



АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

А.А. Мельник, к.б.н.

Первый молекулярно-генетический тест PCA3 для ранней диагностики рака предстательной железы

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний у мужчин. На сегодняшний день РПЖ занимает первое место среди причин смерти от злокачественных заболеваний у мужчин в США и Европе, опережая рак легких и колоректальный рак. Ежегодно в мире регистрируется 670 тыс. новых случаев РПЖ, из них в США (по данным American Cancer Society, 2015) [1] – 220 800 новых случаев заболевания, которые закончились смертью 27 540 мужчин. В Европе 240 тыс. новых случаев привели к смерти 85 тыс. человек [2]. Частота встречаемости РПЖ – 120 случаев на 100 тыс. мужчин всех возрастных групп. Медицинские статистические данные свидетельствуют о том, что у 1 из 7 мужчин будет диагностирован РПЖ в течение жизни и 1 из 38 мужчин умрет от этого заболевания.

К сожалению, типичные симптомы данного заболевания проявляются только на поздних этапах. В связи с этим очевидна необходимость в поиске новых высокочувствительных, специфичных и неинвазивных методов диагностики, которые позволят проводить диагностику РПЖ на ранних стадиях развития заболевания.

С развитием научных исследований, особенно в области нанотехнологий, а также молекулярной биологии и генетики отмечается появление все большего количества новых маркеров РПЖ. К наиболее многообещающим и изученным можно отнести следующие маркеры: [-2] proPSA (предшественник простатспецифического антигена – ПСА), PSCA (антиген простатических стволовых клеток), PSP 94 (секретируемый белок предстательной железы 94), ERCA/ERCA-2 (ранний антиген РПЖ), uPA/uPAR (рецепторы урокиназы), GSTP1 (глутатион-S-трансфераза P1), TMPRSS2:ERG (ген, кодирующий заякоренную в мембране сериновую протеиназу TMPRSS2, который локализован в локусе 21q22.3) PCA3 (ген РПЖ 3) [3].

Одним из наиболее перспективных среди многих предложенных методов

ранней неинвазивной диагностики РПЖ является определение PCA3 (Prostate Cancer Gene 3).

В начале 90-х годов XX в. (в то время, когда исследование для определения ПСА стало широко использоваться в урологической практике) молодой молекулярный биолог из Нидерландов начал последиplomную практику в Институте урологии Брэйди (Brady Institute for Urology) университета Джона Хопкинса (Johns Hopkins University). Здесь, в лаборатории William B. Isaacs, ученый Marion Bussemakers выполнил исследования ткани предстательной железы человека, используя технику дифференциального дисплея (Differential Display), нового в то время метода идентификации экспрессии генов в разных тканях. Он обнаружил новый ген. Этот ген не был выявлен ни в одной из существующих генетических баз данных. М. Bussemakers назвал новый ген DD3, ссылаясь на его появление на дисплее.

В конечном итоге ген был обнаружен в 53 из 56 образцов ткани РПЖ и отсутствовал в 18 нормальных образцах других тканей организма. М. Bussemakers пришел к выводу, что его можно было бы использовать для диагностики РПЖ, т. к. уровень экспрессии DD3 в раковых клетках предстательной железы более чем в 60 раз превышал уровень экспрессии в нормальных клетках. Дальнейшие исследования показали, что новый ген является некодирующей РНК, которая может быть картирована в хромосоме 9q21-22 (рис. 1). М. Bussemakers считается основоположником и первооткрывателем гена DD3, который позже получил название PCA3 [4].

Ген PCA3 локализован на хромосоме 9q21-22. Транскрипционная единица PCA3 состоит из 4 экзонов (красные

квадраты 1, 2с, 3 и 4) и 3 полиаденилирующих сайтов в экзоне 4 (оранжевые ячейки 4а, 4b и 4с). R.A. Clarke и соавт. [5] идентифицировали 2 новых экзона (2а и 2b), 4 новых полиаденилирующих сайта (вертикальные линии в экзоне 4) и 4 новых транскрипционных стартовых сайта (экзон 1, розовая и светло-розовая ячейки) (рис. 2)

На сегодняшний день предложено 3 поколения систем для диагностики, основанных на определении содержания мРНК гена PCA3 в моче или ее клеточном осадке.

В ноябре 2003 г. компания Gen-Probe Inc. (г. Сан-Диего, США) получила от компании Diagnostics (Канада) эксклюзивные права на диагностику PCA3 по всему миру. Gen-Probe Inc. вскоре разработала количественный анализ PCA3 3-го поколения – PROGENSA®. Особенностью данного теста является определение уровня экспрессии гена PCA3 не в клеточном осадке, а непосредственно в первой порции мочи после массажа предстательной железы (рис. 3).

В ходе многоцентровых исследований, проведенных в 2006-2008 гг., у 1343 пациентов была выявлена достаточно убедительная корреляция между гиперэкспрессией PCA3 и РПЖ с чувствительностью теста 57% и специфичностью 74,5% [6, 7]. В 2007 г. эта система диагностики была также одобрена в ходе исследования (Нидерланды), в котором приняли участие 534 пациента с уровнем ПСА 3-15 нг/мл. Одновременно с определением уровня экспрессии мРНК гена PCA3 проводили гистологическое исследование ткани предстательной железы. Исследование показало, что высокий уровень PCA3 в клеточном осадке мочи коррелирует с высоким риском выявления РПЖ по результатам биопсии [8].



Рис. 4. Схематическое изображение предстательной железы

13 февраля 2012 г. тест PROGENSA® PCA3 был одобрен Управлением по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration – FDA).

Группы пациентов, которым показано проведения теста:

- пациенты с высоким уровнем PSA или после пальцевого ректального исследования для оценки необходимости биопсии;
- лица с отрицательными результатами биопсии, но у которых по-прежнему имеется подозрение на наличие РПЖ;
- пациенты с ≥ 1 отрицательными биопсиями;
- больные с положительными результатами биопсии с целью определения агрессивности рака;
- пациенты с РПЖ, когда применяется выжидательная тактика (без лечения);
- у лиц с целью мониторинга и активного наблюдения относительно прогрессирования рака;
- пациенты, желающие получить дополнительную информацию перед биопсией или простатэктомией;
- мужчины с семейным анамнезом РПЖ.

Этапы исследования PCA3

1. Сбор мочи

Биологическим материалом для анализа PCA3 является моча. Для получения

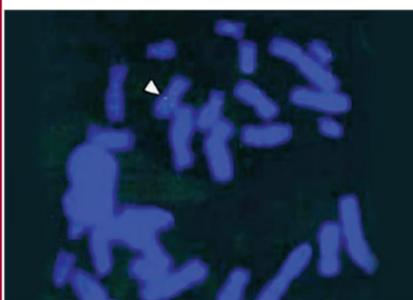


Рис. 1. DD3 картирован в хромосоме 9q21-22

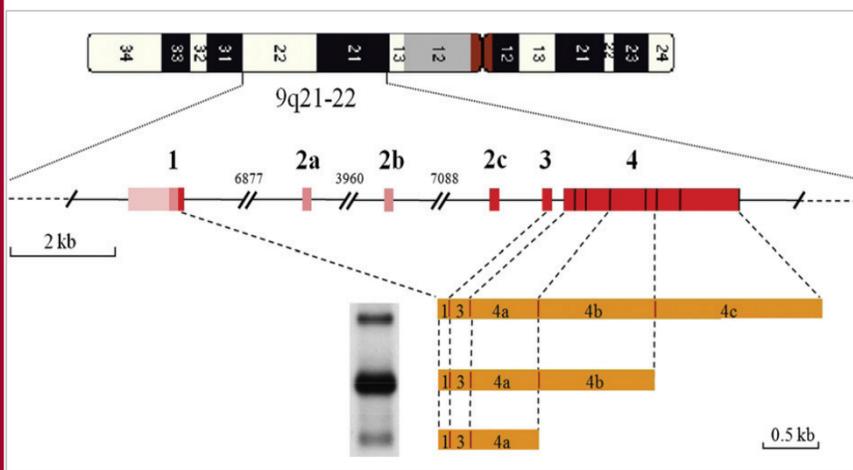


Рис. 2. Локализация гена PCA3 на хромосоме 9q21-22

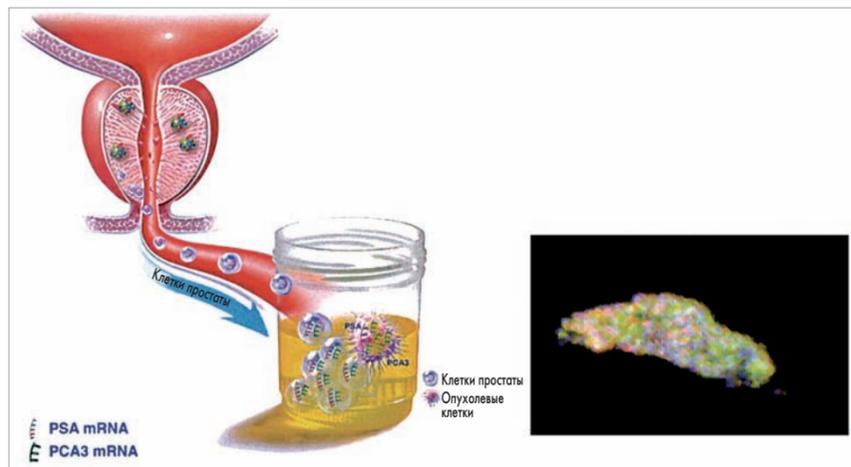


Рис. 3. Определение PCA3 в первой порции мочи после массажа предстательной железы

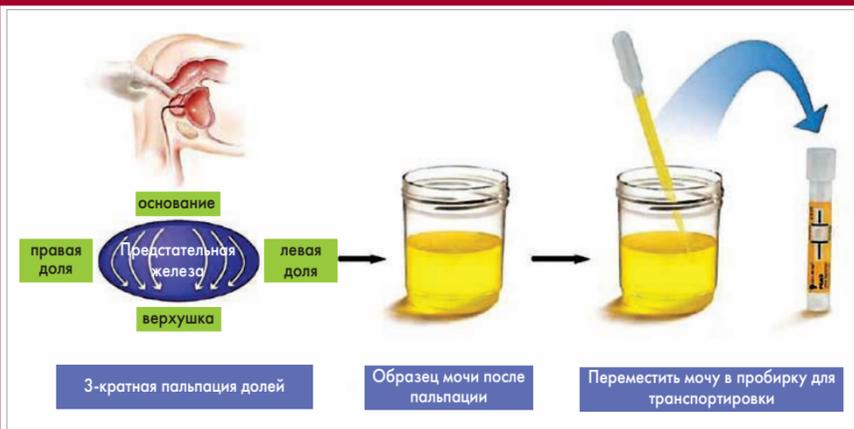


Рис. 5. Сбор мочи для выполнения теста PSA3

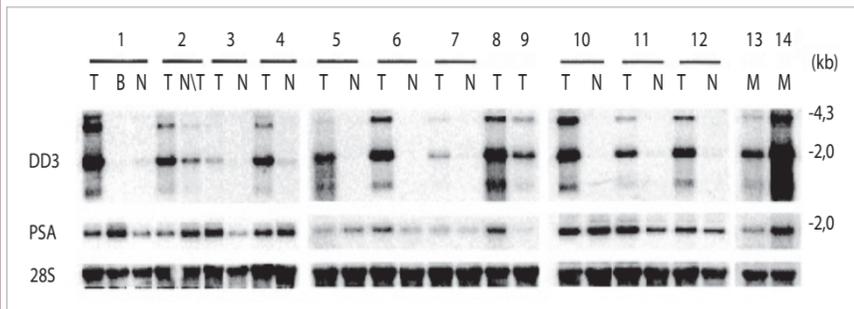


Рис. 8. Высокоэкспрессированная мРНК PSA3 по сравнению с мРНК PSA [4]

достаточного объема мочи для анализа пациенту предлагается выпить около 500 мл жидкости.

Непосредственно перед сбором мочи необходимо провести пальцевое ректальное исследование (рис. 4). Для этого необходимо надавить на поверхность предстательной железы в 1 см между основанием и верхушкой и от боковых долей к середине. Процедуру надавливания осуществляют 3 раза на каждую долю (это не должен быть массаж предстательной железы).

Пациент должен собрать мочу (первую струю, 20-30 мл) сразу же после пальцевого ректального исследования в соответствующую промаркированную емкость. Для проведения анализа PSA3 необходимо не менее 2,5 мл мочи (рис. 5).

Пробы мочи, которые не сразу поместили в пробирки для транспортировки, необходимо хранить при температуре 2-8 °С. Охлажденную пробу мочи в течение 4 ч после сбора следует переместить в пробирки для транспортировки.

2. Отправка образцов мочи для исследования PSA3

Непосредственно анализ на PSA3 производится только в аккредитованных лабораториях всего лишь в 26 странах мира (www.psa3.org). Необходимо отметить, что в странах СНГ нет ни одной лаборатории, аккредитованной для выполнения теста PSA3.

3. Выполнение PSA3 и оценка результатов

При выполнении теста PSA3 in vitro используется метод амплификации нуклеиновых кислот.

Измеряется концентрация копий мРНК гена РПЖ (PSA3) и мРНК ПСА. Коэффициент PSA3 равняется соотношению PSA3 мРНК (mRNA) и ПСА мРНК (PSA mRNA), умноженному на 1000.

$$\text{Коэффициент PSA3} = \frac{\text{PSA3 mRNA}}{\text{PSA mRNA}} \times 1000$$

Коэффициент PSA3 находится в диапазоне от <5 до >100 (рис. 6).

Интерпретация теста

Основным cut-off для коэффициента PSA3 является 25.

Результаты:

- коэффициент PSA3 0-17, отрицательный – связан со снижением вероятности положительной биопсии РПЖ;

- коэффициент PSA3 18-24, отрицательный – коэффициенты в диапазоне 18-24 должны быть интерпретированы с осторожностью. Образцы с коэффициентами вблизи точки отсечки могут свидетельствовать о необходимости повторного тестирования;

- коэффициент PSA3 25-31, положительный – коэффициенты в диапазоне 25-31 должны быть интерпретированы с осторожностью. Образцы с коэффициентами вблизи точки отсечки могут свидетельствовать о необходимости повторного тестирования;

- коэффициент PSA3 >31, положительный – связан с повышенной вероятностью положительной биопсии РПЖ.

Зависимость количества положительных биопсий от коэффициента PSA3 показана на рисунке 7.

Ограничения для определения PSA3

Тест на PSA3 не может быть использован у пациентов, которые принимают препараты, влияющие на уровень ПСА, такие как финастерид (Proscar),



Рис. 6. Шкала коэффициентов для PSA3

дутастерид (Avodart), альфузурин (Uroxatral) и препарат антиандрогенной терапии леупролид (Lupron). Простатэктомия, радиотерапия и биопсия предстательной железы могут повлиять на жизнеспособность ткани железы и, соответственно, на значение PSA3.

Преимущества PSA3 по сравнению с ПСА

ПСА – это органоспецифический, а не раковоспецифический маркер. Поэтому при сравнении сывороточных уровней ПСА и уровня PSA3 в моче последний является более специфичным для РПЖ.

1. Уровень ПСА значительно изменяется под влиянием таких факторов, как доброкачественная гиперплазия предстательной железы, возраст, воспалительный процесс, травма, использование ингибиторов 5-альфа-редуктазы, острый или хронический простатит и др. На уровень PSA3 эти факторы не влияют.

2. мРНК PSA3 является высокоэкспрессированной в опухолях предстательной железы (Т и М) по сравнению с доброкачественной (В) и нормальной тканью (N) в отличие от мРНК ПСА (рис. 8).

3. Коэффициент PSA3 является высокоспецифичным для опухоли предстательной железы и не зависит от объема железы (рис. 9, 10).

Включение PSA3 в предоперационные номограммы

Учитывая тот факт, что PSA3 является важным независимым предиктором результатов биопсии, PSA3 был включен в современные предоперационные номограммы. На сегодня доступно несколько подобных номограмм, 2 из которых построены без учета анамнеза предшествующих биопсий предстательной железы – это калькулятор риска, представленный в PCPT (Prostate Cancer Prevention Trial), и графические номограммы, опубликованные в 2009 г. В 2012 г. F.K. Chun и соавт. [13], A.K. Wu и соавт. [14] в своей номограмме определили показания для повторной биопсии предстательной железы для пациентов с одной отрицательной биопсией в анамнезе. Кроме PSA3 в номограмме учитывается уровень общего ПСА, PSAD (плотность ПСА), данные пальцевого ректального и трансректального ультразвукового исследования. В 2013 г. J. Hansen и соавт. [15] опубликовали данные собственного исследования с построением номограммы для первичной биопсии, которая превосходила клинические модели без PSA3. Диагностическая точность увеличилась на 4,5-7,1%, что было

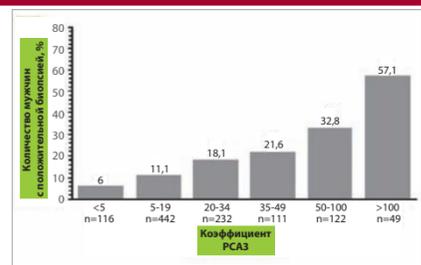


Рис. 7. Доля мужчин с положительной биопсией и коэффициент PSA3 [12]

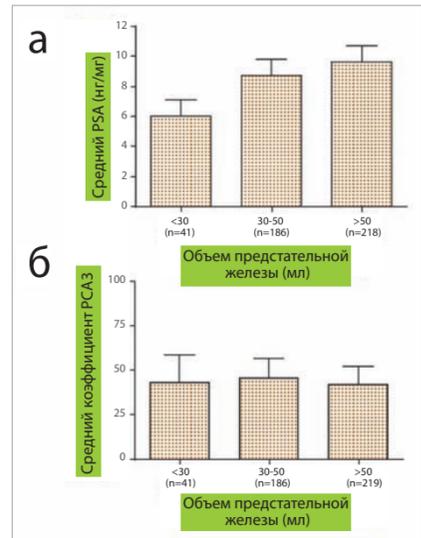


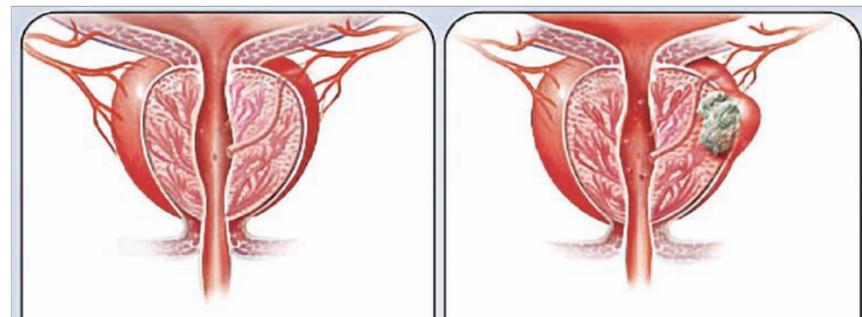
Рис. 10. Уровень ПСА зависит от объема предстательной железы (а), в то время как коэффициент PSA3 не зависит от ее объема (б)

связано с включением PSA3. Авторы сделали вывод, что данная номограмма позволит избежать до 55% так называемых ненужных биопсий предстательной железы. A. Ruffion и соавт. [16] создали номограмму на основании PSA3 для определения показаний к первичной биопсии предстательной железы.

Таким образом, PSA3 – это высокоспецифический маркер, который даст возможность на молекулярно-генетическом уровне определить вероятность РПЖ. Его результаты также позволят врачу-урологу сделать заключение о целесообразности проведения биопсии.

На сегодняшний день проведение теста для определения PSA3 возможно лишь в некоторых частных медицинских лабораториях Украины. В них осуществляется только забор биологического материала – мочи, которая направляется для дальнейшего исследования в одну из аккредитованных лабораторий за рубежом (в основном в Германию). Ориентировочная стоимость теста PSA3 в Украине – от 300 у. е.

Список литературы находится в редакции.



Отрицательные результаты биопсии при увеличенной предстательной железе	Положительные результаты биопсии при нормальном размере предстательной железы
TRUS = 67,7 cc	TRUS = 29,2 cc
ПСА = 7,5 нг/мл	ПСА = 7,0 нг/мл
Коэффициент PSA3 = 32,6	Коэффициент PSA3 = 58,9
n=154	n=144

Рис. 9. В отличие от ПСА значения PSA3 не связаны с размерами предстательной железы