

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАННЕГО РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ЛОКАЛИЗОВАННЫМ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Омельченко В.П.¹, Бова Ф.С.², Демидова А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: alald@inbox.ru

²ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2», Ростов-на-Дону, e-mail: alald@inbox.ru

Цель: повысить эффективность прогноза ранних рецидивов у больных с локализованным раком предстательной железы (РПЖ) после радикального хирургического лечения путем оценки экспрессии простатспецифического антигена РСА3 в осадке и экзосомах мочи. Обследованы 148 больных локализованным РПЖ. Всем пациентам в сыворотке крови исходно и каждые 3 месяца после радикальной простатэктомии (РПЭ) в течение двух лет определяли содержание простатспецифического антигена (ПСА) путем иммуноферментного анализа. Пациентов делили на две подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия биохимического рецидива (БР). В осадке и экзосомах мочи у пациентов методом ПЦР в реальном времени определяли экспрессию гена РСА3 относительно референсного гена калликреина человека KLK3. Уровень экспрессии гена РСА3 в экзосомах мочи у больных при РПЖ и ПИН-2 был выше при последующем рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания. При снижении в осадке мочи ΔCt РСА3–KLK3 менее 1,86 включительно, БР у пациентов с РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне развивались чаще (83% против 45%, $p=0,008$). Прогностическая значимость оценки экспрессии гена РСА3 в осадке и экзосомах постмассажной мочи для определения риска БР после РПЭ у больных с локализованным РПЖ выше по сравнению с определением ПСА в сыворотке крови. При повышении экспрессии гена РСА3 в осадке и экзосомах постмассажной мочи у больных с локализованным РПЖ риск БР в течение двух лет после РПЭ возрастает.

Ключевые слова: рак предстательной железы, биохимический рецидив, простатспецифический антиген 3, моча, экзосомы.

PREDICTION OF EARLY RECOMMENDATION OF DISEASE IN PATIENTS WITH LOCALIZED CANCER OF THE PROSTATE GLAND AFTER RADICAL SURGICAL TREATMENT

Omelchenko V.P.¹, Bova Ph.S.², Demidova A.A.¹

¹The Rostov state medical university, Rostov-on-Don, e-mail: ms.victoria111@mail.ru;

²The State Budgetary organization of the Rostov Region "Regional Hospital №2", Rostov-on-Don, e-mail: alald@inbox.ru

Aim: increase the effectiveness of the prognosis of early relapses in patients with localized prostate cancer (PC) after radical surgical treatment by evaluating the expression of the prostate-specific antigen PCA3 in sediment and urine exosomes. 148 patients with localized prostate cancer were examined. All patients in the blood serum initially and every 3 months after radical prostatectomy (RPE) within two years the content of prostate-specific antigen (PSA) was determined by enzyme immunoassay. Patients were divided into two subgroups, depending on the presence or absence of biochemical recurrence (BR). In the sediment and exosomes of urine in patients, real-time PCR was used to determine the expression of the PCA3 gene relative to the reference KLK3 human kallikrein gene. The level of expression of the PCA3 gene in urine exosomes in patients with PC and PIN-2 was higher with subsequent recurrence compared with the favorable course of the disease. When ΔCt PCA3-KLK3 was less than 1,86 inclusive in the urine sediment, BR in patients with PC and PIN-2 developed more frequently in the peritumoral zone (83% versus 45%, $p = 0,008$). The prognostic significance of the evaluation of the expression of the PCA3 gene in sediment and exosomes of postmassage urine for determining the risk of BR after RP in patients with localized PC is higher compared with the determination of PSA in the serum. With an increase in the expression of the PCA3 gene in sediment and exosomes of postmassage urine in patients with localized prostate cancer, the risk of BR within two years after RPE increases.

Keywords: prostate cancer, biochemical recurrence, prostate-specific antigen 3, urine, exosomes.

В последнее время в клиническую практику широко внедрены системы диагностики, стадирования и мониторинга рака предстательной железы (РПЖ). Данное обстоятельство

привело к снижению возраста больных с впервые установленным диагнозом РПЖ и повышению доли пациентов с локализованным РПЖ [1]. В официальном отчете по состоянию онкологической помощи населению России указано, что в 2016 году доля больных раком РПЖ с опухолевым процессом I-II стадии составляла 56%, а в 2006 году – 37,6% [1]. В качестве лабораторного теста для диагностических и мониторинговых мероприятий используется определение простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови [2]. Безусловно, это эффективный метод скрининга и наблюдения за пациентами. Но различными исследователями показано, что у мужчин в серой зоне ПСА в сыворотке крови от 4 до 10 нг/мл РПЖ выявляется только в 25%, частота «ненужных» биопсий органа составляет 70-80% [3]. Причем необходимо учитывать, что ПСА не является раково-специфическим маркером, выполняет роль органоспецифического вещества. При вмешательствах на предстательной железе (ПЖ) (массаж, операции, биопсия, острая задержка мочи, ультразвуковое исследование), доброкачественных либо воспалительных процессах ПСА в крови повышается и может быть выше нормы [4].

В качестве перспективного направления в диагностике злокачественного процесса в ПЖ выступает оценка экспрессии специфического антигена рака ПЖ 3 (PCА3) в ткани органа. Гиперэкспрессия *PCА3* в ткани ПЖ строго специфична для РПЖ и его метастазов и не характерна для доброкачественных процессов в органе [5]. Экзосомы как объект для генетических исследований ввиду наличия в их составе мРНК и их участия в межкоммуникативных информационных связях между клетками начали использоваться с 2007 года [6]. Опухолевые клетки продуцируют больше экзосом, чем неопухолевые. Доказано участие экзосом в формировании преме-тастатических ниш, ремоделировании опухолевого микроокружения [7]. Поиск новых биологических сред для неинвазивной оценки экспрессии гена *PCА3* у больных позволит расширить эффективность диагностики и прогноза онкологического заболевания.

Целью работы явилось повысить эффективность прогноза ранних рецидивов у больных с локализованным РПЖ после радикального хирургического лечения путем оценки экспрессии гена *PCА3* в осадке и экзосомах мочи.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в Центре урологии, нефрологии и гемодиализа, в патологоанатомическом отделении ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2» в 2015-2017 гг. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения больных в исследование: 1) локализованный РПЖ (Т1с-Т2с);

2) выполнение больным радикальной простатэктомии (РПЭ); 3) отсутствие отдаленных метастазов.

Гистологические исследования в операционных биоптатах проведены у 148 больных с локализованным РПЖ (T1c–T2cN0M0). Возраст больных общей клинической группы колебался от 54 до 79 лет, составив в среднем $65,6 \pm 2,5$ года. Распределение больных в зависимости от клинической стадии РПЖ было следующим: cT_{1c} – 9/148 (6,1%), cT_{2a} – 20/148 (13,5%), cT_{2b} – 43/148 (29%), cT_{2c} – 76/148 (51,4%). Высокая степень гистопатологической дифференцировки (≤ 6 баллов по Глисон) встречалась у 9/148 (6,1%), умеренная (7 баллов по Глисон) – у 137/148 (92,6%) и низкая (8-10 баллов по Глисон) – у 2/148 (1,3%) больных.

У всех больных гистологический тип опухоли ПЖ был представлен аденокарциномой.

Всем пациентам в сыворотке крови исходно и каждые 3 месяца после РПЭ определяли содержание ПСА путем иммуноферментного анализа на фотометре «Multiscan-P 2» (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). Основанием для заключения о биохимическом рецидиве (БР) были: превышение концентрации ПСА в крови более 0,2 нг/мл в трех последовательных измерениях, проведенных с интервалом 2 и более недель.

При выполнении генетических исследований на первом этапе пробоподготовки первую порцию мочи пациентов в объеме 70 мл собирали в контейнер после массажа ПЖ путем трехкратного нажатия на каждую долю. Непосредственно после сбора для получения образца мочевого осадка 20 мл мочи центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин. Далее супернатант удаляли, а оставшийся осадок ресуспендировали и отбирали 1,5 мл в пробирку «эппендорф». Осадок мочи консервировали, добавляя 1 мл «Среды РНК» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). При выделении экзосом 50 мл мочи из полученной постмассажной порции центрифугировали в течение 15 минут при 10 000 об/мин. Полученный супернатант центрифугировали в течение 3 часов при 100 000 об/мин. Осадок промывали добавлением 3 мл буферного раствора PBS (phosphatebuffered saline), осаждали кратковременным центрифугированием. Далее экзосомы ресуспендировали в буфере PBS в объеме 200 мкл.

Выделение тотальной РНК из мочи осуществляли сорбентным методом набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» («НекстБио», Россия) по шаговой инструкции производителя. Образцы обрабатывали ДНКазой (6 ед. активности) для удаления примеси геномной ДНК в течение 40 мин при комнатной температуре в соответствующем буфере (реагенты Applied Biosystems, США).

При обратной транскрипции использовали набор «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit» (Applied Biosystems, США). При получении кДНК на РНК-матрице использовали метод отжига случайных олигонуклеотидов при расходе 40,0 мкл набора и пошаговых этапах по инструкции производителя.

Экспрессию гена *PCА3* в осадке и экзосомах мочи определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При этом сравнивали величины пороговых циклов *Ct* изучаемого и референсного гена. В качестве референсного гена рассматривали ген калликрейна человека *KLK3*, для которого характерна простатспецифичная экспрессия. Реакционная смесь содержала 1,0 мкл образца кДНК из осадка мочи или экзосом мочи, 8,0 мкл деионизированной воды, 1,0 мкл готовой смеси праймеров и TaqMan-зонда, 10,0 мкл концентрированного буферного раствора с полимеразой согласно протоколу производителя. Температурные параметры: начальная денатурация 95 °С в течение 10 мин, затем 47 циклов при 95 °С в течение 15 с, 60 °С – 1 мин (детекция).

При ПЦР-РВ использовали готовые праймеры *KLK3* (assay ID Hs02576345_m1, Applied Biosystems, FAM), *PCА3* (assay ID Hs01371939_g1, Applied Biosystems, FAM), а также TaqMan-зонды с красителями и малобороздочные лиганды MGB (minor groove binders, MGB). Образец мочи исследовали, если экспрессию *KLK3* обнаруживали при значении порогового цикла *Ct* до 45 циклов. В каждом образце ген амплифицировали трехкратно и рассчитывали усредненное значение порогового цикла *Ct*.

Для проведения ПЦР реального времени использовали термоциклер Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США), специализированное программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1). Для выражения экспрессии гена *PCА3* вычисляли показатель $\Delta Ct = Ct(PCА3) - Ct(KLK3)$.

Статистическую обработку результатов проводили при использовании программы Statistica 12 (StatSoft, США), модуля описательной статистики, частотного анализа, таблиц кросстабуляции. Рассчитывали медиану, 25 и 75 процентиля. Различия количественных показателей между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$. Различия долей оценивали с помощью критерия χ^2 . В работе использовали ROC-анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

Рецидив РПЖ может возникать через несколько месяцев либо несколько лет после консервативного либо радикального лечения, включая оперативное. Различают местный, системный либо биохимический рецидив, проявляющийся только повышением ПСА в сыворотке крови. Среди обследованных нами пациентов клинической группы в течение двух лет после РПЭ биохимический рецидив был выявлен у 30/148 (20,3%). По литературным данным, частота БР в течение пяти лет после РПЭ у больных РПЖ составляет 15–30% [4]. Таким образом, доля больных с прогрессированием заболевания в нашем исследовании имеет сходные параметры с ранее проведенными эпидемиологическими данными.

Ретроспективно с учетом двухгодичных сведений о рецидивировании заболевания были проанализированы дооперационные результаты генетических исследований с учетом развития БР (табл. 1).

Таблица 1

Содержание простатспецифического антигена в сыворотке крови и экспрессия гена *PCA3* в осадке и экзосомах мочи у больных основной группы и группы сравнения в зависимости от рецидивирования заболевания

Показатель	По всей группе (<i>n</i> =148)	БР есть (<i>n</i> =30)	БР нет (<i>n</i> =118)	<i>p</i> *
ПСА в сыворотке крови, нг/мл. Ме [25%;75%]	12,8 [9,2; 17,1]	14,2 [9,9; 18,8]	12,0 [8,8; 16,7]	0,19
ΔCt <i>PCA3</i> – <i>KLK3</i> в осадке мочи. Ме [25%;75%]	-0,35 [-0,54; 0,75]	-0,44 [-0,56; 0,57]	0,06 [-0,55; 0,90]	0,75
ΔCt <i>PCA3</i> – <i>KLK3</i> в экзосомах мочи. Ме [25%;75%]	-2,01 [-2,42; 0,87]	-2,37 [-3,49; 0,55]	-0,95 [-1,93; 0,98]	0,04

Примечание: *p** - доверительная вероятность различия между подгруппами с наличием и отсутствием БР.

У пациентов с РПЖ вне зависимости от развития БР медиана и межквартильный диапазон величины ПСА в сыворотке крови перед операцией практически не различались (*p*=0,19) (табл. 1).

Значения медианы и межквартильного диапазона ΔCt гена *PCA3* по сравнению с референсным геном *KLK3* в осадке мочи были близки в двух изучаемых подгруппах в зависимости от течения заболевания и статистически значимо не различались (*p*=0,75) (табл. 1). Отрицательное среднее значение ΔCt изучаемого гена по отношению к референсному гену свидетельствовало о более высоком уровне экспрессии первого гена по сравнению со вторым.

Между тем в экзосомах мочи у пациентов с неблагоприятным течением заболевания установлен более высокий уровень мРНК гена *PCA3* по сравнению с подгруппой больных без рецидивирования (*p*=0,04). Медиана ΔCt *PCA3*–*KLK3* в экзосомах мочи при биохимическом рецидивировании составила исходно -2,37, а в группе с благоприятным течением болезни -0,95 (табл. 1). Меньшее значение ΔCt свидетельствовало о более высоком уровне мРНК анализируемого гена *PCA3* по сравнению с референсным геном *KLK3* в экзосомах мочи.

Повышенная экспрессия гена *PCAZ* в экзосомах мочи была сопряжена с развитием БР в последующем. Для более детального изучения сопряжения между указанными процессами был предпринят частотный анализ и метод кросстабуляции (табл. 2).

Таблица 2

Число больных РПЖ с различным уровнем экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах мочи с учетом наличия или отсутствия БР

Показатель и его диапазон	По всей группе (<i>n</i> =148)	БР есть (<i>n</i> =30)	БР нет (<i>n</i> =118)	<i>p</i> *
<i>ΔCt PCA3–KLK3</i> в осадке мочи:				
>3,3	5 (3%)	0	5 (4%)	0,008
[1,86-3,3]	65 (44%)	5 (17%)	60 (51%)	
<1,86	78 (53%)	25 (83%)	53 (45%)	
<i>ΔCt PCA3–KLK3</i> в экзосомах мочи:				
>1,48	6 (4%)	1 (3%)	5 (4%)	0,77
≤1,48	142 (96%)	29 (97%)	113 (96%)	

Примечания: *p** - доверительная вероятность по критерию χ^2 при множественном сравнении.

В результате было установлено, что снижение *ΔCt PCA3–KLK3* в осадке мочи ниже 1,86 (дифференциальной точки разделения для РПЖ по сравнению с доброкачественной гиперплазией ПЖ по Аполихину О.И. с соавт. [8]) встречалось чаще (83% против 45%, *p*=0,008). Следовательно, сравнительная оценка экспрессии гена *PCAZ* в осадке мочи информативна для оценки риска рецидивирования опухолевого заболевания.

Поскольку уровень *ΔCt PCA3–KLK3* в экзосомах мочи, равный 1,48, был предложен в работе Аполихина О.И. с соавт. [8] для формирования заключения о риске развития РПЖ при дифференциальном анализе с доброкачественными процессами, то нами был использован ROC-анализ для дальнейшего поиска уровня порогового цикла *Ct* для выделения больных с высоким риском рецидивирования заболевания. С помощью ROC-анализа нами был определен разделительный уровень для значения *ΔCt PCA3 – KLK3* ≤ -2,9. То есть, если у пациентов с аденокарциномой ПЖ *ΔCtPCA3–KLK3* в экзосомах мочи был ниже значения -2,9 включительно, то с диагностической чувствительностью 90% и диагностической специфичностью 86% можно говорить о высоком риске БР в ближайшие 24 месяца после РПЭ. Доля ложноотрицательных случаев составила 10%, а ложноположительных – 14%. Общая диагностическая эффективность оценки экспрессии

гена *PCAZ* в экзосомах мочи для прогноза раннего БР после РПЭ соответствовала 87%. Площадь под *ROC*-кривой составила $0,896 \pm 0,0007$ ($p < 0,0001$), что свидетельствовало о высокой информативности метода.

Для осадка мочи разделительный уровень порогового цикла *Ct* для выделения больных с высоким риском рецидивирования заболевания составил -0,51. То есть, если у пациентов с аденокарциномой ПЖ *ΔCtPCAZ–KLK3* в осадке мочи был ниже значения -0,51 включительно, то с диагностической чувствительностью 87% и диагностической специфичностью 85% можно говорить о высоком риске БР в ближайшие 24 месяца после РПЭ. Доля ложноотрицательных случаев составила 13%, а ложноположительных – 15%. Общая диагностическая эффективность оценки экспрессии гена *PCAZ* в осадке мочи для прогноза раннего БР после РПЭ соответствовала 85%. Площадь под *ROC*-кривой составила $0,802 \pm 0,0004$ ($p < 0,0001$), что свидетельствовало о высокой информативности метода.

Выявление рецидивирования РПЖ при динамической лабораторной оценке содержания ПСА в сыворотке крови является распространенной клинической практикой. Однако оценка уровня ПСА только в сыворотке крови в 1,7-67% случаев приводит к гипердиагностике прогрессирования РПЖ [4]. Несмотря на разработанную тактику и дополнительные стратегии оценки мониторинга ПСА в сыворотке крови после операции у больных РПЖ, включая учет возраста, скорости прироста и сроков удвоения уровня ПСА, изоформ маркера, «плотности» ПСА [2], для повышения эффективности прогноза прогрессирования заболевания после хирургического лечения изучают широкий спектр биохимических и молекулярно-генетических маркеров в различных биологических жидкостях и тканях. Полученные нами результаты изучения экспрессии гена *PCAZ* согласуются с данными других авторов, которые анализировали экспрессию гена *PCAZ* наряду с другими генами с простатспецифичной экспрессией в цельной моче, осадке мочи и экзосомах мочи [5; 8]. Авторы подчеркивали информативность исследования указанных биологических жидкостей при дифференциальной диагностике между злокачественными и доброкачественными опухолями в ПЖ. В работах Аполихина О.И. с соавт. [6] в качестве перспективного теста для диагностики РПЖ была предложена оценка экспрессии *PCAZ* в осадке мочи и экзосомах. Применение методики позволило улучшить раннее выявление РПЖ, сократить «ненужные» биопсии органа. В продолжение разработки неинвазивной мониторинговой системы наблюдения за больными РПЖ нами была проведена оценка экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах мочи у больных РПЖ с развитием БР и без рецидивирования заболевания в начале наблюдения за пациентами до операции. Такой подход позволил оценить прогностическую значимость оценки экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах мочи для определения риска раннего рецидивирования заболевания еще на этапах подготовки к

операции. В работе были установлены уровни экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах мочи, при превышении которых можно говорить о риске раннего прогрессирования болезни.

Итак, в нашей работе было выявлено, что оценка экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах мочи информативна, но с определенными ограничениями, для прогноза развития БР в ближайшие 2 года после РПЭ.

Выводы

1. Прогностическая значимость оценки экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах постмассажной мочи для определения риска БР после РПЭ у больных с локализованным РПЖ выше по сравнению с определением ПСА в сыворотке крови.

2. При повышении экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах постмассажной мочи у больных с локализованным РПЖ риск БР в течение двух лет после РПЭ возрастает. Диагностическая эффективность оценки риска прогрессирования локализованного РПЖ по уровню экспрессии гена *PCAZ*, определенному методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в осадке мочи составляет 85%, а в экзосомах мочи 87%.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / ред. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2017. – 236 с.
2. Клиническая значимость ПСА-ассоциированных тестов в диагностике и стадировании рака предстательной железы / Н.С. Сергеева [и др.] // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2018. – № 1. – С. 55-67.
3. Российская тест-система *PCAZ*: первые результаты / А.В. Сидоренков [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – № 2. – С. 36-43.
4. Louie K.S., Seigneurin A., Cathcart P., Sasieni P. Do prostate cancer risk models improve the predictive accuracy of PSA screening? A meta-analysis // Ann Oncol., 2015, vol. 26, no. 5, pp. 848-864.
5. Сравнение экспрессии гена *PCAZ* в осадках и экзосомах мочи при раке предстательной железы / Д.С. Михайленко [и др.] // Онкоурология. – 2017. – Т. 13. – № 3. – С. 54-60.
6. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // Nat Cell Biol., 2007, no. 9, pp. 654–659.
7. Молекулярный канцерогенез / ред. М.А. Красильников, И.Б. Зборовская. – М.: ООО ИД «АБВ-пресс», 2016. – 418 с.

8. *PCAZ* и *TMPRSS2:ERG* в диагностике рака предстательной железы: первый опыт применения комбинации маркеров в России / О.И. Аполихин [и др.] // Экспериментальная клиническая урология. – 2015. – № 2. – С. 30-35.