

Бова Ф.С., Кит О.И., Максимов А.Ю.

## Диагностическая информативность определения экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи у больных раком предстательной железы (оригинальное исследование)

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Bova Ph.S., Kit O.I., Maksimov A.Ju.

### Diagnostic informativeness of determination of PCA3 gene expression in urine sediment and exosomes in patients with prostate cancer

#### Резюме

На 148 больных раком предстательной железы (РПЖ) с клинической стадией T1c–T2cN0M0 была проведена оценка диагностической и прогностической значимости уровня экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи. Всем больным была выполнена радикальная простатэктомия (РПЭ). В течение двух лет после РПЭ у больных каждые три месяца контролировалось наличие или отсутствие биохимического рецидива (БР). Установлено, что уровень экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи у больных РПЖ при последующем биохимическом рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания был достоверно ниже ( $p=0,01$ ), а связь с концентрацией ПСА в крови, экспрессией в опухолевой ткани операционных биоптатов транскрипционных факторов и гомеобоксных белков теснее. Сделано заключение, что оценка экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи информативна для прогноза развития БР в ближайшие 2 года после РПЭ.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, биохимический рецидив, ген PCA3, экзосомы, прогноз

#### Summary

The diagnostic and prognostic significance of the PCA3 gene expression in urine sediment and exosomes was evaluated in 148 patients with prostate cancer (PC) with a clinical stage T1c–T2cN0M0. Radical prostatectomy (RPE) was performed in all patients. For two years after RPE in patients every three months, the presence or absence of biochemical relapse (BR) was monitored. It was established that the expression level of the PCA3 gene in urine exosomes in prostate cancer patients with subsequent biochemical recurrence was significantly lower compared to the favorable course of the disease ( $p=0,01$ ), and the association with PSA concentration in the blood and expression of transcription factors in the tumor tissue of operating biopsies and homeobox proteins closer. It was concluded that the assessment of the expression of the PCA3 gene in urine exosomes is informative for predicting the development of BR in the next 2 years after RPE.

**Key words:** prostate cancer, biochemical production, PCA3 gene, exosomes, prognosis

#### Введение

Анализ экспрессии генов является перспективным методом исследования ткани опухоли, полученной при биопсии либо при оперативном лечении. При раке предстательной железы (РПЖ) определение уровня экспрессии простатспецифических генов активно проводится уже более десяти лет [1]. Оценка экспрессии генов в ткани опухоли дублируется исследованием других биологических жидкостей и клеточных элементов – сыворотки крови, мононуклеарной фракции крови, цельной мочи, ее осадка, экзосом мочи [2]. Ген PCA3 относится к некодирующим РНК [3], его гиперэкспрессия характерна для злокачественной ткани предстательной железы (ПДЖ). При этом, если диагностические возможности определения экспрессии

гена PCA3 в моче и экзосомах при дифференциальной диагностике злокачественного и доброкачественного процесса в ПДЖ определены [4], то влияние на последующее течение заболевания до настоящего момента не исследовалось.

Целью работы явилось оценить диагностическую и прогностическую значимость определения экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи у больных с локализованным раком предстательной железы при определении риска биохимического рецидива (БР) после радикальной простатэктомии (РПЭ).

#### Материал и методы

В исследование включены 148 больных РПЖ. Работа выполнена в Центре урологии, нефрологии и гемо-

диализа, патологоанатомическом отделении ГБУ Ростовской области «Областная больница №2» в 2015-2019 гг. Исследование было одобрено Локальным независимым этическим комитетом ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения больных в исследование: 1. локализованный РПДЖ (T1c-T2c); 2. отсутствие отдаленных метастазов.

Возраст больных общей клинической группы колебался от 54 до 79 лет, составив в среднем  $65,6 \pm 2,5$  лет. Распределение больных в зависимости от клинической стадии РПДЖ было следующим: cT1c – 9/148 (6,1%), cT2a – 20/148 (13,5%), cT2b – 43/148 (29%), cT2c – 76/148 (51,4%). Высокая степень гистопатологической дифференцировки ( $\leq 6$  баллов по Глиссону) встречалась у 9/148 (6,1%), умеренная (7 баллов по Глиссону) – у 137/148 (92,6%) и низкая (8-10 баллов по Глиссону) – у 2/148 (1,3%) больных.

У всех больных гистологический тип опухоли ПДЖ был представлен аденокарциномой.

Всем пациентам в сыворотке крови исходно и каждые 3 месяца после РПЭ определяли содержание простатспецифического антигена (ПСА) путем иммуноферментного анализа на фотометре «Multiscan-P 2» (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). Основанием для заключения о 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 перед операцией первую порцию мочи пациентов в объеме 70 мл собирали в контейнер после пальцевого трехкратного нажатия на каждую долю ПДЖ («постмассажная» моча). 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), пробирку закрывали и заворачивали в герметизирующую лабораторную пленку.

При выделении экзосом 50 мл мочи из полученной постмассажной порции центрифугировали в течение 15 минут при 10000 об/мин. Полученный супернатант центрифугировали в течение 3 часов при 100000 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 расхождении 40,0 мкл набора и пошаговых этапах по инструкции производителя.

Экспрессию гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При этом сравнивали величины пороговых циклов C<sub>t</sub> изучаемого и референсного гена. В качестве референсного гена рассматривали ген KLK3, для которого характерна простат-специфичная 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°C в течение 10 мин, затем 47 циклов при 95°C в течение 15 с, 60°C – 1 мин (детекция).

При ПЦР-РВ использовали готовые праймеры KLK3 (assay ID Hs02576345\_m1, Applied Biosystems, FAM), PCA3 (assay ID Hs01371939\_g1, Applied Biosystems, FAM), а также TaqMan-зонды с красителями и малобродочные лиганды MGB (minor groove binders, MGB). Образец мочи исследовали, если экспрессию KLK3 обнаруживали при значении порогового цикла C<sub>t</sub> до 45 циклов. В каждом образце ген амплифицировали трехкратно и рассчитывали усредненное значение порогового цикла C<sub>t</sub>.

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 PCA3 вычисляли показатель  $\Delta C_t = C_t(\text{PCA3}) - C_t(\text{KLK3})$ .

В операционных биоптатах после радикальной простатэктомии (РПЭ) иммуногистохимически (ИГХ) оценивали уровень экспрессии факторов Ki-67, AMACR, p53, HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A, BCL2, NFKB1, NKX3-1.

Статистическую обработку результатов проводили при использовании программы Statistica 12 (StatSoft, США), модуля описательной статистики, частотного анализа, корреляционного анализа по Спирмену. Рассчитывали медиану, 25 и 75 перцентили. Различия количественных показателей между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Различия долей оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ .

## Результаты и обсуждение

Среди пациентов группы сравнения в течение двух лет после РПЭ биохимический рецидив был выявлен у 30/148 (20,3%). Ретроспективно с учетом двухгодичных сведений о рецидивировании заболевания были проанализированы дооперационные результаты биохимических и генетических исследований (табл. 1).

Средние значения содержания ПСА в сыворотке крови, а также экспрессия гена PCA3 до операции у паци-

Таблица 1. Содержание простат-специфического антигена в сыворотке крови и экспрессия гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи у больных РПЖ в зависимости от рецидивирования заболевания

Показатель	БР есть (n=30)	БР нет (n=118)	p
ПСА в сыворотке крови, нг/мл (Ме [25%;75%])	14,4 [9,9; 17,2]	12,1 [9,1; 16,0]	0,53
$\Delta Ct$ PCA3-KLK3 в осадке мочи, (Ме [25%;75%])	-0,43 [-0,61; 0,24]	0,01 [-0,15; 0,68]	0,22
$\Delta Ct$ PCA3-KLK3 в экзосомах мочи, (Ме [25%;75%])	-2,45 [-2,76; 1,38]	-0,95 [-1,14; 1,53]	0,01

Таблица 2. Показатели корреляционного анализа тесноты связи между уровнем экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи и клиническими, биохимическими, генетическими показателями

Показатель	Корреляция с уровнем экспрессии гена PCA3 в осадке мочи		Корреляция с уровнем экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи	
	R	p	R	p
ПСА крови	0,37	0,07	0,48	0,04
Баллы по шкале Глисона	0,21	0,85	0,19	0,89
Экспрессия Ki-67	0,27	0,68	0,37	0,08
Экспрессия AMACR	0,44	0,04	0,50	0,02
Экспрессия p53	-0,11	0,74	-0,16	0,82
Экспрессия HIF-1 $\alpha$	0,68	0,0001	0,74	0,0001
Экспрессия VEGFA	0,59	0,003	0,65	0,002
Экспрессия bcl2	0,17	0,99	0,17	0,99
Экспрессия NFKB1	0,28	0,38	0,28	0,38
Экспрессия NKX3-1	-0,52	0,01	-0,52	0,01

Примечание: жирным шрифтом отмечены статистически значимые коэффициенты корреляции

ентов в зависимости от наличия или отсутствия БР в следующие 2 года не различались ( $p > 0,05$ ). Исключение составили результаты сравнительного анализа экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи. Так, уровень экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи у больных при последующем рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания был достоверно ниже ( $p = 0,01$ ).

Экзосомы как объект для генетических исследований ввиду наличия в их составе мРНК и их участия в межклеточных информационных связях между клетками начали использоваться в последние десятилетия [5]. Опухолевые клетки продуцируют больше экзосом, чем неопухолевые. Доказано участие экзосом в формировании метастатических ниш, ремоделировании опухолевого микроокружения [6]. Опухолевые клетки «подготавливают» метастатическую зону через дистанционную передачу информации, в том числе посредством экзосом. До попадания раковой клетки такая ниша считается метастатической, а после попадания в такую среду опухолевые клетки начинают активно делиться.

На следующем этапе была изучена связь между выраженностью экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи и концентрацией ПСА в сыворотке крови, баллами по шкале Глисона как интегральным клиническим признаком, экспрессией простатспецифических белков, антиапоптотических, транскрипционных, включая гипоксия-зависимых, проангиогенных факторов (табл. 2).

В результате корреляционного анализа была установлена наиболее выраженная статистически значимая

прямая связь между уровнем экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи и тканевой экспрессией гипоксия-зависимого транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ , проангиогенным фактором VEGFA. Следовательно, гипоксия-зависимая стимуляция транскрипционных процессов в опухолевой ткани может быть ведущим патогенетическим звеном регуляции содержания онкомаркера в биологических жидкостях.

В последнее время было доказано, что гипоксия приводит к значительному повышению концентрации экзосом в биологических средах. По сравнению с нормоксией при снижении парциального напряжения кислорода концентрация экзосом возрастает двукратно [7]. Путем применения химической стабилизации HIF-1 $\alpha$  в ткани авторы доказали прямое влияние HIF-1 $\alpha$  на продукцию везикул при гипоксии [7]. Поскольку экзосомы можно рассматривать как средство межклеточной коммуникации, то повышение их числа может облегчить межклеточные способы передачи информации. Вслед за изменением числа экзосом, при гипоксии может измениться и их состав. Показано, что в «гипоксических» экзосомах опухолевых клеток накапливается ряд специфических молекул, которые способствуют образованию новых сосудов в опухоли и снижению экспрессии молекул межклеточной адгезии [8]. Поскольку экспрессия гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи усилилась одновременно, то, очевидно, повышение концентрации онкомаркера PCA3 может происходить как за счет повышения числа экзосом, так и за счет изменения их содержимого.

Между изучаемым онкомаркером и андрогенно-регулируемым гомеобоксным белком НКХ3-1, участвующим в защите от последствий окислительного стресса, была выявлена отрицательная статистически значимая корреляционная связь. Кроме того, установлена прямая достоверная корреляционная связь между экспрессией онкомаркера PCA3 и альфа-метилацил-КоА-рацемазой (AMACR), усиливающей клеточные свободнорадикальные процессы. Данное обстоятельство еще раз подтверждает патогенную роль гипоксия-зависимого пути регуляции транскрипционных процессов, несостоятельности путей защиты от окислительного стресса для развития и прогрессии РПДЖ, повышения экспрессии онкомаркеров.

Последствием изменения числа и содержимого экзосом, клеток осадка мочи, проявляющееся повышенном концентрации онкомаркера PCA3, явилось усиление неопластического (прямая достоверная корреляционная связь с VEGFA) вследствие переноса большого объема информационных молекул.

Итак, с целью совершенствования неинвазивной мониторинговой системы наблюдения за больными РПДЖ нами была проведена оценка экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи у пациентов с развитием БР и без рецидивирования заболевания в начале наблюдения. Такой подход позволил оценить прогностическую значимость оценки экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи для определения риска раннего рецидивирования заболевания еще на этапах подготовки к операции. В работе были установлены уровни экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи, при превышении которых можно говорить о риске раннего прогрессирования болезни. При повышении экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах постмассажной мочи у больных с локализованным РПДЖ риск БР в течение двух лет после РПЭ возрастал. Диагностическая эффективность оценки риска прогрессирования

локализованного РПДЖ по уровню экспрессии гена PCA3, определенному методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в осадке мочи составляла 88%, а в экзосомах мочи 79,5%. То есть, оценка экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи, информативна для прогноза развития БР в ближайшие 2 года после РПЭ.

## Выводы

1. Для неинвазивной мониторинговой системы наблюдения за больными РПДЖ рекомендуется оценка экспрессии гена PCA3 в осадке и экзосомах мочи.

2. Уровень экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи у больных РПДЖ при последующем биохимическом рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания был достоверно ниже ( $p=0,01$ ), а связь с концентрацией ПСА в крови, экспрессией в опухолевой ткани операционных биоптатов транскрипционных факторов и гомеобоксных белков прямая и выраженная.

3. Оценка экспрессии гена PCA3 в экзосомах мочи информативна для прогноза развития БР в ближайшие 2 года после РПЭ.■

*Кит О.И. – доктор медицинских наук, профессор, Директор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону. Бова Ф.С. – к.м.н., Руководитель центра урологии, нефрологии и гемодиализа ГБУ РО «Областная больница №2», Ростов-на-Дону. Максимов А.Ю. – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научным перспективным разработкам ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России. Автор, ответственный за переписку – Бова Филипп Сергеевич, г.Ростов-на-Дону, Россия, 344112, г. Ростов-на-Дону, 1-й Конной Армии ул. 33 Тел. +7(863)-254-98-90. E-mail: alald@inbox.ru*

## Литература:

1. Талкач Ю.В., Рева С.А., Носов А.К. и соавт. Клиническая значимость генетической характеристики рака предстательной железы: обзор литературы. *Онкоурология*. 2015; 2: 99-106.
2. Аполихин О.И., Сивков А.В., Ефремов Г. Д. и соавт. PCA3 и TMPRSS2:ERG в диагностике рака предстательной железы: первый опыт применения комбинации маркеров в России. *Экспериментальная клиническая урология*. 2015; 2: 30-5.
3. Михайленко Д.С., Новиков А.А., Григорьева М.В. и соавт. Сравнение экспрессии гена PCA3 в осадках и экзосомах мочи при раке предстательной железы. *Онкоурология*. 2017; 13(3): 54-60. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2017-13-3-54-60>
4. Cui Y., Cao W., Li Q. et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016; 6: 25776. <https://doi.org/10.1038/srep25776>
5. Zhou X., Wen W., Shan X. et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. *Oncotarget*. 2017; 8: 6513–25.
6. Guo W., Gao Y., Li N. et al. Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncology Reports*. 2017; 38(2): 665-75.
7. Aga M., Bentz G.L., Raffa S. et al. Exosomal HIF1 $\alpha$  supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene*. 2014. 33: 4613-22.
8. Shao C., Yang F., Miao S. et al. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Molecular Cancer*. 2018; 17:120. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0869-y>