

# Современные биомаркеры рака предстательной железы Перспективы EN2 в диагностике рака предстательной железы

А.С. Тарабаева, А.Б. Жубантурлиева, И.М. Охас

Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова; Казахстан, 050000 Алматы, Толе-би, 94

Контакты: Айнагуль Баубековна Жубантурлиева [azhuban@mail.ru](mailto:azhuban@mail.ru)

Рак предстательной железы является одной из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований у мужчин. В связи с этим актуальным является поиск диагностических маркеров, позволяющих создание недорогих, эффективных тестов для ранней диагностики заболевания, предикции риска развития рецидивов и оценки эффективности проводимой терапии. Существующие инвазивные методы диагностики рака предстательной железы представляют некоторые затруднения для пациентов. В настоящей статье рассматриваются диагностические возможности тканевых биомаркеров рака предстательной железы, получаемые неинвазивными способами.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, биомаркер, белок EN2, диагностика

**Для цитирования:** Тарабаева А.С., Жубантурлиева А.Б., Охас И.М. Современные биомаркеры рака предстательной железы. Перспективы EN2 в диагностике рака предстательной железы. Онкоурология 2020;16(3):165–73.

DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-3-165-173



## Modern prostate cancer biomarkers. Prospects for EN2 in the prostate cancer diagnosis

A.S. Tarabayeva, A.B. Zhubanturliyeva, I.M. Okhas

Asfendiyarov Kazakh National Medical University; 94 Tole Bi St., Almaty 050000, Kazakhstan

Prostate cancer is one of the most common forms of malignant neoplasms in men. In this regard, it is relevant to search for diagnostic markers that allow the creation of inexpensive, effective tests for early diagnosis of the disease, predicting the risk of relapse and assessing the effectiveness of the therapy. Existing invasive methods for diagnosing prostate cancer present some difficulties for patients. This article discusses the diagnostic capabilities of tissue biomarkers of prostate cancer obtained by non-invasive methods.

**Key words:** prostate cancer, biomarker, EN2 protein, diagnostics

**For citation:** Tarabayeva A.S., Zhubanturliyeva A.B., Okhas I.M. Modern prostate cancer biomarkers. Prospects for EN2 in the prostate cancer diagnosis. Onkourologiya = Cancer Urology 2020;16(3):165–73. (In Russ.).

### Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место после рака легкого среди злокачественных новообразований у мужчин и является 4-м по распространенности среди всех форм рака. Так, по оценкам Американского онкологического общества, в 2019 г. в США выявлено 174650 новых случаев РПЖ, что на 6 % больше, чем в 2018 г. В 2018 г. в мире было зарегистрировано более 1,3 млн новых случаев РПЖ [1]. При этом высокие уровни заболеваемости зарегистрированы в Австралии, Северной и Западной Европе, а также в Северной Америке. По данным Казахского научно-исследовательского института онкологии и радиологии, РПЖ — наиболее распространенное онкологическое

заболевание у мужчин в Казахстане после рака легкого, желудка и кожи. При этом у мужчин отмечается самая низкая 5-летняя выживаемость при данной патологии.

Раннее выявление РПЖ основано на определении уровня сывороточного антигена РПЖ (простатического специфического антигена (ПСА), пальцевом ректальном исследовании предстательной железы (ПЖ) и гистологическом исследовании биопсийного материала ПЖ. Следует отметить, что рост заболеваемости РПЖ в последнее время связан как с увеличением продолжительности жизни, так и с улучшением диагностики за счет использования ПСА-теста в качестве метода выявления РПЖ. Например, в Казахстане после внедрения скрининговой программы по выявлению

РПЖ заболеваемость увеличилась с 2011 г. по 2016 г. с 5,0 до 8,7 на 100 тыс. населения соответственно. При этом отношение смертности к заболеваемости снизилось за этот же период с 50 до 28,7 %, и ранг заболеваемости переместился с 12-го на 7-е место [2].

#### Простатический специфический антиген

Простатический специфический антиген является калликреин сериновой протеазой, кодируемой геном *KLK3*, уровень которой может повышаться при РПЖ, а также при аденоме ПЖ или простатите.

В целом чувствительность общего ПСА (общПСА) в диагностике РПЖ, по данным различных источников, составляет 80–98 %. Однако специфичность этого белка крайне невысокая и разнится по данным различных исследований (5–35 %) [3].

Таким образом, низкая специфичность ПСА-теста приводит к гипердиагностике заболевания и диктует необходимость проведения повторных биопсий, что является основным недостатком теста. В связи с этим возникает необходимость в разработке более эффективного теста для выявления клинически значимого РПЖ.

#### Модификации простатического специфического антигена

Известны 2 основные формы ПСА: свободный ПСА (свПСА), т.е. не связанный с ингибиторами, и общПСА. Свободный ПСА имеет 3 ферментативно-неактивные формы: проэнзим свПСА (про-ПСА), доброкачественная фракция свПСА и интактный ПСА. Соотношение свПСА и общПСА способствует дифференцировке РПЖ и доброкачественных заболеваний ПЖ. Белки про-ПСА показали более высокую специфичность в диагностике РПЖ.

Это послужило основой для разработки индекса здоровья предстательной железы (ИЗП), который является интегральным расчетным показателем 3 модификаций ПСА (общПСА, про-ПСА2, свПСА) [4].

Было выявлено, что оценка общПСА в диапазоне между 2 и 10 нг/мл, %p2ПСА (соотношение p2ПСА (предшественник специфического антигена ПЖ) к свПСА  $\times 100$ ) и ИЗП более перспективна в прогнозировании РПЖ по сравнению с общПСА, %свПСА и плотностью ПСА [5].

В ряде клинических исследований проведен анализ эффективности ИЗП по сравнению с другими биомаркерами. Так, в европейской группе мужчин, подвергнутых начальной или повторной биопсии, сравнивали ИЗП с общПСА или свПСА. ИЗП увеличивал значения площади под кривой (AUC) до 0,70 по сравнению с 0,65 или 0,53 соответственно [6]. В другом исследовании установлено, что 30,1 % пациентов, которым была проведена биопсия, могли бы избежать этой болезненной процедуры на основании ИЗП [7].

Также отмечено, что p2ПСА и ИЗП обладают лучшими диагностическими характеристиками для выявления РПЖ в диапазоне ПСА 1,6–8,0 нг/мл по сравнению с общПСА и %свПСА при начальной и повторной биопсии, а также для прогнозирования развития РПЖ у мужчин в возрасте  $\leq 65$  лет [8].

Было показано, что при чувствительности 80 % уровень про-ПСА значительно выше, чем уровень ПСА. При этом показатели про-ПСА коррелируют с суммой баллов по шкале Глисона и существенно выше при агрессивных формах РПЖ [9].

#### Мочевые биомаркеры рака предстательной железы

Выявлено, что некоторые белки, продуцируемые опухолевыми клетками, поступают непосредственно в мочу через протоки предстательной железы в 2 формах: растворимой и мембраносвязанной [10].

*PCA3* – ген, экспрессирующий некодирующую матричную РНК, на которой, тем не менее, могут синтезироваться небольшие белки, для последних даже имеются соответствующие иммуоферментные анализы (ИФА). При этом в отличие от ПСА на экспрессию *PCA3* в меньшей степени влияют такие факторы, как возраст пациента, наличие сопутствующих воспалительных заболеваний, объем поражения предстательной железы, а также наличие предыдущих биопсий. В частности, была проанализирована эффективность *PCA3* перед первой биопсией. Уровень *PCA3* был выше у мужчин с положительными результатами биопсии (70 баллов против 31 балла), при этом показатель *PCA3* (AUC 0,787) превышал показатели общПСА и свПСА (AUC 0,594 и 0,684 соответственно) для прогнозирования исхода биопсии [11].

В другом исследовании у мужчин, которым проводилась первичная биопсия, положительная прогностическая ценность оценки *PCA3* составила 80 % (95 % доверительный интервал 72–86 %) [12]. Предполагается, что оценка *PCA3* помогает избежать повторной биопсии у 72,2 % пациентов (AUC 0,80) [13].

Таким образом, внедрение в клиническую практику количественного метода оценки *PCA3* позволит улучшить диагностику РПЖ и сократить число проводимых биопсий [14].

#### Маркеры на основе транскрипта трансмембранной сериновой протеазы 2

Слияния генов чаще всего вызваны геномной хромосомной перегруппировкой. Считается, что такие слияния генов играют определенную роль в развитии отдельных типов опухолей. В частности, изучено слияние генов трансмембранной сериновой протеазы 2 (*TMPRSS2*) с некоторыми транскрипционными факторами семейства *ETS* (*TMPRSS2-ERG*) [15]. Семейство генов *ETS* является самым большим семейством транскрипционных факторов, характерным только

животным, участвует в развитии различных тканей, а также играет роль в прогрессировании рака.

*TMPRSS2-ERG* является результатом перегруппировки генов и слияния андрогенрегулируемой *TMPRSS2* и генов транскрипционного фактора *ERG*, что приводит к значительной избыточной экспрессии *ERG*, которая, как сообщается, способствует онкогенезу РПЖ [16].

Также показано, что аберрация гена фосфатазы и гомолога тензина (*PTEN*) и *TMPRSS2-ERG* часто встречается при РПЖ. Так, в образцах ткани РПЖ отмечалась потеря экспрессии *PTEN* в сотрудничестве с *TMPRSS2-ERG*, в то время как нормальные ткани таких молекулярных аберраций не демонстрировали [17].

Изучение 4 биомаркеров (регулятора транскрипции *ERG*, *PTEN*, богатого цистеином секреторного белка 3 (*CRISP3*) и ингибитора сериновой протеазы Kazal тип I (*SPINK1*)) выявило, что сочетание низкого уровня *PTEN* с высокой экспрессией *CRISP3* характерно для РПЖ группы плохого прогноза развития биохимического рецидива [18].

Более того, было показано, что использование тестирования *PCA3* (порог биопсии 25) или *TMPRSS2-ERG* (порог биопсии 10) позволяет избежать соответственно 55,4 и 64,7 % повторных биопсий без существенного влияния на показатели 10-летней выживаемости [19].

На текущий момент определение уровней *PCA3* и *TMPRSS2-ERG* в ткани ПЖ считается важным при необходимости уточнения патоморфологического диагноза. Выявление гиперэкспрессии указанных генов в материале первичной биопсии с отрицательным результатом свидетельствует о высокой вероятности наличия РПЖ и является показанием для выполнения повторной биопсии. Этот метод позволяет уменьшить число биопсий и, соответственно, оптимизировать экономические затраты при диагностике РПЖ, в том числе в ходе программ массового скрининга [20].

### Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство протеаз, принимающих участие в росте, инвазии и метастазировании рака.

Соответственно, природные тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП), регулируя активность ММП, могут способствовать росту опухоли и ее злокачественной трансформации. В связи с этим исследование ММП и ТИМП представляет интерес при ряде опухолей. В частности, при раке кожи было выявлено, что ТИМП могут стимулировать рост опухоли и злокачественную трансформацию, а также ингибировать апоптоз опухолевых клеток [21].

Было показано, что выявление низкого уровня ММП-2 и высокого уровня ММП-7 в плазме крови больных раком желудка является фактором низкой общей

выживаемости. При этом высокий уровень ММП-7 в плазме крови оказался независимым фактором неблагоприятного прогноза у больных раком желудка [22].

При почечно-клеточном раке высокие уровни ММП-7 и ММП-8 в сыворотке крови первичных больных — факторы неблагоприятного прогноза. Также отмечена тенденция к снижению выживаемости при высоком уровне ТИМП-1 и низком уровне ММП-2 [23].

Также изучались мутации в экзоне 7 гена *PPP6C* и были выявлены различия в их биологическом эффекте на опухоли с разным *PPP6C*-статусом при меланоме кожи [24].

Обнаружено, что ММП-1, ММП-7, ММП-11, ММП-24 и ММП-26 играют существенную роль в онкогенезе и развитии биохимического рецидива у пациентов с РПЖ [25].

### Экзосомы

Экзосомы являются маленькими пузырьками, которые секретируются клетками, содержащими клеточный белок и РНК. Исследования биологии экзосом проводятся для определения механизмов экзосомно-клеточной регуляции и изучения возможностей их применения в диагностических и терапевтических целях. Представляется перспективным использование экзосом в качестве транспортного средства для доставки лекарств. Экзосомы имеют небольшой размер, нетоксичны, а также имеют направленный характер действия. Это дает им преимущество перед другими транспортными системами. Так, показана возможность использования экзосом в комбинации таргетной иммунотерапии с химиотерапией [26].

Опухолевые клетки в большинстве случаев характеризуются аномально активным метаболизмом или активацией процесса анаэробного гликолиза, что приводит к повышению концентрации специфических белков (например, ТМ9SF4) поверхностной мембраны и, следовательно, секретируемых этими клетками экзосом. Таким образом, анализ профиля микроРНК изолированной фракции экзосом будет иметь большую диагностическую ценность по сравнению с анализом профиля общей популяции экзосом плазмы. Такие методы являются перспективными для создания систем для диагностики и мониторинга злокачественных заболеваний [27].

Для диагностических целей определяют набор белков, необходимых для функционирования экзосом, а также экзосомные белки, специфичные для конкретного типа клеток, которые отражают специализированную функцию исходной, например опухолевой, клетки. Кроме этого, липиды, содержащиеся на экзосомах, также соответствуют происхождению клеток. В настоящее время исследованы липиды экзосом опухолевых клеток, тучных клеток, ретикулоцитов, клеточной линии В-лимфоцитов и дендритных клеток человека.

Рядом авторов продемонстрирована перспективность изучения экзосом при РПЖ. Выявлено, что при анализе экспрессии генов экзосом в моче можно отличить злокачественные формы РПЖ (сумма баллов по шкале Глисона  $\geq 7$ ) от менее агрессивных форм (сумма баллов по шкале Глисона 6), а также избежать проведения биопсии в 27 % случаев [28]. Более того, дихотомический показатель EXO106 (сумма нормализованных уровней PCA3 и ERG RNA) продемонстрировал прогностическую ценность для диагностики злокачественных форм РПЖ для мужчин с уровнями ПСА, находящимися в «серой зоне» [29].

### Белок EN2, его роль в патогенезе рака

Гены *HOX* относятся к семейству гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов, которые были первоначально идентифицированы благодаря их ключевой роли в раннем развитии организма. Показано, что гены *HOX* могут определять идентичность клеток и тканей и, следовательно, помогают регулировать пролиферацию, дифференцировку и выживание этих клеток. Потенциальная роль генов *HOX* в развитии рака впервые стала очевидна из-за их частого включения в химерные, онкогенные слияния генов, которые приводили к образованию гематологических злокачественных новообразований. Впоследствии было выявлено, что нарушение регуляции генов *HOX* отмечается при злокачественных трансформациях в различных органах, что проявляется повышением их экспрессии. В настоящее время имеется огромное количество данных об экспрессии генов *HOX* при различных злокачественных новообразованиях. Данный факт создает предпосылки для разработки биомаркеров на основе повышенной продукции белков генов *HOX* как для диагностики опухолевых заболеваний, так и для прогнозирования развития злокачественной трансформации, а также ответа на лечение. Одним из характерных примеров является *Engrailed (EN) 2*, ген, который тесно связан с генами *HOX*.

Гены *EN* являются одним из членов семейства генов гомеобокса (генов, вовлеченных в онтогенез и кодирующих факторы транскрипции). Существует 5 областей гомологии *EN* со схожими функциями. В частности, ген *EN1* локализуется в хромосоме человека 2q13-q21, *EN2* — в 7q36.3.

Повышенная экспрессия белка EN2 может быть связана с развитием опухоли у взрослых людей, особенно опухолей молочной и предстательной желез, меланомы и рака яичников. Была выявлена эктопическая экспрессия EN2 в ряде клеточных линий рака молочной железы (4 линии получены из аденокарцином (MDA-MB-435S, BT-20, MDA-MB-436, MCF-7), 1 — из протоковой карциномы (BT-474) и 2 — из ткани фиброзно-кистозной молочной железы (MCF-10A и MCF-12A)) [30]. При этом перестройка и амплификации гена

не выявлялись, поэтому эктопическая экспрессия скорее всего была результатом эпигенетической модификации. Непухоловые клеточные линии молочной железы мыши начинали экспрессировать EN2 и в последующем проявляли злокачественные характеристики (сокращение времени клеточного цикла, потерю межклеточного контакта и неспособность дифференцироваться) в ответ на лактогенные гормоны. Клеточная линия индуцировала опухоли молочной железы при трансплантации в очищенные молочные железы сингенных хозяев. Также было показано, что подавление EN2 в клеточной линии рака молочной железы человека приводит к значительному снижению скорости пролиферации. При этом повышенная экспрессия белка EN2 наблюдалась как в клеточных линиях, так и в опухолевых клетках молочной железы человека при отсутствии его экспрессии нормальными клетками эпителия молочной железы.

Аналогичная ситуация была продемонстрирована на клеточных линиях рака яичника (PEO1, PEO14, PEA1, PEO4, PEO23, PEA2) и в эпителиальной ткани рака яичника [31, 32]. EN2 с чувствительностью 78 % коррелировал с низкой выживаемостью при данном заболевании.

Результаты исследований клеточных линий рака мочевого пузыря человека и образцов опухолей больных также подтверждают эти данные [33]. У пациентов с мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря EN2 в моче был выявлен с чувствительностью 82 % и специфичностью 75 %. При этом чувствительность для опухолей стадий Ta и T1 составила 71 и 76 % соответственно, а при мышечно-инвазивной форме (стадия T2) — 94 %.

Повышенная продукция EN2 также была обнаружена в клетках РПЖ человека по сравнению с нормальными эпителиальными клетками ПЖ.

Так, опосредованное малыми интерферирующими РНК подавление продукции EN2 клеточными линиями РПЖ (DU145, PC3, LNCaP) привело к снижению экспрессии PAX2 и вызывало резкое снижение пролиферации клеток РПЖ [34].

Параллельно с изучением экспрессии и продукции белков EN и их влияния на опухолевые клетки активно исследовалась роль гиперметилирования генов *EN* при раковых заболеваниях. Было показано, что все 4 кластера генов *HOX* (подмножество гомеобоксных генов, определяющих процессы роста и дифференцировки) являются основными точками метилирования ДНК в клеточных линиях рака легкого с дополнительным гиперметилированием *EN1* и *EN2* [35]. Предполагается, что такие маркеры метилирования ДНК могут быть полезны для ранней диагностики.

Также выявлен факт метилирования 3 островков CpG в хромосомной полосе 2q14.2, в которой локализуется ген *EN1* при колоректальном раке [36].



В дальнейшем гиперметилирование *EN1* было выявлено при колоректальных опухолях. R. Mayug и соавт. обнаружили, что гиперметилирование по меньшей мере одного из проанализированных отрезков CpG (*EN1*, *SCTR*, *INHBB*) происходило при большинстве колоректальных карцином (90 %), причем метилирование *EN1* отмечено в 73 и 40 % случаев карцином и аденом соответственно [37].

Гиперметилирование *EN1* также было выявлено при астроцитоме. Так, X. Wu и соавт. показали, что гены, участвующие в развитии мозга и дифференцировке нейронов, такие как *BMP4*, *POU4F3*, *GDNF*, *OTX2*, *NEFM*, *CNTN4*, *OTP*, *SIM1*, *FYN*, *EN1*, *CHAT*, *GSX2*, *NKX6-1*, *PAX6*, *RAX* и *DLX2* часто метилируются в опухолях. Причем 7 таких локусов находились вблизи генов гомеобокса, включая кластеры *HOXC* и *HOXD*, а также гены *BARHL2*, *DLX1* и *PITX2* [38].

Аналогичные результаты по *EN1* были получены при РПЖ. Клетки РПЖ продемонстрировали локализованное гиперметилирование ДНК *EN1*, *SCTR* и *INHBB*. При этом метилирование *EN1* и *SCTR* встречалось чаще (65 и 53 % соответственно) по сравнению с метилированием *INHBB* [39].

Гиперметилирование *EN2* выявлено в клеточных линиях фолликулярной лимфомы. Метилирование ДНК было подтверждено в клеточной линии RL для *HOXA11*, *HOXD10*, *HOXB7*, *HOXC12*, *PAX6*, *LHX9*, *SFMBT2*, *EN2* и *PAX7*, а также в первичных опухолях для *HOXA11*, *HOXD10*, *PAX6* и *EN2* при отсутствии такового при доброкачественной фолликулярной гиперплазии [40].

Изложенные факты побудили исследователей активнее изучать онкогенные механизмы секретируемого белка EN2. В частности, было обнаружено, что при воздействии на клеточные линии РПЖ LNCaP и PC3 экзогенным белком EN2 увеличивалась пролиферация клеток, усиливалась способность нормоподобной клеточной линии ПЖ (RWPE1) и клеточной линии РПЖ (PC3) мигрировать, а также повышалась секреция ПСА из клеток LNCaP [41].

Поскольку хроническое воспаление играет важную роль в развитии РПЖ, изучалась ассоциация повышенной продукции провоспалительных цитокинов интерлейкина (IL) 8 и 6 с экспрессией EGR3 (Early Growth Response 3). Выявлено, что продукция EGR3 сильно коррелирует с экспрессией IL8 и IL6 при прогрессировании РПЖ [42, 43].

E. Gómez-Gómez и соавт. обнаружили сверхэкспрессию *EN2* в 2 когортах тканей РПЖ и линиях опухолевых клеток. Уровни EN2 в моче больных РПЖ также были повышены. Более того, обработка клеток линий LNCaP/22Rv1/PC3 EN2 увеличивала их пролиферацию, усиливала миграцию в клетках RWPE1/PC3 и секрецию ПСА в клетках LNCaP. При этом обработка EN2 регулировала активность андрогеновых рецепторов

(полноразмерных и сплайсинговых вариантов) в чувствительных к андрогенам клетках 22Rv1. Таким образом, авторами сделан вывод о потенциальной полезности EN2 в качестве неинвазивного диагностического биомаркера РПЖ, а также о необходимости его дальнейшего изучения для разработки новых терапевтических средств при РПЖ [44].

Все эти данные легли в основу исследований возможностей использования EN2 в качестве биомаркера в диагностике РПЖ.

### EN2 как диагностический маркер рака предстательной железы

В ряде исследований показано, что семейство генов гомеодомениальных транскрипционных факторов может играть важную роль в патогенезе РПЖ и, таким образом, быть использовано для диагностики, прогноза и лечения этой патологии [45].

При этом данные по показателям чувствительности и специфичности теста крайне разнятся. E. Killick и соавт. изучили 413 образцов мочи от 413 носителей мутации *BRCA1* и *BRCA2* и 140 лиц контрольной группы при проведении скрининга. РПЖ был выявлен у 21 мужчины. EN2 в моче определялся ИФА-методом и продемонстрировал чувствительность 66,7 %, специфичность 89,3 %. Достоверных различий в уровнях EN2 в соответствии с генетическим статусом или со шкалой Глисона не отмечено [46].

Была выявлена сильная статистическая связь уровня EN2 в моче с объемом злокачественной опухоли ПЖ с помощью линейной регрессии ( $p = 0,006$ ). Более высокие уровни EN2 коррелировали также со стадией опухоли T1 по сравнению с T2 ( $p = 0,027$ ). При этом такая корреляция отсутствовала при оценке уровня ПСА [47, 48].

J. Do Carmo Silva и соавт. не отменили преимуществ EN2 перед ПСА, причем проведение пальцевого ректального исследования также не повлияло на диагностическую и прогностическую ценность EN2 [49].

Метаанализ, проведенный M.I.D. Rosa и соавт. и включивший 17 публикаций, выявил совокупную чувствительность 66 % и специфичность 89 %, в связи с чем авторы не рекомендуют EN2 для диагностики или скрининга РПЖ [50].

До сих пор остается дискуссионным вопрос об обнаружении EN2 в моче при различных техниках ее сбора.

Имеется целый ряд исследований, посвященных различным способам сбора мочи. Показано заметное увеличение EN2 в моче после массажа ПЖ. Так, M.P. Marszall и соавт. изучили 66 образцов мочи (по 33 образца до и после массажа). Продemonстрировано отчетливое влияние массажа ПЖ на уровни EN2, связанное с суммой баллов по шкале Глисона и стадией опухоли [51]. В то же время R. Morgan и соавт. показали, что на образцах мочи 82 больных РПЖ и 102 здоровых лиц без предварительного

массажа ПЖ для EN2 чувствительность составляет 66 % и специфичность — 88,2 % [52].

Различия в данных по чувствительности теста также могут быть связаны с техникой сбора мочи. Выделяют несколько протоколов сбора мочи.

Так, для каждой техники сбора мочи имеются свои преимущества и недостатки (для 24-часовой, первой утренней мочи и точечного сбора мочи). В частности, 24-часовой сбор неудобен для пациента и может привести к деградации и загрязнению белка в моче, особенно в результате лизиса взвешенных клеток. Сбор одной пробы удобнее для пациентов, его легче стандартизировать, и он позволяет быстрее обрабатывать и хранить образцы. При этом первая утренняя моча обеспечивает наименьшую вариабельность концентрации белка. При втором утреннем и случайном точечном сборе мочи наблюдается несколько более высокая вариабельность, но такой сбор сводит к минимуму время, проведенное в мочевом пузыре, в котором может произойти усиленный протеолиз [53].

Нестабильность белковых биомаркеров и их низкая концентрация в жидкостях организма, а также подверженность влиянию факторов среды диктуют необходимость поиска высокочувствительного биосенсора. За последние несколько десятилетий был разработан ряд многообещающих биосенсоров, основанных на специфическом распознавании белковых биомаркеров, направленных на повышение эффективности диагностики РПЖ.

Также используются разные иммунологические методы выявления белка EN2. В основном применяют

ИФА с коммерческими и некоммерческими наборами. К более чувствительным тестам можно отнести биосенсоры на основе графеновых наноматериалов [54]. S. Lee и соавт. предложили использовать электробиохимический биосенсор. Ими был определен расчетный предел обнаружения (5,62 фМ). Применимость биосенсора была проверена с использованием нескольких белков и искусственной мочи. Причем сигналы импеданса увеличивались в только случае EN2, что свидетельствует о высокой селективности системы к EN2 [55].

В то же время современные методы иммунохроматографического анализа также являются перспективными для разработки методов экспресс-диагностики.

### Заключение

Несмотря на продолжающуюся дискуссию, появляется все больше доказательств потенциальной полезности идентификации EN2 в моче в качестве диагностического биомаркера и точного индикатора объема опухоли при РПЖ. EN2 может повышаться в моче при РПЖ и раке мочевого пузыря, однако эти заболевания можно дифференцировать по положительному анамнезу и повышению уровня ПСА. Существенный разброс в показателях чувствительности различных тестов обусловлен нестабильностью белков в биологических жидкостях и влиянием на них множества факторов. В связи с этим проводится активный поиск как оптимальных техник сбора биоматериала, так и высокочувствительных сенсорных систем.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/prostate-cancer-statistics>.
2. Ишкинин Е.И., Нурғалиев Н.С., Жылкайдарова А.Ж. и др. Молекулярно-генетические способы диагностики агрессивных форм рака предстательной железы. Медицина (Алматы) 2018;9(195):37–40. DOI: 10.31082/1728-452X-2018-195-9-37-40. [Ishkinin E.I., Nurgaliev N.S., Zhylkaidarova A.Zh. et al. Molecular genetic methods for the diagnosis of aggressive forms prostate cancer. Meditsina (Almaty) = Medicine (Almaty) 2018;9(195):37–40. (In Russ.)].
3. Стрыгина Е.А., Медведев В.Л., Курзанов А.Н. Диагностические и прогностические маркеры рака предстательной железы. Современные проблемы науки и образования 2016;2. Доступно по: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24439>. [Strygina E.A., Medvedev V.L., Kurzanov A.N. Diagnostic and prognostic markers in prostate cancer. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education 2016;2. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24439>. (In Russ.)].
4. Loeb S., Catalona W.J. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. Ther Adv Urol 2014;6(2):74–7. DOI: 10.1177/1756287213513488.
5. Guazzoni G., Nava L., Lazzeri M. et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA significantly improves the prediction of prostate cancer at initial extended prostate biopsies in patients with total PSA between 2.0 and 10 ng/ml: results of a prospective study in a clinical setting. Eur Urol 2011;60:214–22. DOI: 10.1016/j.eururo.2011.03.052.
6. Scattoni V., Lazzeri M., Lughezzani G. et al. Head-to-head comparison of prostate health index and urinary PCA3 for predicting cancer at initial or repeat biopsy. J Urol 2013;190(2):496–501. DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.3184.
7. Loeb S., Sanda M.G., Broyles D.L. et al. The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. J Urol 2015;193(4):1163–9. DOI: 10.1016/j.juro.2014.10.121.
8. Boegemann M., Stephan C., Cammann H. et al. The percentage of prostate-specific antigen (PSA) isoform [–2]proPSA and the Prostate Health Index improve the diagnostic accuracy for clinically relevant prostate cancer at initial and repeat biopsy compared with total PSA and percentage free PSA in men aged ≤65 years. BJU Int 2016;117(1):72–9. DOI: 10.1111/bju.13139.
9. Sokoll L.J., Sanda M.G., Feng Z. et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research

- Network study of [–2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(5):1193–200. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0007.
10. Truong M., Yang B., Jarrard D.F. Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol* 2013;189:422–9. DOI: 10.1016/j.juro.2012.04.143.
  11. de la Taille A., Irani J., Graefen M. et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 2011;185:2119–25. DOI: 10.1016/j.juro.2011.01.075.
  12. Wei J.T., Feng Z., Partin A.W. et al. Can urinary PCA3 supplement PSA in the early detection of prostate cancer? *J Clin Oncol* 2014;32:4066–7. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.8505.
  13. Auprich M., Augustin H., Budäus L. et al. A comparative performance analysis of total prostate-specific antigen, percentage free prostate-specific antigen, prostate-specific antigen velocity and urinary prostate cancer gene 3 in the first, second and third repeat prostate biopsy. *BJU Int* 2012;109:1627–35. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10584.x.
  14. Тороповский А.Н., Никитин А.Г., Павлова О.Н. и др. Перспективы совершенствования диагностики рака предстательной железы на основе анализа экспрессии гена *PCA3*. *Урология* 2019;(2):82–6. DOI: 10.18565/urology.2019.2.82-86. [Toropovskiy A.N., Nikitin A.G., Pavlova O.N. et al. Perspectives of improvement of the diagnosis of prostate cancer based on analysis of *PCA3* gene expression. *Urologiya = Urology* 2019;(2):82–6. (In Russ.)].
  15. Kar A., Gutierrez-Hartmann A. Molecular mechanisms of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 2013;48(6):522–43. DOI: 10.3109/10409238.2013.838202.
  16. Sanguedolce F., Cormio A., Brunelli M. et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript as a biomarker for prostate cancer: literature review. *Clin Genitourinary Cancer* 2016;14(2):117–21. DOI: 10.1016/j.clgc.2015.12.001.
  17. Fallahabadi Z.R., Daloi M., Mahdian R. et al. Frequency of PTEN alterations, TMPRSS2-ERG fusion and their association in prostate cancer. *Gene* 2016;575(2):755–60. DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.068.
  18. Noh B.J., Sung J.Y., Kim Y.W. et al. Prognostic value of ERG, PTEN, CRISP3 and SPINK1 in predicting biochemical recurrence in prostate cancer. *Oncol Lett* 2016;11(6):3621–30. DOI: 10.3892/ol.2016.4459.
  19. Merdan S., Tomlins S.A., Barnett C. et al. Assessment of long term outcomes associated with urinary prostate cancer antigen 3 and *TMPRSS2:ERG* gene fusion at repeat biopsy. *Cancer* 2015;121(22):4071–9. DOI: 10.1002/cnrc.29611.
  20. 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 и клиническая урология* 2015;(2):30–6. [Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Efremov G.D. et al. The first Russian experience of using PCA3 and TMPRSS2-ERG for prostate cancer diagnosis. *Экспериментальная и клиническая урология = Experimental and Clinical Urology* 2015;(2):30–6. (In Russ.)].
  21. Масляков В.В., Гребнев Д.Ю., Прохоренко И.О. Динамика металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при базальноклеточном раке кожи в процессе оперативного лечения. *Вестник медицинского института «Реавиз»* 2018;(4):101–5. [Maslyakov V.V., Grebnev D.Yu., Prokhorenko I.O. Changes in the levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with basal cell skin carcinoma in response to surgical treatment. *Vestnik meditsinskogo instituta «Reaviz» = Bulletin of Medical Institute «Reaviz»* 2018;(4):101–5. (In Russ.)].
  22. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Иваницков А.А. и др. Клиническое значение матриксных металлопротеиназ в плазме крови больных раком желудка. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2018;(9):347–51. DOI: 10.1007/s10517-019-04353-y. [Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Ivannikov A.A. et al. Clinical significance of matrix metalloproteinases in blood plasma of patients with gastric cancer. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2018;(9):347–51. (In Russ.)].
  23. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Алферов А.А. и др. Прогностическое значение матриксных металлопротеиназ 2, 7, 8, 9 и их тканевого ингибитора 1-го типа в сыворотке крови больных раком почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2020;168:673–6. DOI: 10.1007/s10517-020-04778-w. [Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Alferov A.A. et al. Prognostic role of matrix metalloproteinases 2, 7, 8, 9 and their type 1 tissue inhibitor in blood serum of patients with kidney cancer. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2020;168:673–6. (In Russ.)].
  24. Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Внутриклеточная экспрессия матриксной металлопротеиназы 2 и ее зависимость от PPP6C-мутационного статуса при меланоме кожи. *Российский журнал кожных и венерических болезней* 2018;(1):4–9. DOI: 10.18821/1560-9588-2018-21-1-4-9. [Aksenenko M.B., Ruksha T.G. Expression of nuclear matrix metalloproteinase 2 in patients with cutaneous melanoma depending on the availability of mutations in the PPP6C genes. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases* 2018;(1):4–9. (In Russ.)].
  25. Geng X., Chen C., Huang Y. et al. The prognostic value and potential mechanism of matrix metalloproteinases among prostate cancer. *Int J Med Sci* 2020;17(11):1550–60. DOI: 10.7150/ijms.46780.
  26. Тихонова М.В., Карачунский А.И., Пospelov В.И. и др. Перспективы использования экзосом опухолевых клеток в диагностике, мониторинге и терапии злокачественных заболеваний. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2017;(2):40–5. DOI: 10.17650/2311-1267-2017-4-2-40-45. [Tikhonova M.V., Karachunskiy A.I., Pospelov V.I. et al. Prospects of exosomes use of tumor cells in the diagnosis, monitoring and therapy of malignant diseases. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2017;(2):40–5. (In Russ.)].
  27. Малек А.В., Самсонов Р.Б., Къези А. Перспективы разработки методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом, секретируемых опухолевыми клетками. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;4(14):9–18. [Malek A.V., Samsonov R.B., Chiesi A. Development of cancer diagnostics and monitoring methods based on analysis of tumor-derived exosomes. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;4(14):9–18. (In Russ.)].
  28. McKiernan J., Donovan M.J., O'Neill V. et al. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy. *JAMA Oncology* 2016;2:882–9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0097.
  29. Donovan M.J., Noerholm M., Bentink S. et al. A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2015;18:370–5. DOI: 10.1038/pcan.2015.40.
  30. Martin N.L., Saba-El-Leil M.K., Sadekova S. et al. EN2 is a candidate oncogene in human breast cancer. *Oncogene* 2005;24(46):6890–901. DOI: 10.1038/sj.onc.1208840.
  31. Michael A., Riley C., Boake S. et al. EN2: a candidate antigen for

- the development of targeted therapies in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2011;29. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15\_suppl.e15528.
32. McGrath S.E., Annels N., Madhuri T.K. et al. Engrailed-2 (EN2) – a novel biomarker in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2018;18:943. DOI: 10.1186/s12885-018-4816-5.
  33. Morgan R., Bryan R.T., Javed S. et al. Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. *Eur J Cancer* 2013;49(9):2214–22. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.01.019.
  34. Bose S.K., Bullard R.S., Donald C.D. Oncogenic role of engrailed-2 (EN-2) in prostate cancer cell growth and survival. *Transl Oncogenomics* 2008;3:37–43. DOI: 10.4137/TOG.S369.
  35. Rauch T., Wang Z., Zhang X. et al. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(13):5527–32. DOI: 10.1073/pnas.0701059104.
  36. Karpinski P., Ramsey D., Grzebierniak Z. et al. The CpG island methylator phenotype correlates with long-range epigenetic silencing in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* 2008;6(4):585–91. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2158.
  37. Mayor R., Casadomé L., Azuara D. et al. Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer* 2009;100(10):1534–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605045.
  38. Wu X., Rauch T.A., Zhong X. et al. CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res* 2010;70(7):2718–27. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3631.
  39. Devaney J., Stirzaker C., Qu W. et al. Epigenetic deregulation across chromosome 2q14.2 differentiates normal from prostate cancer and provides a regional panel of novel DNA methylation cancer biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(1):148–59. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0719.
  40. Bennett L.B., Schnabel J.L., Kelchen J.M. et al. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48(9):828–41. DOI: 10.1002/gcc.20687.
  41. Cunningham D., You Z. *In vitro* and *in vivo* model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* 2015;2(1):e17. DOI: 10.14440/jbm.2015.63.
  42. Baron V.T., Pio R., Jia Z. et al. Early Growth Response 3 regulates genes of inflammation and directly activates IL6 and IL8 expression in prostate cancer. *Br J Cancer* 2015;112:755–64. DOI: 10.1038/bjc.2014.622.
  43. Pio R., Jia Z., Baron V.T. et al. Early growth response 3 (Egr3) is highly over-expressed in non-relapsing prostate cancer but not in relapsing prostate cancer. *PLoS One* 2013;8:e54096. DOI: 10.1371/journal.pone.0054096.
  44. Gómez-Gómez E., Jiménez-Vacas J.M., Pedraza-Arévalo S. et al. Oncogenic role of secreted Engrailed Homeobox 2 (EN2) in prostate cancer. *J Clin Med* 2019;8(9):1400. DOI: 10.3390/jcm8091400.
  45. Cantile M., Franco R., Schiavo G. et al. The *HOX* genes network in uro-genital cancers: mechanisms and potential therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2011;18:4872–84. DOI: 10.2174/092986711797535182.
  46. Killick E., Morgan R., Launchbury F. et al. Role of Engrailed-2 (EN2) as a prostate cancer detection biomarker in genetically high risk men. *Scic Rep* 2013;3:1–5. DOI: 10.1038/srep02059.
  47. Pandha H., Sorensen K.D., Orntoft T.F. et al. Urinary engrailed-2 (EN2) levels predict tumour volume in men undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *BJU Int* 2012;110:E287–92. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11208.x.
  48. Pandha H., Javed S., Sooriakumaran P. et al. Correlation of urinary engrailed-2 levels to tumour volume and pathological stage in men undergoing radical prostatectomy. *J Cancer Ther* 2013;24:726–33. DOI: 10.4236/jct.2013.43089.
  49. Do Carmo Silva J., Vésely S., Novak V. et al. Is Engrailed-2 (EN2) a truly promising biomarker in prostate cancer detection? *Biomarkers* 2020;25(1):34–9. DOI: 10.1080/1354750X.2019.1690047.
  50. Rosa M.I.D., Dondossola E.R., Alexandre M.C.M. et al. Urinary EN-2 to predict prostate cancer: systematic review and meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 2017;63(7):656–61. DOI: 10.1590/1806-9282.63.07.656.
  51. Marszall M.P., Sroka W., Adamowski M. et al. Engrailed-2 protein as a potential urinary prostate cancer biomarker: a comparison study before and after digital rectal examination. *Eur J Cancer Prev* 2015;24:51–6. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000046.
  52. Morgan R., Boxall A., Bhatt A. et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:1090–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2410.
  53. Thomas C.E., Sexton W., Benson K. et al. Urine collection and processing for protein biomarker discovery and quantification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:953–9. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0069.
  54. Xu L., Wen Y., Pandit S. et al. Graphene-based biosensors for the detection of prostate cancer protein biomarkers: a review. *BMC Chem* 2019;13(1):112. DOI: 10.1186/s13065-019-0611-x.
  55. Lee S., Jo H., Her J. et al. Ultrasensitive electrochemical detection of engrailed-2 based on homeodomain-specific DNA probe recognition for the diagnosis of prostate cancer. *Biosens Bioelectron* 2015;66:32–8. DOI: 10.1016/j.bios.2014.11.003.

#### Вклад авторов

A.C. Тарабаева: написание текста рукописи;

A.B. Жубантурлиева, И.М. Охас: сбор, анализ и систематизация публикаций по теме статьи.

#### Authors' contributions

A.S. Tarabayeva: article writing;

A.B. Zhubanturliyeva, I.M. Okhas: collection, analysis and systematization of publications on the topic of the article.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

A.C. Тарабаева / A.S. Tarabayeva: <https://orcid.org/0000-0002-2851-2396>

A.B. Жубантурлиева / A.B. Zhubanturliyeva: <https://orcid.org/0000-0002-3841-938X>

И.М. Охас / I.M. Okhas: <https://orcid.org/0000-0002-8290-5318>



**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.  
**Financing.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Статья поступила: 14.05.2020. Принята к публикации: 09.08.2020.  
Article submitted: 14.05.2020. Accepted for publication: 09.08.2020.