УДК 616.65–006.6–07–076–079.457.089

# БІОМАРКЕРИ РАННЬОЇ ТА ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

**В. М. Григоренко, Р. О. Данилець, М. В. Вікарчук, Л. В. Горбань, А. В. Клепко**

Інститут урології НАМН України,
Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України, м. Київ

# BIOMARKERS OF EARLY AND DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PROSTATIC CANCER

**V. M. Grygorenko, R. O. Danylets, M. V. Vikarchuk, L. V. Gorbahn, A. V. Klepko**

Institute of Urology,
National Scientific Centre of Radiation Medicine, Kyiv

**Реферат**

Обстежені 87 пацієнтів з приводу захворювань передміхурової залози (ПЗ), у яких рівень загального простатспецифічного антигену (ПСА) в крові становив 0,5 — 30 нг/мл. У 27 з них захворювання ПЗ не виявлені, у 28 — діагностований рак ПЗ (РПЗ), у 32 — доброякісна гіперплазія ПЗ (ДГПЗ). Доведено, що частота РПЗ та ДГПЗ корелювала з об'ємом ПЗ та залежала від концентрації ПСА та його ізоформ в крові. Рівень [—2]проПСА у сироватці крові достовірно різнився в усіх трьох групах, рівень загального та вільного ПСА — у пацієнтів групи 1 у порівнянні з таким у групах 2 і 3. Це свідчило про можливість визначення вмісту [—2]проПСА як альтернативного біомаркера ранньої та диференційної діагностики РПЗ.

**Ключові слова:** рак передміхурової залози; доброякісна гіперплазія передміхурової залози; простатспецифічний антиген; трансректальне ультразвукове дослідження.

**Abstract**

There were examined 87 patients, suffering prostatic gland diseases, in whom the level of general prostate—specific antigen (PSA) in the blood have constituted 0.5 — 30 ng/ml. In 27 of them prostatic gland diseases were not revealed, in 28 — prostatic cancer was diagnosed, and in 32 — benign prostatic hyperplasia. There was proved, that rate of prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia have correlated with prostatic gland volume and depended upon PSA and its isoforms concentration in the blood. The [—2]proPSA in the blood serum level have differed in all three groups, and the level of general and free PSA — in patients of group I, comparing with that in the groups 2 and 3. That have witnessed the possibility of determining of the [—2]proPSA content as alternative biomarker of early and differential diagnosis of prostatic cancer.

**Keywords:** prostatic cancer; benign hyperplasia of prostate; prostate—specific antigen; transrectal ultrasound investigation.

Простатспецифічний антиген (ПСА) належить до сімейства серинових протеаз, його продукують епітеліальні клітини ПЗ [1]. Встановлено, що у 30 — 50% пацієнтів за ДГПЗ рівень ПСА в сироватці крові підвищений, залежно від розмірів ПЗ та ступеню її ураження [2]. У 20 — 90% хворих на РПЗ також спостерігали підвищення рівня ПСА, що певним чином пов'язане з патогенезом аденокарциноми та її об'ємом [3].

Визначення рівня загального ПСА (зПСА) у сироватці крові як діагностичного маркера РПЗ має переваги у порівнянні з пальцевим ректальним дослідженням (ПРД) та трансректальним ультразвуковим дослідженням (ТРУЗД) ПЗ, оскільки результат не залежить від досвіду лікаря, є кількісним та об'єктивним. До того ж, скринінг злоякісних новоутворень за даними визначення рівня ПСА є зручною процедурою для пацієнтів, а його поєднання з ПРД та ТРУЗД дозволяє значно підвищити діагностичну ефективність тесту та створити комбіновану панель біомаркерів [4].

За результатами біохімічних досліджень, зПСА це сума вільного (вПСА) та зв'язаного (звПСА) ПСА, причому звПСА — це поліпептид з 237 залишків амінокислот, на 95% зв'язаний з α1—антихімотрипсином, частково — з α2—макроглобуліном та антитрипсином. У зв'язаному стані ПСА захищений від руйнівного впливу різних ферментів [5]; вПСА представлений кількома формами, з яких виділяють доброякісний ПСА, що синтезують лише клітини ДГПЗ, та проПСА, що синтезують клітини аденокарциноми. До складу проПСА входять молекули самого ПСА, до якого з N—кінця приєднується лідерний пептид, що може містити від 2 до 7 амінокислот. Найбільш стабільною формою вважають [—2]проПСА, що містить лідерний пептид з двох залишків амінокислот. Під впливом калікреїнових протеаз Kl—2 і Kl—4 проПСА перетворюється на ПСА. Останнім часом з'явились повідомлення про перспективність використання [—2]проПСА та його похідних, зокрема, індексу здоров'я ПЗ, з метою скринінгу РПЗ та підвищення специфічності діагностики. Припускають, що це дасть змогу зменшити частоту виконання непотрібної біопсії ПЗ та хибно—позитивних результатів у порівнянні з такою під час діагностики РПЗ шляхом визначення лише концентрації зПСА, особливо в так званій "сірій" зоні (4 — 10 нг/мл) [6, 7].

Мета дослідження: проведення ранньої діагностики РПЗ за допомогою визначення рівня ПСА, ПРД та ТРУЗД, а також порівняння рівня ПСА та його ізоформ, вПСА і [—2]проПСА у пацієнтів при РПЗ, ДГПЗ та умовно здорових чоловіків.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження включені 87 чоловіків віком від 49 до 77 років, яким проведене планове комплексне обстеження в клініці у 2013 — 2016 рр. Всі пацієнти дали письмову згоду на участь у дослідженні, протокол дослідження схвалений комісією з етики. Пацієнтів за наявності простатиту та урогенітальних інфекцій у дослідження не включали.

В усіх пацієнтів забирали кров для визначення рівня зПСА, вПСА та [—2]проПСА у сироватці, а також проводили ПРД та ТРУЗД. Кров забирали напередодні проведення ПРД та ТРУЗД або не раніше ніж за 2 тиж після ПРД, оскільки ця маніпуляція може сприяти підвищенню рівня ПСА в крові [5, 8].

За даними ПРД пацієнти розподілені на 3 групи: в групу 1 включені пацієнти без змін об'єму та консистенції ПЗ; в групу 2 — пацієнти, у яких виявлені зміни органа, характерні для ДГПЗ, зокрема, збільшення розмірів її центральної зони; в групу 3 — хворі з ознаками, характерними для РПЗ: асиметрія, неоднорідність структури, ділянки ущільнення тканини ПЗ.

За даними ТРУЗД ПЗ пацієнтів вважали здоровими за відсутності гіпоехогенних зон в структурі ПЗ, її об'єму до 40 см$^3$. Гіперплазію, асиметрію, наявність конкрементів, гіпоехогенність центральної зони ПЗ вважали змінами, характерними для ДГПЗ; наявність гіпоехогенних ділянок периферійної зони ПЗ та її гіперплазію — ознаками РПЗ.

Для визначення концентрації ПСА протягом 3 год після взяття крові отримували сироватку, яку утримували при температурі 2 — 8 °С до моменту аналізу, якщо його проводили у строки до 24 год. За іншої ситуації сироватку крові заморожували і зберігали при температурі — 70 °С [9]. Рівень ПСА та його ізоформ визначали за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням наборів виробництва фірми DLDevelop (Шанхай). Всі вимірювання проводили на автоматичному імуноферментному аналізаторі CHEM WELL.

Пацієнтів за рівня зПСА 4,0 нг/мл і більше направляли для проведення біопсії ПЗ. Крім того, біопсію також проводили пацієнтам при припущенні про наявність РПЗ за даними ПРД та ТРУЗД.

Біопсію ПЗ виконували під контролем ТРУЗД з 10 — 16 точок з використанням біопсійної голки G18. За даними морфологічного дослідження визначали ступінь диференціації пухлини за Глісоном. В усіх хворих при показниках диференціації пухлини за Глісоном 7 і більше та у 3 — за показника 6 в подальшому виконано радикальну простатектомію, що дало змогу класифікувати пухлини за стадією.

Статистична обробка результатів проведена з використанням методів варіаційної статистики після лог—трансформації первинних даних за односпрямованим дисперсійним аналізом ANOVA. Попарне порівняння трьох груп проводили за тестом Ст'юдента з поправкою Бонферонi. Розбіжності між групами вважали статистично значущими при $p<0,05$. Довірчі інтервали середніх значень визначали за стандартною похибкою [10].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень зПСА у сироватці крові пацієнтів становив від 0,50 до 30 нг/мл. Залежно від рівня зПСА пацієнти розподілені на 4 групи: у 5 з них (1—ша група) — він становив 0,50 — 2,49 нг/мл, у 23 (2—га група) — 2,50 — 3,99 нг/мл, у 49 (3—тя група) — 4 — 10 нг/мл, у 10 (4—та група) — понад 10 нг/мл.

За даними ПРД ознак ДГПЗ та РПЗ у пацієнтів 1—ї групи не було. В інших групах частота виявлення ознак, за якими припускали наявність РПЗ, поступово збільшувалася і була максимальною (80%) у 4—й групі; ознаки ДГПЗ в 3—й групі виявлені у 24% хворих. За даними ТРУЗД підтверджено відсутність патологічних змін ПЗ у пацієнтів 1—ї групи. У 2—й і 3—й групах ознаки гіпоехогенності задньої периферійної зони виявлені відповідно у 7 та 45 хворих. У 4—й групі в усіх пацієнтів за даними ТРУЗД виявлені ознаки РПЗ.

У пацієнтів при припущенні про наявність РПЗ проводили біопсію. У 2—й групі у 27% пацієнтів діагноз підтверджений за даними морфологічного дослідження біоптатів; у 3—й групі — у 37%, у 4—й групі — у

Таблиця 1. **Результати морфологічного дослідження пухлини у хворих, яким виконана радикальна простатектомія**

| Група | Кількість хворих на РПЗ | Кількість пацієнтів, у яких ступінь диференціації (за Глісоном) становив | | | Кількість пухлин у стадії | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2-4 | 5-6 | 7-9 | pT2a | pT2b-pT2c | pT3 |
| 1-ша | - | - | - | - | - | - | - |
| 2-га | 3 | - | - | 3 | - | 3 | - |
| 3-тя | 18 | 2 | 9 | 7 | 3 | 6 | 1 |
| 4-та | 7 | - | 1 | 6 | 2 | 3 | 2 |

Таблиця 2. **Рівень зПСА, вПСА та [-2]проПСА у сироватці крові пацієнтів без патології ПЗ, при ДГПЗ та РПЗ**

| Показник | Величина показника в групах ($\bar{x} \pm m$) | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| зПСА, нг/мл | $2,83 \pm 1,52^{ab}$ | $5,94 \pm 4,2^{a}$ | $6,05 \pm 5,12^{b}$ |
| [-2]проПСА, пг/мл | $6,31 \pm 3,24^{ab}$ | $10,21 \pm 5,83^{ac}$ | $114,78 \pm 7,25^{bc}$ |
| вПСА, нг/мл | $0,71 \pm 0,36^{ab}$ | $1,24 \pm 0,92^{a}$ | $1,06 \pm 0,77^{b}$ |

*Примітка.* Однакові літери свідчать про статистично значущі відмінності показників ($p<0,05$).

70%, причому, частота виявлення агресивних пухлин (ступінь диференціації за Глісоном 7 і більше) була максимальною у 2—й групі, мінімальною — у 3—й групі (*табл. 1*). Такий результат, на нашу думку, можна пояснити невеликою кількістю хворих з ознаками РПЗ в групах 2 і 4, яким проведено біопсію.

У 2—й групі в усіх хворих, яким здійснена радикальна простатектомія, відзначена локалізована форма РПЗ (стадія pT2a—2c), у 3—й групі в одного хворого встановлене поширення пухлини за межі капсули (стадія pT3a), у 4—й групі в одного хворого — поширення пухлини на сім'яні пухирці (стадія pT3b), в одного — на регіонарні лімфатичні вузли (стадія pT3bN1).

За об'єму ПЗ менше 40 см$^3$ РПЗ діагностований у 39% хворих, при ДГПЗ частота виявлення РПЗ не перевищувала 14%. Цей результат можна пояснити малою кількістю пацієнтів, у яких рівень зПСА перевищував 20 нг/мл, коли частота РПЗ перевищувала 50%, що супроводжувалося помітним збільшенням об'єму ПЗ [11].

На підставі аналізу результатів морфологічного дослідження біоптатів, імуноферментного визначення рівня зПСА, а також даних ПРД та ТРУЗД виділені три категорії пацієнтів: практично здорові чоловіки, хворі, у яких діагностовані РПЗ та ДГПЗ. В обстежених без будь—якої патології ПЗ концентрація зПСА становила 0,50 — 5,99 нг/мл. При збільшенні рівня зПСА понад 6 нг/мл частота виявлення РПЗ поступово зменшувалась: за рівня зПСА 6 — 10 нг/мл у 18% хворих встановлений РПЗ, у 24% — ДГПЗ; за рівня зПСА 0,50 — 5,99 нг/мл — відповідно у 8 та 6%; за концентрації зПСА понад 10 нг/мл частота РПЗ у 2,3 разу перевищувала таку ДГПЗ.

Аналіз рівня зПСА, вПСА та [—2]проПСА у сироватці крові пацієнтів (*табл. 2*) свідчив, що рівень зПСА був найменшим у здорових осіб, у групах 2 і 3 — майже однаковим, причому, статистично значущі відмінності відзначені в групах 1 і 2 та 1 і 3; рівень вПСА був максимальним у пацієнтів за ДГПЗ, мінімальним — у здорових чоловіків. Статистично значущі відмінності між групами були такими самими, як і рівня зПСА. Рівень [—2]проПСА достовірно різнився в усіх групах. Отримані дані узгоджуються з результатами інших дослідників [12 — 14], які також наголошували на діагностичних та прогностичних властивостях [—2]проПСА.

ПроПСА виявляли лише в крові, у сім'яній рідині він відсутній [15]. Цей білок є неактивною формою ПСА і перебуває у вільному, тобто, некомплексованому з антипротеазними агентами стані, що підтверджене за даними мас—спектрометрії та Western blot аналізу. ПроПСА містить декілька ізоформ: [—2]проПСА, [—4]проПСА, [—5]проПСА та [—7]проПСА, найбільш стабільні перші дві молекули. У дослідженні за участю 119 пацієнтів, у 88 з яких діагностований РПЗ, встановлено, що проПСА становив у середньому 4,6% зПСА та 39,3% вПСА. При порівнянні двох груп рівень проПСА був вище при РПЗ [16].

Використання [—2]проПСА як альтернативного біомаркера дозволить з достатньою точністю виділяти хворих на РПЗ та ДГПЗ, що сприятиме зменшенню частоти помилково—негативних та помилково—позитивних результатів і, відповідно, підвищенню чутливості та специфічності ранньої діагностики. Крім того, це сприятиме зменшенню частоти ускладнень, а також економічних витрат, пов'язаних з проведенням непотрібної біопсії ПЗ.

## ВИСНОВКИ

1. Підвищення рівня ПСА у сироватці крові від 0,50 до 30 нг/мл свідчить про збільшення ймовірності виникнення РПЗ та можливості виявлення агресивних пухлин.

2. Ймовірність виявлення РПЗ корелює з об'ємом ПЗ, найбільшу частоту РПЗ спостерігали за об'єму ПЗ 30 — 40 см$^3$.

3. Встановлені статистично значущі відмінності концентрації [—2]проПСА у сироватці крові у пацієнтів без патології ПЗ, за наявністі РПЗ та ДГПЗ. Суттєві відмінності рівня зПСА та вПСА при РПЗ та ДГПЗ не виявлені.

## ЛІТЕРАТУРА


1. Andrology. Male reproductive health and dysfunction; ed. E. Neischlag, H. M. Behre, S. Neischlag. — Berlin; Heidelberg: Springer—Verlag, 2010. — 3 rd ed. — 685 p.
2. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia / A. W. Partin, H. B. Carter, D. W. Chan et al. // J. Urol. — 1990. — Vol. 143. — P. 747 — 752.
3. Carlson G. D., Calvanese C. B., Partin A. W. An algorithm combining age, total prostate—specific antigen (PSA), and percent free PSA to predict prostate cancer: results on 4298 cases // Urology. — 1998. — Vol. 52, N 3. — P. 455 — 561.
4. Hudson M. A., BahnsonR. R., Catalona W. J. Clinical use of prostate specific antigen in patients with prostate cancer // J. Urol. — 1989. — Vol. 145. — P. 1011 — 1017.
5. Measurement of prostate—specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer / W. J. Catalona, D. S. Smith, T. L. Ratlife et al. // New J. Med. — 1991. — Vol. 324, N 17. — P. 1156 — 1161.
6. Comparative evaluation of total PSA, free/total PSA, and complexed PSA in prostate cancer detection / S. Tanguay, L. R. Begin, M. M. Elhilali et al. // Urology. — 2002. — Vol. 59, N 2. — P. 261 — 265.
7. Stephan C., Kahrs A—M., Cammann H. A [—2]proPSA—based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases // Prostate. — 2009. — Vol. 69. — P. 198 — 207.
8. Association of [—2]proPSA with biopsy reclassification during active surveillance for prostate cancer / J. J. Tosoian, S. Loeb, Z. Feng et al. // J. Urol. — 2012. — Vol. 188, N 4. — P. 1131 — 1136.
9. Jansen F. H., Schaik R. H. N., Kurstjens J. Prostate—specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection // Eur. Urol. — 2010. — Vol. 57. — P. 921 — 927.
10. An introduction to medical statistics; ed. M. Bland 3rd. — Oxford: Oxf. Univ. Press, 2007. — 405 p.
11. Evaluation of percentage of free serum prostate—specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening / W. J. Catalona, D. S. Smith, R. L. Wolfert et al. // J. A. M. A. — 1995. — Vol. 274, N 15. — P. 1214 — 1220.
12. [—2]Proenzyme prostate specific antigen for prostate cancer detection: A National center institute early detection research network validation study / L. J. Sokol, Y. Wang, Z. Feng et al. // J. Urol. — 2008. — Vol. 180. — P. 539 — 543.

13. Additional use of [—2] precursor prostate—specific antigen and "benign" PSA at diagnosis in screen—detected prostate cancer / S. de Vries, R. Raaijmakers, B. G. Blijenberg et al. // Urology. — 2005. — Vol. 65, N 5. — P. 926 — 930.
14. Serum pro—prostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancer in men with 2 to 4 ng/ml prostate specific antigen / W. J. Catalona, G. Bartsch, H. G. Rittenhouse et al. // J. Urol. — 2004. — Vol. 171. — P. 2239 — 2244.
15. Mikolajczyk S. D., Grauer L. S., Millar L. S. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum // Urology. — 1997. — Vol. 50, N 5. — P. 710 — 714.
16. Proenzyme PSA for the early detection of prostate cancer in the 2,5—4,0 ng/ml total PSA range: preliminary analysis / L. J. Sokol, D. W. Chan, S. D. Mikolajczyk et al. // Ibid. — 2003. — Vol. 61, N 2. — P. 274 — 276.