

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PCA3* В МОЧЕ У БОЛЬНЫХ ЛОКАЛИЗОВАННЫМ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ЗОНЫ

© Ф.С. Бова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону; ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2», Ростов-на-Дону

Для цитирования: Бова Ф.С. Прогностическая значимость оценки экспрессии гена *PCA3* в моче у больных локализованным раком предстательной железы и гистоморфологическими изменениями перитуморальной зоны // Урологические ведомости. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 11–19. doi: 10.17816/uroved8311-19

Дата поступления: 02.08.2018

Статья принята к печати: 14.09.2018

☉ **Цель** — определить прогностическую значимость оценки экспрессии гена *PCA3* в осадке и экзосомах мочи у больных с локализованным раком предстательной железы (РПЖ) и сочетанными гистоморфологическими изменениями в перитуморальной зоне при определении риска биохимического рецидива после радикальной простатэктомии (РПЭ). **Материалы и методы.** Обследованы 148 больных локализованным РПЖ. У 96 (65 %) пациентов основной группы в перитуморальной зоне предстательной железы имела место простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени (ПИН-2). У 52 (35 %) пациентов группы сравнения гистопатологические процессы в перитуморальной зоне отсутствовали. В осадке и экзосомах мочи у пациентов двух групп методом ПЦР в реальном времени определяли экспрессию гена *PCA3* относительно референсного гена *KLK3*. **Результаты.** Уровень экспрессии гена *PCA3* в экзосомах мочи у больных при одновременном сочетании РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне был выше при последующем рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания. Для определения риска рецидивирования опухолевого заболевания при сопутствующих изменениях перитуморальной зоны эффективна также оценка экспрессии гена *PCA3* в осадке мочи, но в ограниченном диапазоне. При снижении в осадке мочи ΔCt *PCA3-KLK3* менее 1,86 включительно биохимический рецидив у пациентов с РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне развивался чаще (84 % против 51 %, $p = 0,013$). **Заключение.** Прогностическая значимость оценки экспрессии гена *PCA3* в осадке и экзосомах мочи для определения риска биохимического рецидива после РПЭ повышается у больных с локализованным РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне.

☉ **Ключевые слова:** рак предстательной железы; биохимический рецидив; перитуморальная зона; простатическая интраэпителиальная неоплазия; простатспецифический антиген 3; моча.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE EVALUATION OF EXPRESSION OF THE GENE *PCA3* IN URINE IN PATIENTS WITH LOCALIZED PROSTATE CANCER AND HISTOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE PERITUMORAL ZONE

© Ph.S. Bova

Rostov Research Oncological Institute of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia; Regional Hospital No 2, Rostov-on-Don, Russia

For citation: Bova PhS. Prognostic significance of the evaluation of expression of the gene *PCA3* in urine in patients with localized prostate cancer and histomorphological changes in the peritumoral zone. *Urologicheskie vedomosti*. 2018;8(3):11-19. doi: 10.17816/uroved8311-19

Received: 02.08.2018

Accepted: 14.09.2018

Aim. To determine the prognostic significance *PCA3* gene expression in urine sediment and exosomes in patients with localized prostate cancer (PC) and associated histologic changes in the peritumoral zone as a predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy (RPE). **Materials and methods.** Of 148 patients with localized PC, 96 (65%) had high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN-2) in the peritumoral zone. The other 52 (35%) had no pathologic tissue of the peritumoral zone. *PDA3* expression in urine sediment and exosomes was determined with real-time PCR with respect

to the reference gene *KLK3*. **Results.** The *PCA3* gene expression level in urine exosomes in patients with PIN-2 in the prostatic peritumoral zone and synchronous pancreatic adenocarcinoma was higher among patients with subsequent disease recurrence. Increased *PCA3* gene expression in the urine sediment was also predictive of the risk of recurrence of a prostatic tumor with PIN-2 in the peritumoral zone, although to a lesser degree than the results with urine exosomes. When the ΔCt *PCA3-KLK3* was $\geq 1,86$ in the urine sediment, biochemical recurrence of PC and PIN-2 developed more frequently in the peritumoral zone (84% versus 51%, $p = 0,013$). **Conclusions.** Increased *PCA3* gene expression in urine sediment and exosomes is a predictor of increased risk of biochemical recurrence after RPE in patients with localized PC and PIN-2 in the peritumoral zone.

⊗ **Keywords:** prostate cancer; biochemical relapse; peritumoral zone; prostatic intraepithelial neoplasia; prostate-specific antigen 3; urine.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ экспрессии генов представляет собой перспективный метод исследования ткани опухоли, полученной при биопсии либо при оперативном лечении. При раке предстательной железы (РПЖ) уровень экспрессии простатспецифических генов определяют уже более десяти лет [1]. Основная цель состоит в выявлении генетических сигнатур для диагностики злокачественного процесса и дальнейшего прогнозирования клинического течения заболевания (индолентное или агрессивное), выраженности метастатического и летального потенциала опухоли, склонности к рецидивированию [2, 3]. Внедрение генетических исследований ткани опухоли предстательной железы (ПЖ) в клиническую практику сдерживается рядом обстоятельств, среди которых можно выделить мультифокальность, межочаговую гетерогенность опухолей, гистоморфологические изменения перитуморальной зоны [4]. В связи с этим оценка экспрессии генов в ткани опухоли сопровождается во многих работах исследованием других биологических жидкостей и клеточных элементов — сыворотки крови, мононуклеарной фракции крови, цельной мочи, ее осадка, экзосом мочи [4–6]. Таким образом, актуальным и практически значимым представляется определение информативных методов неинвазивной диагностики, позволяющих дать характеристику основного заболевания с учетом микроокружения опухоли и состояния перитуморальной зоны. Одним из таких молекулярно-генетических маркеров РПЖ является оценка уровня экспрессии гена *PCA3* относительно референсного гена с простатспецифической экспрессией — *KLK3* [6]. При этом если диагностические возможности определения экспрессии гена *PCA3* в моче и экзосомах при дифференциальной диагностике злокачественного и доброкачественного процесса в ПЖ известны [4],

то влияние на последующее течение заболевания до настоящего момента не исследовалось.

Целью работы было определение прогностической значимости оценки экспрессии гена *PCA3* в осадке и экзосомах мочи у больных с локализованным РПЖ и сочетанными гистоморфологическими изменениями в перитуморальной зоне при определении риска биохимического рецидива (БР) после радикальной простатэктомии (РПЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в Центре урологии, нефрологии и гемодиализа, патологоанатомическом отделении ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2» в 2015–2017 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 были следующими: 1) локализованный РПЖ ($T_{1c}-T_{2c}$) как по клинической, так и по патоморфологической стадии по результатам гистологического исследования биопсийных и операционных биоптатов; 2) наличие гистологического исследования образцов опухоли и перитуморальной зоны; 3) отсутствие отдаленных метастазов. Критерием исключения явилось наличие экстракапсулярной инвазии опухоли по результатам гистологического исследования хирургических образцов ткани ПЖ.

Гистологические исследования в операционных биоптатах проведены у 148 больных с локализованным РПЖ ($T_{1c}-T_{2c}N_0M_0$). 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} — 15/148 (10,1 %),

cT_{2a} — 20/148 (23 %), cT_{2b} — 43/148 (29 %), cT_{2c} — 76/148 (51,4 %). Высокая степень гистопатологической дифференцировки (≤ 6 баллов по Глисону) встречалась у 12/148 (8,1 %), умеренная (7 баллов по Глисону) — у 134/148 (90,5 %) и низкая (8–10 баллов по Глисону) — у 2/148 (1,4 %) больных.

У всех больных гистологический тип опухоли ПЖ был представлен аденокарциномой. У 96/148 (64,9 %) больных основной группы помимо аденокарциномы ПЖ в перитуморальной зоне имели место изменения, соответствующие диагнозу простатической интраэпителиальной неоплазии высокой степени (ПИН-2). У 52/148 (35,1 %) пациентов группы сравнения гистопатологические процессы перитуморальной зоны отсутствовали.

Всем больным РПЭ выполняли открытым способом. Полученный хирургом биопсийный материал после РПЭ помещали в 4 % стабилизированный буфером раствор формалина и сразу отправляли в патологоанатомическое отделение, где хранили не более 24 часов. Для морфологического исследования патологоанатом формировал образцы опухолевой ткани (не менее 3 кусочков), перитуморальной зоны (2 см от опухоли и более из обеих долей железы) отсечением конусовидных кусочков размером 1,0 × 0,5 см. Далее полученные кусочки поперечно нарезали на 15–20 пластинок толщиной 0,3 мм. При микроскопическом исследовании отмечали гистологический тип опухоли, степень гистопатологической дифференцировки.

Для гистологического исследования при световой микроскопии кусочки тканей железы фиксировали в 10 % растворе формалина, стабилизированном буфером по Лилли при pH 7,4, затем заливали в парафин по обычной методике. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали по стандартной схеме, затем окрашивали гематоксилином и эозином. Образцы исследовали в световом микроскопе TOPIC-T SETI (Нидерланды).

Всем пациентам в сыворотке крови исходно и каждые 3 месяца после РПЭ определяли содержание ПСА путем иммуноферментного анализа на фотометре Multiscan-P2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). Конечной точкой наблюдения было выявление БР. Основанием для заключения о БР служило превышение концентрации ПСА в крови более 0,2 нг/мл в трех последовательных измерениях, проведенных с интервалом 2 и более недель.

На первом этапе первую порцию мочи пациентов в объеме 70 мл собирали в контейнер после

трехкратного нажатия на каждую долю ПЖ. Далее полученную порцию мочи делили на две: одну порцию в объеме 20 мл помещали в пробирку для получения мочевого осадка и оставшиеся 50 мл мочи использовали для выделения экзосом.

Для получения образца мочевого осадка 20 мл мочи центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин. Далее надосадочную жидкость 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 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 (phosphate-buffered saline), осаждали кратковременным центрифугированием. Далее экзосомы ресуспендировали в буфере PBS в объеме 200 мкл.

Тотальную РНК из мочи выделяли сорбентным методом при помощи набора «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 применяли метод отжига случайных олигонуклеотидов при расходовании 40,0 мкл набора и в соответствии с пошаговой инструкцией производителя.

Экспрессию гена *PCAZ* 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 калликреина 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 концентрированно-го 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), *PCA3* (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-РВ 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 $\Delta Ct = Ct(PCA3) - Ct(KLK3)$.

Статистическую обработку результатов осуществляли при использовании программы Statistica 12 (StatSoft, США), модуля описательной статистики, частотного анализа, таблиц кросстабуляции. Рассчитывали медиану, 25-й и 75-й процентиля.

Различия количественных показателей между группами оценивали с помощью критерия Манна – Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$. Различия долей определяли с помощью критерия χ^2 . В работе использовали ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходные клинические и послеоперационные характеристики больных основной и контрольной групп представлены в табл. 1.

В исследование были отобраны пациенты, у которых по результатам гистологического исследования операционных биоптатов клиническая и патоморфологическая стадии РПЖ совпадали. В результате были исключены случаи экстракапсулярного распространения опухоли у отдельных пациентов по результатам послеоперационного обследования, поскольку инвазия злокачественного новообразования является ключевым фактором риска рецидивирования заболевания. Распределение больных основной и контрольной групп в зависимости от клинической и патоморфологической стадии, дифференцировки по шкале Глисона по результатам исследования операционных биоптатов не имело различий ($p > 0,05$), что позволило изучить влияние наличия ПИН-2 в перитуморальной зоне на послеоперационное те-

Таблица 1

Исходные клинические и послеоперационные характеристики больных основной и контрольной групп

Table 1

Baseline clinical and postoperative characteristics of patients with localized prostate cancer

Показатель	Основная группа (РПЖ + ПИН-2) (n = 96)	Контрольная группа РПЖ (n = 52)	p
Возраст	64,5 ± 2,7	66,1 ± 2,3	>0,05
Клиническая стадия, абс. (%):			
cT _{1c}	10 (10,4 %)	5 (9,6 %)	>0,05
cT _{2a}	9 (9,4 %)	5 (9,6 %)	>0,05
cT _{2b}	26 (27,1 %)	17 (32,7 %)	>0,05
cT _{2c}	51 (53,1 %)	25 (48,1 %)	>0,05
Патоморфологическая стадия (операционные биоптаты), абс. (%):			
pT _{2a}	9 (9,4 %)	5 (9,6 %)	>0,05
pT _{2b}	26 (27,1 %)	17 (32,7 %)	>0,05
pT _{2c}	51 (53,1 %)	25 (48,1 %)	>0,05
РПЖ обнаружен при игольной биопсии	10 (10,4 %)	5 (9,6 %)	>0,05
Дифференцировка по шкале Глисона (операционные биоптаты), абс. (%):			
• высокая (≤6 баллов)	8 (8,4 %)	4 (7,7 %)	>0,05
• умеренная (7 баллов)	87 (90,6 %)	47 (90,4 %)	>0,05
• низкая (8–10 баллов)	1 (1,0 %)	1 (1,9 %)	>0,05
ПСА в сыворотке крови до операции, нг/мл (M ± m)	12,1 ± 1,3	12,5 ± 1,6	>0,05
ПСА крови на момент выявления БР, нг/мл (M ± m)	3,4 ± 0,5	2,0 ± 0,3	<0,05

Примечание. РПЖ — рак предстательной железы; ПИН-2 — простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени; ПСА — простатспецифический антиген; БР — биохимический рецидив.

чение болезни без учета основных общепризнанных факторов риска прогрессирования.

Среди пациентов группы сравнения в течение двух лет после РПЭ биохимический рецидив был выявлен у 5/52 (10 %), а в основной группе при сочетании РПЖ + ПИН-2 — у 25/96 (26 %). Следовательно, у пациентов основной группы в отличие от группы сравнения БР встречался чаще ($p = 0,03$).

В основной группе и группе сравнения перед операцией медиана и межквартильный диапазон величины простатспецифического антигена в сыворотке крови практически не различались ($p = 0,96$) (табл. 2).

Значения медианы и межквартильного диапазона ΔCt гена *PCSA3* по сравнению с референсным геном *KLK3* в осадке мочи были близки в двух изучаемых группах и статистически значимо не различались ($p = 0,89$) (см. табл. 2). Отрицательное среднее значение ΔCt изучаемого гена по отношению к референсному гену свидетельствовало о более высоком уровне экспрессии первого гена по сравнению со вторым. В основной группе и группе срав-

нения уровень экспрессии гена *PCSA3* в осадке мочи не различался ($p = 0,89$).

Между тем в экзосомах мочи в основной группе установлен более высокий уровень мРНК гена *PCSA3* по сравнению с группой сравнения ($p = 0,04$). Медиана ΔCt *PCSA3-KLK3* в экзосомах мочи в основной группе составила $-2,57$, а в группе сравнения $-1,13$ (см. табл. 2). Меньшее значение ΔCt свидетельствовало о более высоком уровне мРНК анализируемого гена *PCSA3* по сравнению с референсным геном *KLK3* в экзосомах мочи.

Ретроспективно с учетом двухгодичных сведений о рецидивировании заболевания были проанализированы дооперационные результаты генетических исследований (табл. 3).

Средние значения содержания ПСА в сыворотке крови, а также экспрессия гена *PCSA3* до операции у пациентов основной группы и группы сравнения в зависимости от наличия или отсутствия БР в последующие 2 года не различались ($p > 0,05$). У пациентов группы сравнения экспрессия гена *PCSA3* в экзосомах мочи с учетом рецидива также

Таблица 2

Содержание простатспецифического антигена в сыворотке крови и экспрессия гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи у больных основной группы и группы сравнения

Table 2

Serum prostate-specific antigen and *PCSA3* expression levels in urine sediment and exosomes

Показатель	Группа сравнения (РПЖ) ($n = 52$)		Основная группа (РПЖ + ПИН-2) ($n = 96$)		p
	Me	[25 %; 75 %]	Me	[25 %; 75 %]	
ПСА в сыворотке крови, нг/мл	12,6	[9,3; 17,8]	12,0	[8,5; 18,6]	0,96
ΔCt <i>PCSA3-KLK3</i> в осадке мочи	-0,02	[-0,27; 0,79]	-0,49	[-0,35; 0,86]	0,89
ΔCt <i>PCSA3-KLK3</i> в экзосомах мочи	-1,13	[-1,96; 1,58]	-2,57	[-3,02; 0,12]	0,04

Примечание. РПЖ — рак предстательной железы; ПИН-2 — простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени; ПСА — простатспецифический антиген.

Таблица 3

Содержание простатспецифического антигена в сыворотке крови и экспрессия гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи у больных раком предстательной железы основной группы и группы сравнения в зависимости от рецидивирования заболевания

Table 3

Serum prostate-specific antigen and *PCSA3* expression levels in urine sediment and exosomes in patients with prostate cancer according to recurrence

Показатель	Группа сравнения (РПЖ) ($n = 52$)			Основная группа (РПЖ + ПИН-2) ($n = 96$)		
	БР есть ($n = 5$)	БР нет ($n = 47$)	p	БР есть ($n = 25$)	БР нет ($n = 71$)	p
ПСА в сыворотке крови, нг/мл Me [25 %; 75 %]	13,1 [9,7; 18,3]	12,2 [9,0; 16,2]	0,64	15,8 [10,6; 19,1]	11,2 [8,3; 17,5]	0,37
ΔCt <i>PCSA3-KLK3</i> в осадке мочи Me [25 %; 75 %]	-0,21 [-0,36; 0,55]	0,03 [-0,22; 0,94]	0,58	-0,68 [-0,92; 0,63]	-0,15 [-0,31; 0,88]	0,41
ΔCt <i>PCSA3-KLK3</i> в экзосомах мочи Me [25 %; 75 %]	-1,24 [-1,53; 1,42]	-0,86 [-0,91; 1,63]	0,32	-3,17 [-4,13; 0,04]	-1,14 [-2,08; 0,36]	0,02

Примечание. РПЖ — рак предстательной железы; ПИН-2 — простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени; ПСА — простатспецифический антиген; БР — биохимический рецидив.

не имела различий ($p = 0,32$). Исключение составили результаты сравнительного анализа экспрессии гена *PCSA3* в экзосомах мочи только у пациентов основной группы. Так, уровень экспрессии гена *PCSA3* в экзосомах мочи у больных при одновременном сочетании аденокарциномы ПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне был выше (медиана ΔCt *PCSA3-KLK3* $-3,17$ против $-1,14$, $p = 0,02$) при последующем рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания.

Экспрессия гена *PCSA3* в экзосомах мочи у пациентов с РПЖ с прогрессирующим течением заболевания была повышена при скопрометированности перитуморальной зоны. Наличие в перитуморальной зоне ПИН-2, повышенная экспрессия гена *PCSA3* в экзосомах мочи были сопряжены с развитием БР в последующем. Для более детального изучения сопряжения между указанными процессами был предпринят частотный анализ и метод кросстабуляции (табл. 4).

В результате было установлено, что у пациентов при одновременном наличии аденокарциномы и ПИН-2 в перитуморальной зоне снижение ΔCt *PCSA3-KLK3* в осадке мочи ниже 1,86 (дифференциальной точки разделения для РПЖ по сравнению с доброкачественной гиперплазией ПЖ по О.И. Аполихину и др. [6]) встречалось чаще (40 % против 59 %, $p = 0,04$). Следовательно, сравнительная оценка экспрессии гена *PCSA3* в осадке

мочи информативна для оценки риска рецидивирования опухолевого заболевания при сопутствующих изменениях перитуморальной зоны при снижении ΔCt *PCSA3-KLK3* менее 1,86.

Результаты частотного анализа содержания ПСА в сыворотке крови и уровней экспрессии генов *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи с учетом рецидивирования заболевания представлены в табл. 5.

Анализ результатов табл. 5 показал, что у больных основной группы с изменениями перитуморальной зоны наличие БР после операции было сопряжено с повышением экспрессии гена *PCSA3* в осадке мочи ($p = 0,013$).

Далее нами был использован ROC-анализ для дальнейшего поиска уровня порогового цикла Ct в экзосомах мочи и выделения больных с высоким риском рецидивирования заболевания при наличии ПИН-2 в перитуморальной зоне. С помощью ROC-анализа был определен разделительный уровень для значения ΔCt *PCSA3-KLK3* $\leq -2,6$. То есть если у пациентов с аденокарциномой ПЖ и наличием ПИН-2 в перитуморальной зоне ΔCt *PCSA3-KLK3* в экзосомах мочи был ниже значения $-2,6$ включительно, то с диагностической чувствительностью 88 % и диагностической специфичностью 86 % можно говорить о высоком риске БР в ближайшие 24 месяца после РПЭ. Доля ложноотрицательных случаев составила 12 %, а ложноположительных — 14 %. Общая диагностическая эффективность оцен-

Таблица 4

Число пациентов основной группы и группы сравнения в зависимости от содержания простатспецифического антигена в сыворотке крови и экспрессия гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи у больных раком предстательной железы

Table 4

Number of patients in the study group and control group according to the level of serum prostate-specific antigen and *PCSA3* expression in urine sediment and exosomes in patients with prostate cancer

Показатель	Группа сравнения (РПЖ) ($n = 52$) абс. (%)	Основная группа (РПЖ + ПИН-2) ($n = 96$) абс. (%)	p^*	p^{**}
ПСА в сыворотке крови, нг/мл:				
<10	2 (4 %)	1 (1 %)	0,59	0,07
10–20	49 (94 %)	84 (88 %)	0,31	
>20	1 (2 %)	11 (11 %)	0,087	
ΔCt <i>PCSA3-KLK3</i> в осадке мочи:				
>3,3	3 (6 %)	2 (2 %)	0,48	0,065
[1,86–3,3]	28 (54 %)	37 (39 %)	0,10	
< 1,86	21 (40 %)	57 (59 %)	0,04	
ΔCt <i>PCSA3-KLK3</i> в экзосомах мочи:				
>1,48	2 (4 %)	4 (4 %)	0,73	0,73
$\leq 1,48$	50 (96 %)	92 (96 %)	0,73	

Примечание. p^* — доверительная вероятность по критерию χ^2 при попарном сравнении; p^{**} — доверительная вероятность по критерию χ^2 при множественном сравнении; РПЖ — рак предстательной железы; ПИН-2 — простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени.

Таблица 5

Число пациентов основной группы и группы сравнения в зависимости от содержания простатспецифического антигена в сыворотке крови и экспрессия гена *PCA3* в осадке и экзосомах мочи у больных раком предстательной железы с учетом рецидивирования заболевания

Table 5

Recurrence-specific number of patients in the study group and control group according to the level of serum prostate-specific antigen and *PCA3* expression in urine sediment and exosomes in patients with prostate cancer

Показатель	Группа сравнения (РПЖ) (n = 52) абс. (%)			Основная группа (РПЖ + ПИН-2) (n = 96) абс. (%)		
	БР есть (n = 5)	БР нет (n = 47)	p*	БР есть (n = 25)	БР нет (n = 71)	p*
ПСА в сыворотке крови, нг/мл: <10 10–20 >20	0 5 (100 %) 0	2 (4 %) 44 (94 %) 1 (2 %)	0,84	0 19 (76 %) 6 (24 %)	1 (1 %) 65 (91,5 %) 5 (8,5 %)	0,064
ΔCt <i>PCA3-KLK3</i> в осадке мочи: >3,3 [1,86–3,3] <1,86	0 1 (20 %) 4 (80 %)	3 (6 %) 27 (58 %) 17 (36 %)	0,16	0 4 (16 %) 21 (84 %)	2 (3 %) 33 (46 %) 36 (51 %)	0,013
ΔCt <i>PCA3-KLK3</i> в экзосомах мочи: >1,48 ≤1,48	0 5 (100 %)	2 (4 %) 45 (96 %)	0,45	1 (4 %) 24 (96 %)	3 (4 %) 68 (96 %)	0,59 0,59

Примечание. p* — доверительная вероятность по критерию χ^2 при множественном сравнении; РПЖ — рак предстательной железы; ПИН-2 — простатическая интраэпителиальная неоплазия высокой степени; БР — биохимический рецидив.

ки экспрессии гена *PCA3* в экзосомах мочи для прогноза раннего БР после РПЭ соответствовала 86 %. Площадь под ROC-кривой составила $0,812 \pm 0,0003$ ($p < 0,0001$), что свидетельствовало о высокой информативности метода.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании было установлено, что у пациентов основной группы при сочетании аденокарциномы ПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне по сравнению с группой сравнения БР встречался чаще (26 % против 10 %). В ранних работах других авторов при гистологическом исследовании операционных биоптатов ПЖ у пациентов с верифицированным РПЖ указывалось на сочетание аденокарциномы и ПИН в 40–73 % случаев [7]. В работах З.А. Юрмазова и др. (2010) отмечено более агрессивное течение онкологического заболевания при одновременном сочетании РПЖ + ПИН: исходно установлен более высокий уровень ПСА в крови, мультифокальность опухоли, чаще встречались перинеуральная инвазия и низкая степень дифференцировки опухоли, плотность рецепторов HER2/neu на мембранах злокачественных клеток была выше [8].

В клинической практике рецидивирование РПЖ отслеживают при помощи динамичной лабораторной оценки содержания ПСА в сыворотке крови.

Однако определение уровня ПСА только в сыворотке крови в 1,7–67 % случаев приводит к гипердиагностике прогрессирования РПЖ [9]. Несмотря на разработанную тактику и дополнительные стратегии оценки мониторинга ПСА в сыворотке крови после операции у больных РПЖ с учетом возраста, скорости прироста и сроков удвоения уровня ПСА, изоформ маркера, «плотности» ПСА [9, 10] для повышения эффективности прогноза прогрессирования заболевания после хирургического лечения изучают широкий спектр биохимических и молекулярно-генетических маркеров в различных биологических жидкостях и тканях. В работах О.И. Аполихина и др. [6] в качестве перспективного теста для диагностики РПЖ была предложена оценка экспрессии *PCA3* в осадке мочи и экзосомах. Экзосомы как объект для генетических исследований ввиду наличия в их составе мРНК и их участия в межкоммуникативных информационных связях между клетками начали использовать с 2007 г. [11]. Опухолевые клетки продуцируют больше экзосом, чем неопухолевые. Доказано участие экзосом в формировании преметастатических ниш, ремоделировании опухолевого микроокружения [12]. Опухолевые клетки «подготавливают» преметастатическую зону через дистанционную передачу информации, в том числе посредством экзосом. До попадания раковой клетки такая ниша считает-

ся премеаастатической, а после попадания в такую микросреду опухолевые клетки начинают активно делиться. 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 *PCSA3* 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 показателя экспрессии гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи для определения риска раннего рецидивирования заболевания еще на этапах подготовки к операции.

Поскольку уровень ΔCt *PCSA3-KLK3* в экзосомах мочи, равный 1,48, был предложен в работе О.И. Аполихина и др. [6] с целью прогнозирования риска развития РПЖ при дифференциальном анализе с доброкачественными процессами, то нами был использован ROC-анализ для дальнейшего поиска уровня порогового цикла *Ct* и выделения больных с высоким риском рецидивирования заболевания при наличии ПИН-2 в перитуморальной зоне.

В результате было установлено, что уровень экспрессии гена *PCSA3* в экзосомах мочи у больных при одновременном сочетании аденокарциномы ПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне был выше при последующем рецидивировании по сравнению с благоприятным течением заболевания. Таким образом, наличие в перитуморальной зоне ПИН-2, повышенная экспрессия гена *PCSA3* в экзосомах мочи были сопряжены с развитием БР. При этом если у пациентов с аденокарциномой ПЖ и наличием ПИН-2 в перитуморальной зоне ΔCt *PCSA3-KLK3* в экзосомах мочи был ниже значения $-2,6$ включительно, то с диагностической чувствительностью 88 % и диагностической специфичностью 86 % можно говорить о высоком риске БР в ближайшие 24 месяца после РПЭ.

Для определения риска рецидивирования опухолевого заболевания при сопутствующих изменениях перитуморальной зоны эффективна также оценка экспрессии гена *PCSA3* в осадке мочи, но в ограниченном диапазоне. Так, при снижении в осадке мочи ΔCt *PCSA3-KLK3* менее 1,86 включительно БР у пациентов с РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне развивались чаще (84 % против 51 %, $p = 0,013$).

Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, которые анализировали экспрессию гена *PCSA3* наряду с другими генами с простатспецифичной экспрессией в цельной моче, осадке мочи и экзосомах мочи [6, 13]. Авторы подчеркивали информативность исследования указанных биологических жидкостей при дифференциальной диагностике между злокачественными и доброкачественными опухолями в ПЖ.

В нашей работе было установлено, что оценка экспрессии гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи информативна, но имеет определенные ограничения для прогноза развития БР в ближайшие 2 года после РПЭ.

Полученные нами данные имеют клиническую и практическую значимость, поскольку способствуют выделению групп повышенного риска биохимического рецидивирования у пациентов с локализованным РПЖ после РПЭ по итогам исходной неинвазивной оценки экспрессии гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи и гистологическом исследовании операционных образцов ткани ПЖ в перитуморальной зоне. Доказательства информативности оценки экспрессии белкового онкомаркера в осадке и экзосомах мочи до операции, а также гистологического исследования перитуморальной зоны ПЖ после операции для анализа риска раннего рецидивирования РПЖ и выделения пациентов для более тщательного послеоперационного мониторинга скорректировали имеющиеся знания о способах оценки прогрессирования заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Прогностическая значимость оценки экспрессии гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи для определения риска БР после РПЭ повышается у больных с локализованным РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне.
2. При повышении экспрессии гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи у больных с локализованным РПЖ и ПИН-2 в перитуморальной зоне риск БР в течение двух лет после РПЭ возрастает.

Финансирование исследования. Исследование не имело источников финансирования.

Конфликт интересов. У автора нет конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Толкач Ю.В., Рева С.А., Носов А.К., и др. Клиническая значимость генетической характеристики рака предстательной

- железы: обзор литературы // Онкоурология. – 2015. – № 2. – С. 99–106. [Tolkach YuV, Reva SA, Nosov AK, et al. Clinical Significance of Genetic Characterization of Prostate Cancer: A Review of Literature. *Onkourologiya*. 2015;(2):99-106. (In Russ.)]. doi: 10.17650/1726-9776-2015-11-2-99-106.
2. Сергеева Н.С., Скачкова Т.Е., Маршутина Н.В., и др. Клиническая значимость ПСА-ассоциированных тестов в диагностике и стадировании рака предстательной железы // Онкология. – 2018. – № 1. – С. 55–67. [Sergeeva NS, Skachkova TE, Marshutina NV, et al. Clinical significance of PSA-associated tests in the diagnosis and staging of prostate cancer. *Onkologija*. 2018;(1):55-67. (In Russ.)]. doi: 10.17116/onkolog20187155-67.
 3. Шкурников М.Ю., Алексеев Б.Я. Ассоциация экспрессии генов рецепторов фактора роста тромбоцитов альфа и бета (*PDGFRA* и *PDGFRB*) с биохимическим рецидивом рака предстательной железы после радикальной простатэктомии // Онкоурология. – 2017. – Т. 13. – № 4. – С. 45–50. [Shkurnikov MYu, Alekseev BYa. Association of gene expression of platelet-alpha-beta-beta receptor (*PDGFRA* and *PDGFRB*) receptors with biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *Onkourologiya*. 2017;13(4):45-50. (In Russ.)]. doi: 10.17650/1726-9776-2017-13-4-45-50.
 4. Михайленко Д.С., Новиков А.А., Григорьева М.В., и др. Сравнение экспрессии гена *PCA3* в осадках и экзосомах мочи при раке предстательной железы // Онкоурология. – 2017. – Т. 13. – № 3. – С. 54–60. [Mihajlenko DS, Novikov AA, Grigor'eva MV, et al. Comparison of the expression of the *PCA3* gene in precipitates and urine exosomes in prostate cancer. *Onkourologiya*. 2017;13(3):54-60. (In Russ.)]. doi: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-54-60.
 5. Коган М.И., Чибичян М.Б., Водолажский Д.И. Изменение экспрессии генетических локусов в мононуклеарной фракции периферической крови больных раком предстательной железы // Клиническая онкология. – 2012. – № 5. – С. 59–60. [Kogan MI, Chibichjan MB, Vodolazhskij DI. Change in the expression of genetic loci in the mononuclear fraction of peripheral blood of patients with prostate cancer. *Klinicheskaja onkologija*. 2012;(5):59-60. (In Russ.)]
 6. Аполихин О.И., Сивков А.В., Ефремов Г.Д., и др. *PCA3* и *TMPRSS2: ERG* в диагностике рака предстательной железы: первый опыт применения комбинации маркеров в России // Экспериментальная клиническая урология. – 2015. – № 2. – С. 30–35. [Apolikhin OI, Sivkov AV, Efremov GD, et al. The first Russian experience of using *PCA3* and *TMPRSS2-ERG* for prostate cancer diagnosis. *Experimental'naya klinicheskaya urologiya*. 2015;(2):30-5. (In Russ.)]
 7. Mc Neal JE. Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer*. 1969;23:24-34.
 8. Юрмазов З.А., Васильев Н.В. Клинические и морфологические особенности рака предстательной железы в сочетании с ПИН // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Приложение № 1. – С. 118. [Jurmazov ZA, Vasil'ev NV. Clinical and morphological features of prostate cancer in combination with PIN. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*. 2010;(Suppl. 1):118. (In Russ.)]
 9. Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;65(6):1046-1055. doi: 10.1016/j.eururo.2013.12.062.
 10. Adhyam M, Gupta AK. A review on the clinical utility of PSA in cancer prostate. *Indian J Surg Oncol*. 2012;3(2):120-129. doi: 10.1007/s13193-012-0142-6.
 11. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654-659. doi: 10.1038/ncb1596.
 12. Молекулярный канцерогенез / Под ред. М.А. Красильникова, И.Б. Зборовской. – М.: АБВ-пресс, 2016. – 418 с. [Molecular carcinogenesis. Ed by M.A. Krasil'nikov, I.B. Zborovskaya. Moscow: ABV-press; 2016. 418 p. (In Russ.)]
 13. Louie KS, Seigneurin A, Cathcart P, Sasieni P. Do prostate cancer risk models improve the predictive accuracy of PSA screening? A meta-analysis. *Ann Oncol*. 2015;26(5):848-64. doi: 10.1093/annonc/mdu525.

Сведения об авторе:

Филипп Сергеевич Бова — канд. мед. наук, докторант, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону; руководитель центра урологии, нефрологии и гемодиализа, ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2», Ростов-на-Дону. E-mail: alald@inbox.ru.

Information about the author:

Philip S. Bova — Candidate of Medical Sciences, Doctorant, Rostov State Scientific Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia; Head, Center of Urology, Nephrology and Hemodialysis of the Rostov Region State Regional Hospital "Regional Hospital No 2". Rostov-on-Don, Russia. E-mail: alald@inbox.ru.