2, <https://doi.org/10.1186/s12014-018-9222-0>.
19. Hodeib H., ELshora O., Selim A., Sabry N.M., El-Ashry H.M. Serum midkine and osteopontin levels as diagnostic biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Electron Physician* 2017; 9(1): 3492–3498, <https://doi.org/10.19082/3492>.
20. Junna Z., Gongde C., Jinying X., Xiu Z. Serum AFU, 5'-NT and AFP as biomarkers for primary hepatocellular carcinoma diagnosis. *Open Med (Wars)* 2017; 12: 354–358, <https://doi.org/10.1515/med-2017-0051>.
21. Liu C.H., Gil-Gómez A., Ampuero J., Romero-Gómez M. Diagnostic accuracy of SCCA and SCCA-IgM for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Int* 2018; 38(10): 1820–1831, <https://doi.org/10.1111/liv.13867>.
22. Malov S.I., Malov I.V., Dvornichenko V.V., Marche P.N., Decaens T., Macek-Jilkova Z., Yushchuk N.D. Biomarkers in diagnosis and prediction of hepatocellular carcinoma recurrence (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(2): 183–196, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.23>.
23. Taketa K., Endo Y., Sekiya C., Tanikawa K., Koji T., Taga H., Satomura S., Matsuura S., Kawai T., Hirai H. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53(22): 5419–5423.
24. Chounta A., Ellinas C., Tzanetakou V., Pliarhopoulou F., Mplani V., Oikonomou A., Leventogiannis K., Giamarellos-Bourboulis E.J. Serum soluble urokinase plasminogen activator receptor as a screening test for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2015; 35(2): 601–607, <https://doi.org/10.1111/liv.12705>.
25. Wu J., Xiang Z., Bai L., He L., Tan L., Hu M., Ren Y. Diagnostic value of serum PIVKA-II levels for BCLC early hepatocellular carcinoma and correlation with HBV DNA. *Cancer Biomark* 2018; 23(2): 235–242, <https://doi.org/10.3233/cbm-181402>.
26. Tsuchiya N., Sawada Y., Endo I., Saito K., Uemura Y., Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015; 21(37): 10573–10583, <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10573>.
27. Ge T., Shen Q., Wang N., Zhang Y., Ge Z., Chu W., Lv X., Zhao F., Zhao W., Fan J., Qin W. Diagnostic values of alpha-fetoprotein, dickkopf-1, and osteopontin for hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2015; 32(3): 59, <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0367-z>.
28. Jang E.S., Jeong S.H., Kim J.W., Choi Y.S., Leissner P., Brecht C. Diagnostic performance of alpha-fetoprotein, alpha-fetoprotein-L3, protein induced by vitamin K absence, osteopontin, Dickkopf-1 and its combinations for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2016; 11(3): e0151069, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151069>.
29. Cerban R., Ester C., Iacob S., Ghioca M., Paslaru L., Dumitru R., Grasu M., Constantin G., Popescu I., Gheorghe L. Alpha-fetoprotein, alpha-fetoprotein-L3, protein induced by vitamin K absence, glypican 3 and its combinations for diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Surg Gastroenterol Oncol* 2019; 24(1): 37–44, <https://doi.org/10.21614/sgo-24-1-37>.
30. Yanming L., Yue C., Wencan C., Liangyin W., Xijun L., Jiafeng Z., Fengping H.E. Combined detection of AFP-L3, GP73 and TIP30 enhances diagnostic accuracy for HBV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Pak MED Assoc* 2019; 69(9): 1278–1286.
31. Waidely E., Al-Yuobi A.R., Bashammakh A.S., El-Shahawi M.S., Leblanc R.M. Serum protein biomarkers relevant to hepatocellular carcinoma and their detection. *Analyst* 2016; 141(1): 36–44, <https://doi.org/10.1039/c5an01884f>.
32. Park S.J., Jang J.Y., Jeong S.W., Cho Y.K., Lee S.H., Kim S.G., Cha S.W., Kim Y.S., Cho Y.D., Kim H.S., Kim B.S., Park S., Bang H.I. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(11): e5811, <https://doi.org/10.1097/md.00000000000005811>.
33. Liu S., Wang M., Zheng C., Zhong Q., Shi Y., Han X. Diagnostic value of serum glypican-3 alone and in combination with AFP as an aid in the diagnosis of liver cancer. *Clin Biochem* 2020; 79: 54–60, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.02.009>.
34. Montalbano M., Georgiadis J., Masterson A.L., McGuire J.T., Prajapati J., Shirafkan A., Rastellini C., Cicalese L. Biology and function of glypican-3 as a candidate for early cancerous transformation of hepatocytes in hepatocellular carcinoma (review). *Oncol Rep* 2017; 37(3): 1291–1300, <https://doi.org/10.3892/or.2017.5387>.
35. Van Hees S., Michielsen P., Vanwollegghem T. Circulating predictive and diagnostic biomarkers for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016; 22(37): 8271–8282, <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i37.8271>.
36. Majeed S., Mushtaq S., Azam M., Akhtar N., Hussain M., Loya A. Diagnostic accuracy of glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic liver tumours. *J Pak Med Assoc* 2018; 68(7): 1029–1031.
37. Zhao H., Chen Q., Alam A., Cui J., Suen K.C., Soo A.P., Eguchi S., Gu J., Ma D. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis* 2018; 9(3): 356, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0391-6>.
38. Cabiati M., Gaggini M., Cesare M.M., Caselli C., De Simone P., Filippini F., Basta G., Gastaldelli A., Del Ry S. Osteopontin in hepatocellular carcinoma: a possible biomarker for diagnosis and follow-up. *Cytokine* 2017; 99: 59–65, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.07.004>.