

Российская тест-система PCA3: первые результаты

Russian PCA3 test-system: first results

A. V. Sidorenkov, A. V. Govorov, D. Yu. Pushkar, K. A. Pavlov, A. N. Shkoporov, E. V. Khokhlova, A. A. Korchagina, M. E. Grigoriev, V. P. Chekhonin

Widely used detection of the prostatic specific antigen (PSA) to the growth of the prostate biopsies being performed; introduction of the age-related normal values of PSA led to growth of the number of unjustified biopsies. As a result of this the constant need in the new prostate cancer biomarkers is obvious. PCA3 – is a non-coding mRNA, which is expressed exclusively by the prostate cells. The aim of this work was to develop a diagnostic system for early non-invasive diagnostics of the prostate cancer, based on the quantitative detection of the PCA3-gene mRNA in the urine sediment using the reverse transcription polymerase chain reaction (PCR). As the consequence a laboratory exemplar of the PCR-based test system was created and tested out. The data to the specificity and sensitivity of the new method were received. The ability of the diagnostic system to identify the substantial increase in the proportion of PCA3/KLK3 was shown in the material from the patients with prostate cancer in comparison with healthy individuals. Relatively high sensitivity, specificity and negative predictive value were received for the early non-invasive diagnostics of the prostate cancer.

А.В. Сидоренков¹, А.В. Говоров¹, Д.Ю. Пушкарь¹, К.А. Павлов³, А.Н. Шкопоров², Е.В. Хохлова², А.А. Корчагина², М.Э. Григорьев², В.П. Чехонин³

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова (кафедра урологии)

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова (кафедра медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета)

³Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского (отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии), Москва

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний у мужчин. На сегодняшний день РПЖ занимает второе место среди причин смерти от злокачественных заболеваний у мужчин в Европе и в Северной Америке. В России отмечается неуклонный рост числа больных с впервые установленным диагнозом РПЖ: за последние 10 лет заболеваемость РПЖ на 100 000 населения возросла на 120,5% [1]. В последние годы в результате активного внедрения в клиническую практику определения уровня простатического специфического антигена (ПСА), новых методов диагностики и скрининга РПЖ наблюдается тенденция к успешному лечению и мониторингованию РПЖ. В свою очередь, средний возраст больных с впервые выявленным заболеванием существенно снизился, что повлекло за собой увеличение процента выявления ранних форм РПЖ (Т1-2) [2, 3].

К базовым методам диагностики и скрининга рака предстательной железы относится, прежде всего, пальцевое ректальное исследование (ПРИ), определение в сыворотке крови уровня ПСА, трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) с последующим выполнением биопсии предстательной железы (ПЖ) [4, 5].

С началом «эры ПСА» этот метод зарекомендовал себя как наиболее точный в диагностике, стадировании и осуществления динамического мониторинга РПЖ. Многими исследованиями показано, что у мужчин с уровнем ПСА от 4 до 10 нг/мл РПЖ диагностируется только у каждого четвертого, а частота негативных биопсий составляет 70-80%. Известно также, что ПСА – это не раково-специфический маркер, а всего лишь органоспецифический, и его повышение может быть обусловлено другими заболеваниями ПЖ (доброкачественная гиперплазия предстательной железы, острый или хронический простатит) или различными манипуляциями на ПЖ (ПРИ, массаж, ТРУЗИ, эякуляция, острая задержка мочи, недавно перенесенная биопсия или другая операция на ПЖ и др.) [3, 6].

«Золотым стандартом» диагностики РПЖ в настоящее время является мультифокальная биопсия ПЖ под ультразвуковым контролем. Показаниями к биопсии являются повышенный уровень ПСА, данные ПРИ и обнаружение гипоезогенных зон в ткани ПЖ по данным ТРУЗИ [7]. В 1989 г. Hodge К. разработана и предложена ставшая в дальнейшем общепринятой методика выполнения биопсии ПЖ из 6 точек (так называемая «секстантная» биопсия), которая показала улучшение выявляемости РПЖ [8]. При этом

число ложно-отрицательных биопсий составляло по разным данным от 31,5% до 45%) [7, 9, 10]. Guichard G. et al. сообщили, что частота обнаружения рака при 21-, 18-, 12- и 6-точечной биопсии составляет 42,5%, 41,5%, 38,7% и 31,7% соответственно [11]. Наиболее сложной задачей сегодня является определение показаний для выполнения повторной биопсии ПЖ при первичной «негативной». Оптимальный срок проведения повторной биопсии не установлен. Его определяют на основании результатов патоморфологического исследования первичной биопсии с учетом риска выявления РПЖ (высокий или быстро растущий уровень ПСА, изменения по данным ПРИ, отягощенный семейный анамнез) [12].

С каждым годом появляется все больше новых онкомаркеров, в том числе и биомаркеров РПЖ. Это обусловлено, прежде всего, развитием науки, нанотехнологий, молекулярной биологии и генетики. К наиболее многообещающим и изученным маркерам относятся [-2] proPSA (незрелая форма ПСА или предшественник), PSCA (антиген простатических стволовых клеток), PSP 94 (секретируемый белок предстательной железы 94), ECPA и ECPA-2 (ранние антигены РПЖ), uPA/uPAR (рецепторы активатора плазминогена урокиназы), GSTP1 (глутатион-S-трансфераза P1), TMPRESS2:ERG (химерный белок, образующийся при хромосомной мутации со слиянием генов TMPRESS2 и ERG), PCA3 (специфический антиген рака ПЖ 3) [13].

Одним из наиболее перспективных среди предложенных методов ранней неинвазивной диагностики РПЖ являются тест-системы, основанные на количественном анализе РНК-продукта гена PCA3, гиперэкспрессия которого наблюдается при малигнизации тканей предстательной железы. Ген PCA3 был открыт в конце 1990-х гг. в ходе сравнения транскриптомов нормальных и злокачественных тканей предстательной железы. Дальнейшие

исследования показали, что высокий уровень экспрессии PCA3 строго специфичен для злокачественных опухолей ПЖ и её метастазов, но не для любых нормальных тканей, а также доброкачественных или злокачественных опухолей другого генеза. На основании этих данных было высказано предположение о возможности использования уровня экспрессии гена PCA3 в качестве биомаркера РПЖ [14]. PCA3 был открыт в конце 1990-х годов в ходе совместной работы двух исследовательских групп из Университета Рэдбаунд и госпиталя Джона Хопкинса. Сравнив транскриптомы нормальных и злокачественных тканей предстательной железы с помощью дифференциального дисплея (DD), они обнаружили мРНК, уровень экспрессии которой в раковых клетках ПЖ более чем в 60 раз превышал уровень экспрессии в нормальных клетках предстательной железы. мРНК получила название DD3 (от англ. differential display clone 3), а позже PCA3 (от англ. prostate cancer antigen 3). Marion Bussemakers считается основоположником и первооткрывателем гена DD3 [14]. На сегодняшний день предложено 3 поколения таких систем диагностики, основанных на определении содержания мРНК гена PCA3 в моче или её клеточном осадке. Полученное значение нормируют на число клеток ПЖ в анализируемом образце, определяемое, в свою очередь, по количеству мРНК гена KLK3, кодирующего белок ПСА и экспрессирующегося исключительно в тканях предстательной железы [15, 16]. Существующие системы диагностики РПЖ, основанные на количественном анализе уровня экспрессии PCA3, различаются по типу исследуемого материала и по способу оценки количества мРНК PCA3. В первой предложенной тест-системе суммарную клеточную РНК выделяют из клеточного осадка мочи, собранного центрифугированием. Полученную РНК используют для реакции обратной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Затем количество мРНК гена PCA3 и ПСА определяют методом гибридизации продуктов ОТ-ПЦР на специальных микрочипах. Эта система диагностики была апробирована в Голландии в ходе исследования, в котором приняло участие 108 пациентов. Одновременно с анализом экспрессии PCA3 в данной группе исследованных проводили гистологическое исследование биоптатов ПЖ. Исследование показало, что высокий уровень PCA3 в клеточном осадке мочи коррелирует с высоким риском обнаружения РПЖ результатам биопсии [17]. Метод диагностики рака предстательной железы, разработанный компанией DiagnoCure Inc. (Канада) в 2004 году, основан на определении уровня экспрессии PCA3 и ПСА в клеточном осадке с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). В ходе проведенного мультицентрового исследования 517 пациентов было показано, что выявление высокого уровня PCA3 в моче пациента коррелирует с ростом вероятности обнаружения рака предстательной железы; показана высокая специфичность и чувствительность теста [18, 19].

В ноябре 2003 компания Gen-Probe Inc. (Сан-Диего) получила от DiagnoCure эксклюзивные права на диагностику PCA3 по всему миру. Gen-Probe вскоре разработала количественный анализ PCA3 третьего поколения – Progenesa®. Отличительной чертой данного теста является определение уровня экспрессии гена PCA3 не в клеточном осадке, а непосредственно в первой порции мочи после массажа ПЖ. Все дальнейшие биохимические процессы также проводятся в той же пробирке, куда первоначально собиралась исследуемая моча. В ходе проведенных в 2006-2008 гг. мультицентровых исследований у 1343 пациентов, Deras II. et al., Groskopf J. et al., Haese A. et al. и Marks LS. et al. [20, 21, 22, 23] установили достаточно убедительную корреляцию между гиперэкспрессией PCA3 и РПЖ с чувствительностью теста 57% и специфичностью 74,52%. Эта система диагностики в 2007 г. была также

апробирована в Голландии, в ходе исследования, в котором приняли участие 534 пациента с уровнем ПСА 3-15 нг/мл. Одновременно с определением уровня экспрессии мРНК гена РСА3 проводили гистологическое исследование ткани ПЖ. Исследование показало, что высокий уровень РСА3 в клеточном осадке мочи коррелирует с высоким риском обнаружения РПЖ по результатам биопсии [24].

Достоверно установлено, что уровень РСА3 является предиктором обнаружения злокачественной опухоли ПЖ при первичной, либо повторной биопсии [20, 22]. РСА3 показал способность быть независимым предиктором РПЖ, использование которого возможно в комплексе с другими факторами риска РПЖ (возраст, уровень общего ПСА, данные ПРИ, объем ПЖ, результаты патогистологического заключения и т.д.). Van Gils M.P. et al. в 2008 году высказали предположение, что значение индекса РСА3 может быть ассоциировано с более агрессивным раком. Эта теория предполагает, что клетки агрессивных форм РПЖ изначально более инвазивны и могут легко проходить в просвет канальцев желез, особенно после пальцевого ректального исследования [25]. В некоторых публикациях авторы также описывают корреляцию между уровнем индекса РСА3 и баллами по системе градации Глисона [22], что, в свою очередь, противоречит данным других публикаций, в которых говорится об отсутствии таких закономерностей [25]. Auprich M. et al. описали клиническую ценность РСА3 как предиктора агрессивности РПЖ, что может иметь значение при планировании радикальной простатэктомии. Некоторыми авторами сделаны выводы о корреляции между уровнем РСА3 и объемом опухолевого поражения ПЖ по данным патогистологического исследования после радикальной простатэктомии, прогностической ценности корреляции баллов РСА3 и клинически незначимого РПЖ [22, 26]. Van Poppel H. et al. в 2012 году в

своей публикации описали значительное превышение РСА3 в группе больных со стадией Т3а-Т3б по сравнению с группой больных, перенесших РПЭ, со стадией Т2а-Т2с [27]. Существующие данные различных публикаций о ценности уровня РСА3 в прогнозировании экстракапсулярного распространения опухоли противоречивы [22, 26].

Учитывая тот факт, что РСА3 является важным независимым предиктором результатов биопсии, РСА3 был включен в современные предоперационные номограммы. На сегодня доступно в последних публикациях 5 подобных номограмм, в двух из которых номограммы построены без учета анамнеза предшествующих биопсий ПЖ – это PCPT (Prostate Cancer Prevention Trial) калькулятор риска и графические номограммы, опубликованные в 2009 году Chun F.K. et al. [28]. Wu A.K. et al. в 2012 году в своей номограмме определили показания для повторной биопсии ПЖ для пациентов с одной «негативной» биопсией в анамнезе [29]. Кроме РСА3 в номограмме учитывается уровень общего ПСА, PSAD (плотность ПСА), данные ПРИ и ТРУЗИ. В 2013 г. Hansen J. et al. опубликовали данные своего исследования с построением номограммы для первичной биопсии, которая превосходила клинические модели без РСА3 ($p < 0,001$). Диагностическая точность увеличилась на 4,5-7,1%, что было связано с включением РСА3. Авторы сделали вывод, что данная номограмма позволит избежать до 55% так называемых «ненужных» биопсий предстательной железы [30]. Ruffion A. et al. создали номограмму на основании РСА3 для определения показаний к первичной биопсии ПЖ. У пациентов с индексом РСА3 ≥ 35 отмечался более высокий риск положительных биопсий: 66% против 31% ($p < 0,001$); аналогично, риск был значительно выше при использовании порогового значения индекса РСА3 в 21 балл: 62% против 22% ($p < 0,001$) [31].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать отечественную диагностическую тест-систему РСА3 с низкой затратной стоимостью для ранней неинвазивной диагностики РПЖ, основанной на количественной детекции мРНК гена РСА3 методом обратной транскрипции полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), а также разработать рекомендации по применению и использованию теста РСА3 в клинической практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В клинике урологии МГМСУ имени А.И. Евдокимова в 2012 и 2013 гг. проведён набор биоматериала у 169 пациентов, которые проходили лечение. Из всего собранного материала 49 образцов были исследованы. Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с поставленным диагнозом. Группа с верифицированным РПЖ составила 28 пациентов в возрасте 51–81 года с клинической стадией болезни pT2aN0M0–T3vN1M0. Стадирование выполнялось по результатам патогистологического исследования после радикальной простатэктомии. Группа сравнения включала 13 пациентов с ДГПЖ в возрасте 56–82 лет. В контрольную группу вошли 8 условно здоровых индивидуумов в возрасте 29–54 лет. Помимо определения уровня РСА3 у пациентов с РПЖ и ДГПЖ проводили исследование содержания общего ПСА в сыворотке крови с использованием стандартных методов. После массажа ПЖ производился сбор 20–40 мл первой порции мочи. Исследуемая моча (10 мл) подвергалась центрифугированию с добавлением к клеточному осадку лизирующего буфера. Дизайн ДНК-олигонуклеотидов для применения в качестве праймеров и зондов в реакциях ПЦР проводился с использованием программ «PerlPrimer v. 1.1.19» и «CLC DNA Workbench 6». Уникальность ПЦР-праймеров проверяли посредством поиска их последовательно-

стей в базе данных «GenBank» при помощи алгоритма «BlastN». Выделение тотальной РНК из биоптатов (около 25 мг ткани ПЖ) и осадков мочи (полученных при центрифугировании 10 мл мочи) производили с применением набора «RNeasy mini kit» (Qiagen, Голландия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. ОТ тотальной РНК осуществляли при помощи набора «RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis» (Fermentas, Литва) в соответствии с протоколом изготовителя. В качестве праймеров для ОТ использовали смесь олигонуклеотидов KLK3-R1 и PCA3-R3 в концентрации каждого 1 мкМ. Постановку ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием 2,5X ПЦР-смесей (Синтол, Россия). Для анализа кривых плавления ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймеров под PCA3 и KLK3, применяли реакционную смесь того же производителя с добавлением интеркалирующего красителя EvaGreen. В реакционные смеси объемом 20 мкл добавляли 1 мкл препарата кДНК и смесь 4 праймеров и 2 зондов (PCA3 и KLK3) до финальной концентрации каждого 0,2 мкМ. ПЦР проводили в приборе «С1000» с оптическим модулем «CFX96» (BioRad, США) согласно следующей программе:

- первичная денатурация — 95°C, 5 мин;
- денатурация — 94°C, 15 с;
- отжиг и элонгация — 60°C, 60 с.

Длительность программы составила 45 циклов. Калибровочные кривые для значений порогового цикла Ct строили с использованием серийных 10-кратных разведений ДНК-матриц (кДНК или плазмидных ДНК). Расчеты относительных уровней мРНК осуществляли в программе «Microsoft Excel».

Клонирование полученных ПЦР-продуктов производили с применением вектора рAL-TA (Евроген, Россия) при помощи стандартных методов молекулярного клонирования.

Анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и коэффициента

корреляции R2 в программном пакете «LibreOffice Calc», «Microsoft Excel 2010». Количественные данные представлены в формате: среднее (М) ± стандартная ошибка среднего (m). Построение диаграмм проводили в приложении «SciDAVis».

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе настоящего исследования была разработана тест-система для проведения ОТ-ПЦР-РВ, предназначенная для одновременной детекции в одной пробирке мРНК-продуктов двух генов — PCA3 и KLK3 (ген, кодирующий белок ПСА). Определение относительного уровня экспрессии мРНК гена PCA3 с помощью созданной тест-системы осуществляется путем сравнения значения порогового цикла амплификации PCA3 со значением порогового цикла для мРНК гена KLK3, являющегося конститутивно экспрессирующимся РНК-маркером клеток ПЖ. Таким образом, уровень экспрессии мРНК PCA3 выражается как отношение PCA3/KLK3. Превышение данного параметра над референсными значениями будет указывать на малигнизацию клеток предстательной железы. В качестве мишени для амплификации на матрице кДНК гена PCA3 был выбран участок экзон-экзонного соединения между экзонами 2 и 3. Таким образом, была снижена вероятность амплификации на матрице остаточных количеств геномной ДНК, присутствующей в препаратах РНК и кДНК из ПЖ и мочи. Мишенью для амплификации на матрице гена KLK3 был избран участок соединения экзонов 1 и 2. Данный район присутствует во всех изоформах мРНК, синтезирующихся с гена KLK3 (рис. 1).



Рис.1. Структура генов PCA3 (А) и KLK3 (Б). Примечание. Экзоны обозначены прямоугольниками, интроны — стрелками. Для гена KLK3 приведены 4 альтернативные формы мРНК

Для изучения специфичности и чувствительности тест-системы, состоящей из 2 пар праймеров и 2 Taqman-зондов, комплементарных мРНК генов PCA3 и KLK3 человека, были проведены испытания на 6 модельных образцах биоматериала, представляющих собой биоптаты предстательной железы, полученные от больных с верифицированным диагнозом РПЖ. Образцы комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК), выделенные из перечисленных образцов, были использованы для приготовления серийных 10-кратных разведений в диапазоне 100–10–4 и протестированы с использованием созданной тест-системы. Для определения достоверности количественной детекции и эффективности амплификации целевых фрагментов кДНК построены калибровочные графики зависимости порогового цикла Ct от относительной концентрации кДНК. Было показано, что коэффициент корреляции R2 для генов PCA3 и KLK3 превышает 0,99, а эффективность амплификации во всех случаях близка к 100% (рис. 2).

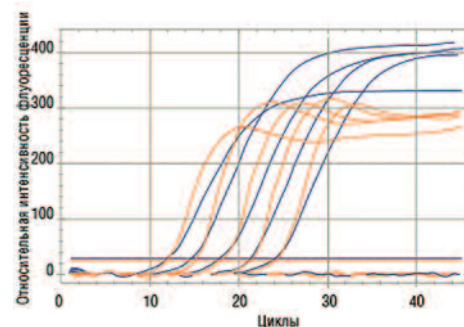


Рис.2. Кривые амплификации, полученные с использованием созданной тест-системы и набора из 5 разведений кДНК из рака ПЖ. Примечание. Синие кривые — KLK3, оранжевые кривые — PCA3

Для изучения специфичности ПЦР-амплификации фрагментов кДНК генов PCA3 и KLK3 выполнили анализ кривых плавления и провели электрофорез полученных ПЦР-продуктов. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3. Как видно, оба ПЦР-продукта (PCA3 и KLK3) представляют собой гомогенные фрагменты ДНК с ожидаемой молекулярной массой и температурой плавления (87,5 и 86 °C), соответствующей

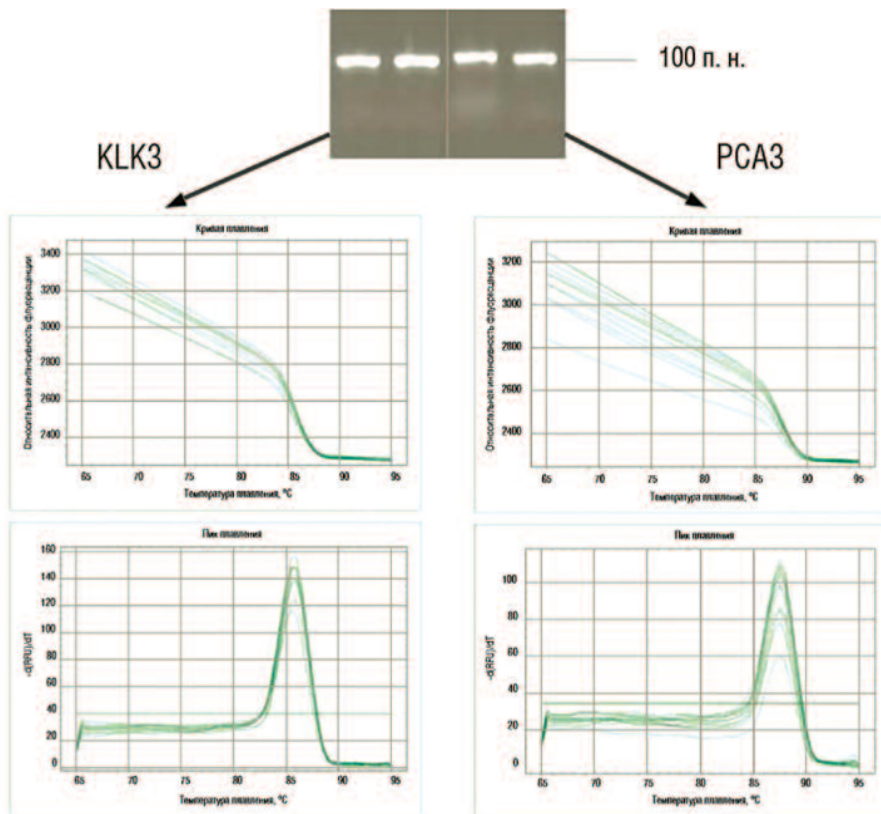


Рис.3. Электрофорез и анализ кривых плавления ПЦР-продуктов генов PCA3 и KLK3, полученных на матрице образца кДНК из биопсии рака ПЖ с использованием разработанной тест-системы. Примечание. П.н. – пар нуклеотидов

расчетной (рассчитана по последовательности фрагментов с использованием программы «PerlPrimer»).

Среднее значение индекса PCA3 у группы пациентов с РПЖ составило $135,55 \pm 31,02$, у пациентов с ДГПЖ — $41,89 \pm 17,72$, а у лиц контрольной группы — $3,17 \pm 3,12$ (табл. 1). Медианы индексов PCA3 были равны 82,3;

20,56 и 0,11 соответственно в 1-й, 2-й и 3-й группах. Средние значения концентрации ПСА в сыворотке, определенные у групп пациентов с РПЖ и ДГПЖ, составили $4,4 \pm 0,53$ и $9,86 \pm 1,3$ нг/мл, соответственно (рис. 4).

При анализе результатов индекса PCA3 различных групп паци-

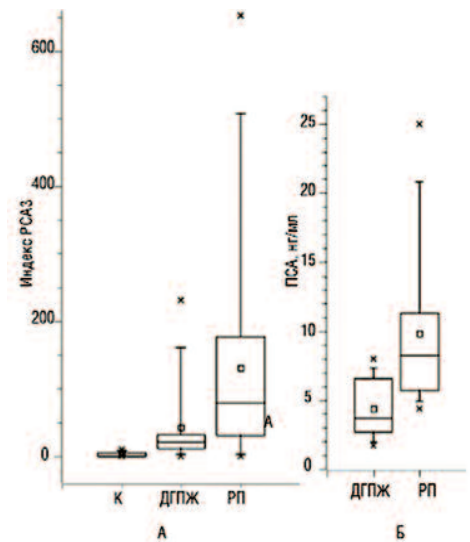


Рис.4. «Ящичковые» диаграммы распределения значений индекса PCA3 (А) и сывороточных концентраций ПСА (Б) в обследуемых группах пациентов. Примечание. К – контрольная группа; ДГПЖ – группа пациентов с ДГПЖ; РП – группа пациентов с раком ПЖ. «Ящички» соответствуют диапазонам значений в 25–75-м центилях, «усы» – в 5–95-м центилях, крестиками отмечены крайние значения. Средние обозначены квадратами, медианы – перекладинами

ентов получена статистически достоверная разница уровня баллов PCA3 между группами РПЖ и ДГПЖ ($p < 0,01$), РПЖ и контрольной группой ($p < 0,0001$). Уверенной статистически достоверной разницы индекса PCA3 между группой ДГПЖ и контрольной группой не получено ($p = 0,059$). Выраженной корреляции между значениями индекса PCA3 и сывороточными концентрациями ПСА также обнаружено не было ($p = 0,18$). Не получено корреляций и между уровнем индекса PCA3 группы РПЖ и баллами гистологического материала по системе градации Глисона ($p = 0,337$), не получено убедительной корреляции между индексом PCA3 и стадией заболевания ($p = 0,0568$), процентом пораженной ткани ПЖ ($p = 0,069$). Исходя из полученных данных, было выбрано пороговое значение индекса PCA3, равное 50. Превышение индекса PCA3 над пороговым значением (диагностическая чувствительность теста) было обнаружено у 75% больных с верифицированным диагнозом РПЖ. В то же время специфичность теста составила 87,5%. Для сравнения, специфичность теста ПСА (с пороговым значением 4 нг/мл) в данной когорте

Таблица 1. Корреляция индекса PCA3 с другими показателями пациентов

Параметры	Группы пациентов		
	РПЖ	ДГПЖ	Условно здоровые
Возраст	51-81	56-82	36-58
Объем ПЖ, см ³	20 - 87 (41,5)	35 - 138 (78)	13- 35 (23)
Общий ПСА, нг/мл	4,41 - 25,0 (10,2)	1,7 - 6,94 (4,5)	0,4 - 2,7 (0,9)
Индекс PCA3	1,62-652,19 (135,72)	0,1-231,87 (41,9)	0,07-13,0 (3,9)
Количество пациентов	28	13	8
Сумма Глисона		Индекс PCA3	
3+3=6	7 пациентов	1,62 – 177,36 (59,15)	
3+4=7	13 пациентов	4,77 – 652,19 (139,12)	
4+3=7	7 пациентов	7,6 – 628,91 (164,89)	
4+4=8	0 пациентов	-----	
4+5=9	0 пациентов	-----	
патоморфоз	1 пациент	282,94	
Стадия после РПЭ			
T2aNOM0	1 пациент	2,86	
T2вNOM0	1 пациент	177,17	
T2cNOM0	13 пациентов	1,62 – 652,19 (131,008)	
T3aNOM0- T3вNOM0	13 пациентов	4,77 – 628,91 (147,021)	

больных оказалась равной лишь 68,75%. Негативная предсказательная ценность теста РСА3 составила 67%. Среди пациентов группы РПЖ и индексом РСА3 ниже порогового значения 5 больных имели очень низкие значения индекса РСА3 (1,52–7,6), а еще двое — значения, приближающиеся к 50 (29,75 и 32,37). В группе больных с ДГПЖ большинство пациентов имели значения индекса РСА3 в интервале от 10 до 40. В то же время в 2 образцах были выявлены высокие значения индекса (114,61 и 231,87), что может быть связано с наличием недиагностированной злокачественной опухоли. Значения индекса РСА3 в группе пациентов, не имеющих РПЖ или ДГПЖ, находились в диапазоне от 0 до 9,4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на существующее многообразие новых неинвазивных методов ранней диагностики РПЖ, определение общего ПСА с %fPSA, ПРИ, ТРУЗИ с последующей трансректальной биопсией ПЖ остаются основными методами в повседневной практике уролога. Рутинное измерение уровня простат-специфического антигена привело к увеличению количества выполняемых биопсий ПЖ. Снижение порога возрастных норм ПСА привело, в свою очередь, к увеличению числа т.н. «ненужных» биопсий (к гипердиагностике клинически незначимого РПЖ). В настоящее время только у 35% пациентов с уровнем общего ПСА 4–10 нг/мл удается при биопсии выявлять РПЖ, а у 20–25% мужчин имеет место «ПСА-негативный» РПЖ. Очевидно, что простат-специфический антиген, как самостоятельный маркер, имеет ограниченные диагностические возможности. В этой связи очевидна необходимость в поиске новых чувствительных, специфичных и неинвазивных методов, позволяющих проводить диагностику РПЖ на ранних стадиях развития заболевания, необходимость в увеличении процента позитивных биоп-

сий и сокращении количества т.н. «ненужных» биопсий, дифференцировке «клинически значимого» от «клинически незначимого» РПЖ, необходимость в сокращении количества пациентов, которым показано активное лечение.

По разным литературным данным, чувствительность тест-систем ПСА достаточно высока – 68,4–94,0%, а специфичность является низкой и составляет не более 44–57,9%. При апробации в 2002 году тест-системы РСА3 первого поколения в Голландии в исследовании приняло участие 108 пациентов, при этом чувствительность теста РСА3 составила 67%, а специфичность – 83%, что позволило сделать вывод о клинической перспективности нового диагностического теста [16]. Schilling D. et al. в 2010 году опубликовали данные своего исследования, в котором при чувствительности тест-системы РСА3 в 90% специфичность составила 36%, негативная предсказательная ценность 83% [32]. Диагностическая чувствительность нашего теста составила предварительно 75%, в то же время специфичность – 87,5%. Негативная предсказательная ценность теста на РСА3 составила 67%.

В настоящее время индекс в 35 баллов является установленным пороговым значением современных тест-систем РСА3 [20, 21, 22, 23]. Haese A. et al. в 2008 году опубликовали результаты большого популяционного исследования, проведенного в Европе на большой когорте больных, перенесших повторную биопсию ПЖ. В этом исследовании в 39% случаев с индексом РСА3 \geq 35 был выявлен РПЖ, по данным гистологического заключения, и только в 22% – с индексом РСА3 $<$ 35 ($p=0,001$) [22]. Galasso F. et al. в 2010 году опубликовали результаты итальянского мультицентрового исследования, в котором у 445 пациентов был выявлено значения индекса РСА3 \geq 35 (48,2%), у 472 пациентов – $<$ 35 (51,58%). Из 443 больных 105 пациентам была выполнена биопсия ПЖ или повторная биопсия ПЖ. Иссле-

дователи обнаружили, что у 27 пациентов (25,71%) РПЖ не выявлен, у 37 (35,24%) выявлен ASAP либо высокий ПИН, а у 41 больного (39,05%) выявлена аденокарцинома ПЖ. Среднее значение индекса РСА3 в группе негативных биопсий составило 54,9 баллов, в группе диагностированного РПЖ – 141,6 баллов, а в группе ASAP и ПИН значение индекса было промежуточным и составило 79,6 баллов. Пороговым значением индекса РСА3 было выбрано (подтверждено) 35 баллов [33].

Вместе с тем, оптимальный пороговый уровень до последнего времени остается дискуссионным. Некоторые публикации свидетельствуют, что пороговое значение 20–25 баллов может быть более предпочтительным, позволяющее улучшить диагностику РПЖ. Ruffion A. et al. и Hansen J. et al. в 2013 году включили в построение своих номограмм индекс РСА3 с пороговым значением 21 и 35 баллов [30, 31].

Выбранный порог в 50 баллов в нашем исследовании предварительный, обусловленный, в первую очередь, небольшим количеством материала и особенностями отечественной тест-системы.

Выводы

Создан образец диагностической тест-системы для ранней неинвазивной диагностики рака предстательной железы, основанной на количественной детекции мРНК гена РСА3 в осадке мочи методом ОТ-ПЦР-РВ. Отработана методика его применения совместно с детектирующим термоциклером «CFX96» (BioRad, США). Установлена высокая аналитическая специфичность и чувствительность разработанного метода по выявлению специфических фрагментов мРНК. Показана возможность использования разработанной тест-системы для обнаружения мРНК гена РСА3 в осадках мочи и способность тест-системы выявлять значительное превышение параметра РСА3/КЛК3 в образцах биоматериала, полученных

от больных РПЖ, по сравнению с образцами от здоровых людей. В ходе проведенных исследований обнаружены достаточно высокие показатели диагностической чувствительности, специфичности и негативной предсказательной ценности для раннего неинвазивного скринингового выявления РПЖ. На основании полученных данных можно сделать вывод о целесообразности выполнения дальнейших лабораторных исследований, направленных на совершенствование тест-системы, уточнение ее аналитических характеристик и диагностической ценности, а также

проведения клинических испытаний полученной тест-системы на расширенном контингенте пациентов.

Применение РСА3 в повседневной практике может способствовать увеличению специфичности диагностики РПЖ и уменьшить количество «ненужных» биопсий ПЖ. Несмотря на значительное число печатных работ, посвященных данной проблеме, их количество продолжает увеличиваться, но четких руководств к действию в этой области пока не существует, и решение по каждому конкретному случаю принимается индивидуально. Не определены оп-

тимальные сроки к определению индекса РСА3 после первичной биопсии ПЖ, оптимальные сроки и показания к определению индекса РСА3 в рамках активного наблюдения группы клинически незначимого РПЖ. Не изучена возможность использования РСА3, вместе с индивидуальными данными обследования пациента, с индексом РН1 или %-2proPSA, а также многие другие нюансы. Необходимо отметить, что существующие в Европе тест-системы РСА3 являются дорогостоящими и в Российской Федерации не представлены. ■

Резюме:

Широкое внедрение в клиническую практику определения содержания простатического специфического антигена (ПСА) привело к увеличению числа биопсий предстательной железы (ПЖ), а снижение порога возрастных норм ПСА — к увеличению числа неоправданных биопсий. В связи с этим возникла необходимость в новых биомаркерах рака предстательной железы (РПЖ).

Цель работы – разработка диагностической тест-системы для ранней неинвазивной диагностики РПЖ, основанной на количественной детекции мРНК гена РСА3 в осадке мочи методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ) в режиме реального времени. В результате был создан лабораторный образец диагностической ПЦР-тест-системы и отработана методика его применения. Показана способность диагностической системы выявлять значительное превышение параметра РСА3/KLK3 в образцах биоматериала, полученных от больных РПЖ, по сравнению с образцами от здоровых индивидуумов. Установлены достаточно высокие показатели диагностической чувствительности, специфичности и негативной предсказательной ценности для ранней неинвазивной диагностики РПЖ. Применение РСА3 в повседневной практике может способствовать увеличению специфичности диагностики РПЖ и уменьшить количество «ненужных» биопсий ПЖ. Однако в настоящее время не определены оптимальные сроки к определению индекса РСА3 после первичной биопсии ПЖ, оптимальные сроки и показания к определению индекса РСА3 в рамках активного наблюдения группы клинически незначимого РПЖ. Не изучена возможность использования РСА3, вместе с индивидуальными данными обследования пациента, с индексом РН1 или %-2proPSA, а также многие другие нюансы.

Работа поддержана грантом Российского Гуманитарного Научного Фонда № 11-06-00532a

Ключевые слова: рак предстательной железы, биомаркер, РСА3, ОТ-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени.

Key words: prostate cancer, biomarker, PCA3, RT-PCR, Real-time PCR.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 г. М., 2012; С. 17-29.
2. Воробьев А.В., Крживицкий П.И. Перспективы профилактики, диагностика и стадирование рака предстательной железы. // Практическая онкология. 2008. Т. 9, N 2. С. 71-82.
3. Лоран О.Б., Пушкарь Д.Ю., Франк Г.А. Простат-специфический антиген и морфологическая характеристика рака предстательной железы: Руководство для врачей. М.: МЕД пресс, 1999.
4. Babaian RJ, Mettlin C, Kane R, Murphy GP, Lee F, Drago JR, Chesley A. The relationship of prostate-specific antigen to digital rectal examination and transrectal ultrasonography: findings of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. // Cancer. 1992. Vol. 69, N 5. P. 1195-1200.
5. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. // J Urol. 1990. Vol. 143, N 6. P. 1146-1152.
6. Лоран О.Б., Пушкарь Д.Ю., Степанов В.П., Крохотина Л.В. Дифференциальная диагностика опухолей предстательной железы с помощью определения уровня простат-специфического антигена сыворотки крови. М., 2000.

ЛИТЕРАТУРА

7. Говоров А.В. Оптимизация трансректальной биопсии простаты в диагностике рака предстательной железы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2002. 17 с.
8. Hodge KK, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. // *J Urol*. 1989. Vol. 142. P. 71-75.
9. Hammerer P, Huland H. Systemic sextant biopsies in 651 patients referred for prostate evaluation. // *J Urol*. 1994. Vol. 151, N 1. P. 99-102.
10. Svetec D, McCabe K, Peretsman S, Klein E, Levin H, Optenberg S, Thompson I. Prostate rebiopsy is a poor surrogate of treatment efficacy in localized prostate cancer. // *J Urol*. 1998. Vol. 159, N 5. P. 1606-1608.
11. Guichard G, Larré S, Gallina A, Lazar A, Faucon H, Chemama S, Allory Y, Patard JJ, Vordos D, Hoznek A, Yiou R, Salomon L, Abbou CC, de la Taille A. Extended 21-sample needle biopsy protocol for diagnosis of prostate cancer in 1000 consecutive patients. // *Eur Urol*. 2007. Vol. 52. P. 430-435.
12. Singh H, Canto EI, Shariat SF, Kadmon D, Miles BJ, Wheeler TM, Slawin K.M. Predictors of prostate cancer after initial negative systematic 12 core biopsy. // *J Urol*. 2004. Vol. 171. P. 1850-1854.
13. Olivier C, Bernard M. Biomarkers of Aggressiveness in Prostate Cancer. // in book "Prostate Cancer - Diagnostic and Therapeutic Advances" [Ed. Dr. Philippe E. Spiess]. 2011. P. 3-20.
14. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. // *Cancer Res*. 1999. Vol. 59, N 23. P. 5975-5979.
15. Bourdumis A, Papatsoris AG, Chrisofos M, Efstathiou E, Skolarikos A, Deliveliotis C. The novel prostate cancer antigen 3 (PCA3) biomarker. // *Int Braz J Urol*. 2010. Vol. 36, N 6. P. 665-668.
16. Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J, Rittenhouse H. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. // *Cancer Lett*. 2011. Vol. 301, N 1. P. 1-6.
17. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. // *Cancer Res*. 2002. Vol. 62, N 9. P. 2695-2698.
18. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, Mâsse B, Piché L, Chypre C. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. // *Urology*. 2004. Vol. 64, N 2. P. 311-315.
19. Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3 PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. // *Eur Urol*. 2004. Vol. 46, N 2. P. 182-186.
20. Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, Ellis WJ, Marks LS, Fradet Y, Rittenhouse H, Groskopf J. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. // *J Urol*. 2008. Vol. 179, N 4. P. 1587-1592.
21. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, Brentano S, Mathis J, Pham J, Meyer T, Cass M, Hodge P, Macairan ML, Marks LS, Rittenhouse H. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. // *Clin Chem*. 2006. Vol. 52, N 6. P. 1089-1095.
22. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, Huland H, Abbou CC, Remzi M, Tinzl M, Feyerabend S, Stillebroer AB, van Gils MP, Schalken JA. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. // *Eur Urol*. 2008. Vol. 54, N 5. P. 1081-1088.
23. Marks LS, Bostwick DG. Prostate Cancer Specificity of PCA3 Gene Testing: Examples from Clinical Practice. // *Rev Urol*. 2008. Vol. 10, N 3. P. 175-181.
24. van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, Jannink SA, Peelen WP, Hanssen SL, Witjes JA, Cornel EB, Karthaus HF, Smits GA, Dijkman GA, Mulders PF, Schalken JA. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. // *Clin Cancer Res*. 2007. Vol. 13, N 3. P. 939-943.
25. van Gils MP, Hessels D, Hulsbergen-van de Kaa CA, Witjes JA, Jansen CF, Mulders PF, Rittenhouse HG, Schalken JA. Detailed analysis of histopathological parameters in radical prostatectomy specimens and PCA3 urine test results. // *Prostate*. 2008. Vol. 68. P. 1215-1222.
26. Auprich M, Chun FK, Ward JF, Pummer K, Babaian R, Augustin H, Luger F, Gutsch S, Budäus L, Fisch M, Huland H, Graefen M, Haese A. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. // *Eur Urol*. 2011. Vol. 59. P. 96-105.
27. van Poppel H, Haese A, Graefen M, de la Taille A, Irani J, de Reijke T, Remzi M, Marberger M. The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. // *BJU Int*. 2012. Vol. 109, N 3. P. 360-366.
28. Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, Huland H, Abbou CC, Stillebroer AB, van Gils MP, Schalken JA, Fradet Y, Marks LS, Ellis W, Partin AW, Haese A. Prostate cancer gene 3 (PCA3): Development and internal validation of a novel biopsy nomogram. // *Eur Urol*. 2009. Vol. 56. P. 659-668.
29. Wu AK, Reese AC, Cooperberg MR, Sadetsky N, Shinohara K. Utility of PCA3 in patients undergoing repeat biopsy for prostate cancer. // *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012. Vol. 15. P. 100-105.
30. Hansen J, Auprich M, Ahyai SA, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, Huland H, Fisch M. Initial prostate biopsy: Development and internal validation of a biopsy-specific nomogram based on the prostate cancer antigen 3 assay. // *Eur Urol*. 2013. Vol. 63. P. 201-209.
31. Ruffion A, Devonec M, Champetier D, Decaussin-Petrucci M, Rodriguez-Lafrasse C, Paparel P, Perrin P, Vlaeminck-Guillem V. PCA3 and PCA3-Based nomograms improve diagnostic accuracy in patients undergoing first prostate biopsy. // *Int J Mol Sci*. 2013. Vol. 14, N 9. P. 17767-17780.
32. Schilling D, Hennenlotter J, Munz M, Bökeler U, Sievert KD, Stenzl A. Interpretation of the prostate cancer gene 3 in reference to the individual clinical background: implications for daily practice. // *Urol Int*. 2010. Vol. 85, N 2. P. 159-165.
33. Galasso F, Giannella R, Bruni P, Giulivo R, Barbini VR, Disanto V, Leonardi R, Pansadoro V, Sepe G. PCA3: a new tool to diagnose prostate cancer (PCa) and a guidance in biopsy decisions. Preliminary report of the UrOP study. // *Arch Ital Urol Androl*. 2010. Vol. 82, N 1. P. 5-9.