

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТКАНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЛОКАЛИЗОВАННОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Толкач Ю.В., Кучик М., Мерзебургер А., Зерт Ю., Херрманн Т., Имкамн Ф.

Медицинская Школа Ганновера,
Клиника урологии и урологической онкологии, г. Ганновер, Германия

Резюме. Целью исследования являлась оценка прогностической роли 42 генов, роль которых для рака предстательной железы была показана в предшествующих исследованиях. В исследование были включены 28 пациентов с раком простаты, у которых была выполнена радикальная простатэктомия: 19 пациентов с локализованным раком предстательной железы по данным финальной патоморфологии (pT2a-2c) и 9 пациентов с местно-распространенным процессом (pT3a-3b). По результатам анализа экспрессии генов (ПЦР) 6 генов показали свое значение в отношении прогноза стадии pT после операции: GOLM1, GBX2, XPO6, SSTR1, TOP2A и CDCA5. Созданная на основе экспрессии данных генов прогностическая модель обладает общей точностью 75% в отношении определения pT-стадии рака предстательной железы у исследованной группы пациентов.

Ключевые слова: рак предстательной железы; стадия; локализованный; местно-распространенный; экспрессия генов; прогнозирование.

TISSUE-BASED GENE EXPRESSION FOR PROGNOSIS OF PROSTATE CANCER LOCAL STAGE

*Yuri Tolkach, Markus Kuczyk, Axel Merseburger, Jürgen Serth,
Thomas Herrmann, Florian Imkamp*

Hannover Medical School, Clinic for Urology and Urologic Oncology

Abstract. The aim of our study was the evaluation of the prognostic role of 42 genes, which were shown to be related to prostate cancer aggressiveness in previous studies. We have included 28 patients in the study, 19 with localized prostate cancer according to final pathology after radical prostatectomy (pT2a-2c) and 9 patients with locally advanced prostate cancer (pT3a-b). Analysis of the gene expression (PCR) revealed 6 genes with differential expression in tumor tissues of patients from 2 aforementioned groups: GOLM1, GBX2, XPO6, SSTR1, TOP2A and CDCA5. We have created a prognostic model of the pT-stage based on the expression of these 6 genes, which proved to be accurate in 75% of the included cases.

Key words: prostate cancer; staging; locally advanced; localized; gene expression, prognosis.

Введение. Рак предстательной железы является одним из самых распространенных онкологических заболеваний у мужского населения во всем мире. В силу внутренней, генетической, гетерогенности опухолей простаты зачастую сложно прогнозировать течение заболевания на основании только клинических, радиологических и стандартных патологических данных [1]. Поэтому попытка понять особенности опухоли на основании более глубокой характеристики ее клеток на молекулярно-биологическом уровне является абсолютно оправданной [2]. Одним из способов получить представление о свойствах карциномы простаты является оценка экспрессии различных генов, которые могут определять агрессивность опухоли (к примеру, склонность к быстрому росту, инвазии и метастазированию)[3].

Целью нашего исследования являлась оценка в ткани опухоли пациентов экспрессии нескольких десятков генов, роль которых для рака простаты уже была описана в предшествующих исследованиях, с целью выявления тех генов, которые могли бы служить прогностическими критериями инвазивного роста опухоли в предстательной железе, а также создание на их основе прогностической модели локального распространения опухоли в простате.

Материалы и методы

Характеристики пациентов

В исследование были включены 28 пациентов с гистологически-верифицированным раком предстательной железы с клинической стадией заболевания cT1c-cT2b без признаков метастатического поражения. У всех пациентов кроме одного (лапароскопическая радикальная простатэктомия) была выполнена открытая радикальная позадилоная простатэктомия в период с 2010 по 2011 годы. В 26 случаях была выполнена лимитированная или расширенная лимфаденэктомия. Более подробные характеристики пациентов приведены в Таблице 1.

Клинические характеристики пациентов (включая генетическую субклассификацию опухолей)

Параметры	<i>Медиана</i>	<i>[25%; 75%]</i>	<i>Интервал</i>		
Возраст, лет	66	[59,5; 69,5]	49-75		
Общий ПСА до операции, нг/мл	7,02	[5,57; 11,0]	4,0-64,0		
Патоморфология					
pT	<i>pT2a</i>	<i>pT2b</i>	<i>pT2c</i>	<i>pT3a</i>	<i>pT3b</i>
	2	2	15	5	4
pT (локализованный / местно-распространенный РПЖ)	Локализованный			Местно-распространенный	
	19			9	
pN	<i>pN0</i>	<i>pN1</i>			
	26	2			
pR	<i>pR0</i>	<i>pR1</i>			
	21	7			
	<i>Gleason 3</i>	<i>Gleason 4</i>	<i>Gleason 5</i>		
Primary Gleason	23	5	0		
Secondary Gleason	8	18	2		
	<i>6 (3+3)</i>	<i>7 (3+4)</i>	<i>7 (4+3)</i>	<i>8 (4+4)</i>	<i>9 (4+5)</i>
Gleason Sum	4	19	3	0	2
Генетическая характеристика опухоли					
<i>TMPRSS2-ERG</i> фьюжн	Есть	Нет			
	5	23			
Повышенная экспрессия <i>SPINK1</i>	Да	Нет			
	4	24			

Получение тканей из предстательной железы

Непосредственно после удаления предстательной железы производилось изъятие тканей без нарезки биопсийной иглой 16G систематически из разных зон с учетом радиологических и биопсийных данных. Из каждой зоны бралось два биоптата, один - для гистологического контроля. Полученные образцы тканей замораживались в жидком азоте при температуре -80°C до последующей обработки в лаборатории. В дальнейшем анализе использовались образцы опухоли с максимальным показателем Глисона для соответствующего пациента.

Набор исследуемых генов

В соответствии с данными литературы[3-7] были отобраны 42 гена: *ABCC4*, *AMACR*, *ASAH1*, *AURKA*, *BM11*, *BUB1*, *BUB3*, *CBX3*, *CCNB1*, *CDC6*, *CDCA5*, *CDK4*, *CDKN2A*, *ELOVL7*, *ERG*, *ETV1*, *EZH2*, *FGFR2*, *GBX2*, *GOLM1*, *HOXC6*, *KLK3*, *MCM6*, *MKI67*, *MSH2*, *MTA1*, *MUC1*, *MYCBP2*, *MYO6*, *NRP1*, *PLK1*, *PTTG1*, *SMARCA4*, *SPINK1*, *SSTR1*, *TMPRSS2-ERGfusion*, *TOP2A*, *TPD52*, *UBE2I*, *UHRF1BP1*, *XIAP*, *XPO6*. В качестве эндогенного контроля экспрессии и для нормализации были использованы два гена *ALAS1* и *HPRT1*.

Описание процедуры определения экспрессии генов

Экстракция РНК из образцов ткани осуществлялась согласно стандартному протоколу с использованием TRIZol® Reagent (Life Technologies, Carsbad, USA). Конверсия РНК в кДНК осуществлялась при помощи набора для обратной транскрипции (Applied Biosystems, Foster City, USA). Для оценки экспрессии генов использовалась технология TaqMan (LifeTechnologies) и количественная ПЦР. Коммерчески доступные праймеры были использованы для соответствующих генов. Абсолютные значения C_T были использованы для расчета относительной экспрессии мРНК генов.

Обработка данных и статистическая обработка

Данные экспрессии генов обрабатывались при помощи программного обеспечения DataAssist Software v. 3.01 (Life Technologies) с учетом поправок на тестирование множественных гипотез с использованием FDR Бенджамини-Хохберга. Повышенная или пониженная экспрессия считались значимыми при минимум двукратной разнице в относительной экспрессии в сравнении с контролем. Статистическая обработка и построение прогностической модели на основе линейного дискриминационного анализа осуществлялось при помощи STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Результаты

По данным патоморфологического исследования после радикальной операции опухоль была локализованной у 19 пациентов (pT2a-2c) и местно-

распространенной (pT3a-3b) у 9 пациентов. Среди пациентов у 5 был обнаружен фьюжн генов *TMPRSS2* и *ERG*, среди них 2 пациента с местно-распространенным раком предстательной железы и 3 пациента с локализованным процессом по данным финальной патологии. У четырех пациентов опухоли были *SPINK1*-позитивными (из них два с фьюжном *TMPRSS2:ERG* и 1 пациент с местно-распространенным процессом). Дополнительные характеристики приведены в Таблице 1.

В ходе анализа была обнаружена связь 6 генов с локальной стадией опухолевого процесса (Рисунок 1), при этом экспрессия лишь одного гена (*GOLM1*) была повышена при местно-распространенных опухолях.

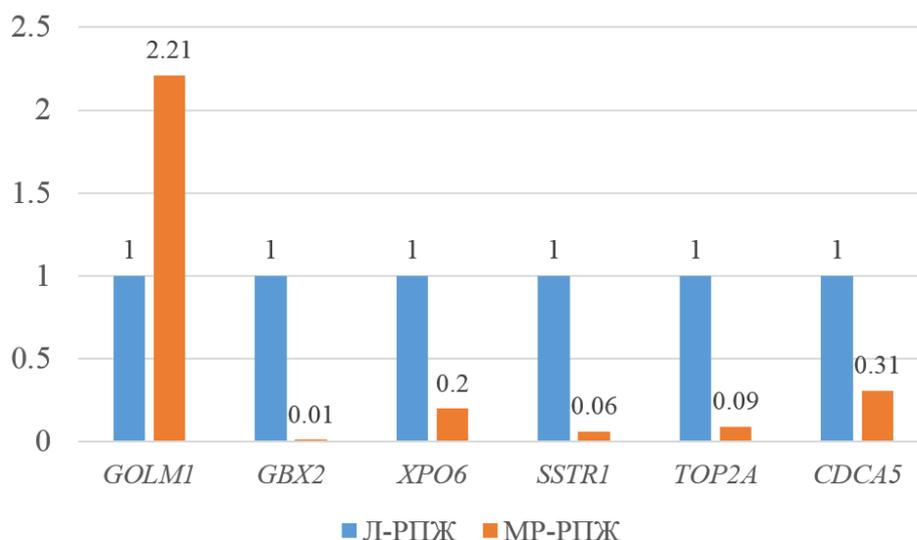


Рис. 1. Относительная экспрессия генов *GOLM1*, *GBX2*, *XPO6*, *SSTR1*, *TOP2A* и *CDCA5* в опухолевых тканях пациентов с локализованным (Л-РПЖ) и местно-распространенным (МР-РПЖ) раком предстательной железы. Для всех 6 показателей $p < 0,05$. В качестве контроля выбрана группа пациентов с локализованным раком (экспрессия генов принята за 1).

На основании полученных данных о экспрессии генов была создана модель на основе линейного дискриминантного анализа для прогнозирования локальной стадии заболевания на основе данных об экспрессии указанных шести генов. Общая точность модели в отношении предсказания стадии pT рака предстательной железы на основании только экспрессии генов составила 75% (Таблица 2).

Таблица 2

Классификация пациентов (n=28) с раком предстательной железы по критерию pT: сравнение результатов патоморфологического исследования и прогноза на основании использованной модели оценки экспрессии шести генов (*GOLM1*, *GBX2*, *XPO6*, *SSTR1*, *TOP2A*, *CDCA5*)

Результат патоморфологии	Выбор модели		Процент верного определения стадии
	Л-РПЖ	МР-РПЖ	
Л-РПЖ	17	2	89.5%
МР-РПЖ	5	4	44.4%
	Общая точность		75%

Л-РПЖ = локализованный рак предстательной железы,
 МР-РПЖ = местно-распространенный рак предстательной железы

Правильное определение стадии
 Ошибочное определение стадии

Обсуждение результатов.

Многочисленные исследования в области генетики рака предстательной железы позволили выявить изменения в различных генах в опухолевых клетках, задействованных в процессах опухолевого роста, инвазии и метастазирования [3-7]. Однако, большая часть этих исследований может быть отнесена к разряду исследований, генерирующих гипотезы. Соответствующая валидизация позволяет в этой ситуации подтвердить или опровергнуть полученные данные.

В нашем исследовании мы ограничились оценкой прогностической роли 42 генов с выявленным ранее значением для рака предстательной железы в отношении неблагоприятных находок при финальном патоморфологическом исследовании простаты после радикальной простатэктомии, а именно локальной стадии (распространенности) процесса в предстательной железе, а также выход его за пределы простаты (критерий pT). Недостатком исследования является отсутствие контроля более надежных конечных показателей (выживаемость), однако, данные ранее опубликованных исследований показывают, что локальная стадия процесса может являться суррогатом для выживаемости[8].

Среди 42 генов мы выявили лишь 6, экспрессия которых обладала прогностическим значением для предсказания локальной стадии опухоли. Это говорит

о том, что большая часть этих генов, несмотря на показанное ранее прогностическое значение в отношении рака предстательной железы [3-7], может быть переоценена. Их дополнительное исследование на клиническом и патологическом материале с длительным сроком наблюдения после операции было бы оправданным для оценки их роли в отношении прогнозирования выживаемости пациентов.

Как показывает анализ точности полученной на основании дискриминантного анализа модели, модель с высокой точностью позволяет классифицировать случаи локализованного рака предстательной железы, тогда как точность в отношении определения местно-распространенного рака предстательной железы оставляет желать лучших результатов. Тем не менее, при такой производительности модели ее можно было бы использовать следующим образом: все случаи, которые были классифицированы, как местно-распространенный рак предстательной железы, должны получать активное лечение независимо от прочих обстоятельств. В отношении случаев, классифицированных как локализованный рак предстательной железы, можно сделать акцент на активное наблюдение при условии, что клинические параметры позволяют включить пациентов в программу активного наблюдения.

Логичной областью для применения полученных данных является оценка инвазивных свойств опухоли на основании биопсийного материала[9].

Данное исследование являлось пилотным и преследовало цель отбора генов для последующего использования на большей по размеру исследовательской когорте, поэтому мы не проводили мультипараметрический анализ с включением клинических и радиологических параметров (это было невозможным в связи с небольшим количеством исследованных пациентов). Поэтому на данный момент сложно утверждать, сохраняют ли свою значимость параметры генетической экспрессии указанных выше шести генов или нет. Следующим закономерным этапом настоящего исследования является валидизация полученных данных.

Заключение. Результаты нашего исследования показывают, что на основании данных экспрессии ряда генов возможно прогнозирование локального рас-

пространения опухоли в предстательной железе. После соответствующей независимой валидации можно будет принять решение о внедрении данного типа анализа в клиническую практику.

Литература

1. Eifler, JB. An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011 / J.B. Eifler, Z. Feng, B.M. Lin, M.T. Partin, et al. // *BJU Int.* – 2013, Vol.111. – P. 22-29.
2. Fraser, M. Genomic, pathological, and clinical heterogeneity as drivers of personalized medicine in prostate cancer / M. Fraser, A. Berlin, R.G. Bristow, T. van der Kwast // *Urol Oncol.* – 2015, Vol. 33. – P. 85-94
3. Tomlins, SA. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression / S.A. Tomlins, R. Mehra, D.R. Rhodes et al. // *Nat Genet.* – 2007, Vol. 39. – P. 41-51.
4. Barbieri CE. The mutational landscape of prostate cancer / C.E. Barbieri, C.H. Bangma, A. Bjartell, J.W. Catto // *Eur Urol.* – 2013, Vol. 64. – P. 567-576.
5. Bismar TA. Defining aggressive prostate cancer using a 12-gene model / T.A. Bismar, F. Demichelis, A. Riva et al. // *Neoplasia.* – 2006, Vol. 8. – P. 59-68.
6. Glinsky GV. Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer / G.V. Glinsky, A.B. Glinskii, A.J. Stephenson, R.M. Hoffman, et al. // *J Clin Invest.* – 2004, Vol.113. – P. 913-923.
7. Kosari F. Identification of prognostic biomarkers for prostate cancer / F. Kosari, J.M.A. Munz, C.D. Savci-Heijink et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008, Vol.14. – P. 1734-1743.
8. May F. The ability of the American Joint Committee on Cancer Staging system to predict progression-free survival after radical prostatectomy / F. May, R. Hartung, J. Breul // *BJU Int.* – 2001, Vol. 88. – P. 702-707.
9. Van der Kwast TH. Prognostic prostate tissue biomarkers of potential clinical use / T.H. Van der Kwast // *Virchows Arch.* – 2014, Vol.464. – P. 293-300.