

Анализ микроРНК в ПСМА-положительной фракции внеклеточных нановезикул плазмы при раке предстательной железы

Л.М. Забегина^{1,2}, Н.С. Никифорова¹, И.В. Назарова¹, М.С. Князева^{1,2}, Е.В. Цырлина¹, С.А. Рева³, А.К. Носов¹, А.М. Малек^{1,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»; Россия, 195251 Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29;

³ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

⁴ООО «Онко-система»; Россия, 121205 Москва, территория инновационного центра «Сколково», ул. Нобеля, 7

Контакты: Лидия Михайловна Забегина lidusikza@yandex.ru

Введение. Циркулирующие в плазме микроРНК – перспективные маркеры для диагностики онкологических заболеваний, включая рак предстательной железы. Однако существующие технологии анализа циркулирующих микроРНК не обеспечивают необходимой диагностической значимости. Одним из возможных путей ее повышения является выделение мембранных внеклеточных нановезикул (ВНВ), секретируемых клетками предстательной железы. Можно предполагать, что анализ микроРНК в такой простатспецифической фракции ВНВ точнее отражает процесс развития рака предстательной железы и имеет больший диагностический потенциал.

Цель исследования – разработка метода выделения микроРНК из простатспецифической фракции ВНВ плазмы и оценка его диагностического потенциала.

Материалы и методы. В качестве простатспецифического маркера ВНВ был использован простатический специфический мембранный антиген (ПСМА). Общая популяция ВНВ плазмы была выделена с помощью двухфазной полимерной системы. Для выделения ПСМА-положительных (ПСМА⁽⁺⁾) ВНВ использовались суперпарамагнитные частицы, поверхность которых была функционализирована ДНК-аптамером, связывающим ПСМА. Анализ эффективности выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ проведен методами проточной цитометрии и дот-блоттинга. РНК из ВНВ была выделена методом протеолиза, анализ микроРНК выполнен с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Для оценки диагностической значимости метода были использованы образцы плазмы пациентов с раком предстательной железы ($n = 33$) и здоровых доноров (группа контроля) ($n = 30$).

Результаты. Разработана технология выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ плазмы и оценена ее эффективность. Показано, что анализ потенциально маркерных микроРНК в ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ более эффективен, чем в общей популяции ВНВ, и позволяет детектировать статистически значимую разницу концентрации при сравнении групп рака предстательной железы и контроля.

Заключение. Разработанная технология выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ может быть использована при создании новых методов диагностики рака предстательной железы.

Ключевые слова: рак предстательной железы, диагностика, скрининг, внеклеточные нановезикулы, микроРНК

Для цитирования: Забегина Л.М., Никифорова Н.С., Назарова И.В. и др. Анализ микроРНК в ПСМА-положительной фракции внеклеточных нановезикул плазмы при раке предстательной железы. Онкоурология 2021;17(4):65–75. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-4-65-75.

Analysis of miRNAs in the PSMA-positive fraction of plasma nano-sized extracellular vesicles in patients with prostate cancer

L.M. Zabegina^{1,2}, N.S. Nikiforova¹, I.V. Nazarova¹, M.S. Knyazeva^{1,2}, E.V. Tsyrlina¹, S.A. Reva³, A.K. Nosov¹, A.M. Malek^{1,4}

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint-Petersburg 197758, Russia;

²Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University; 29 Politekhnicheskaya St., Saint-Petersburg 195251, Russia;³I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint-Petersburg 197022, Russia;⁴Onko-sistema; 7 Nobelya St., territory of Skolkovo Innovation Center, Moscow 121205, Russia**Contacts:** Lidiya Mihaylovna Zabagina lidusikza@yandex.ru

Background. MicroRNAs (miRNAs) circulating in plasma are promising markers for the diagnosis of malignant tumors, including prostate cancer. However, the existing techniques used for their detection fail to ensure sufficient diagnostic accuracy. One of the possible ways to improve it is to isolate membrane nano-sized extracellular vesicles (nsEVs) secreted by prostate cells. Presumably, the analysis of miRNAs originating from this prostate-specific fraction of nsEVs more accurately reflects the process of prostate cancer development and has a greater diagnostic potential.

Objective: to develop the method of miRNA isolation from the prostate-specific fraction of plasma nsEVs and to evaluate its performance characteristics.

Materials and methods. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) was used as a prostate-specific marker of nsEVs. The total population of plasma nsEVs was isolated using a two-phase polymer system. To isolate PSMA-positive (PSMA⁽⁺⁾) nsEVs, we used superparamagnetic particles with PSMA-binding DNA aptamer immobilized on their surface. The efficacy of PSMA⁽⁺⁾ nsEV isolation was assessed using flow cytometry and dot-blotting. RNA from nsEVs was isolated using proteolysis; miRNA analysis was performed using reverse transcription polymerase chain reaction. Plasma samples collected from patients with prostate cancer ($n = 33$) and healthy donors (controls) ($n = 30$) were used to evaluate the diagnostic parameters of the method.

Results. We developed the method of PSMA⁽⁺⁾ nsEV isolation from plasma and estimated its performance characteristics. We found that measurement of potential miRNA markers in PSMA⁽⁺⁾ nsEVs was more effective than its measurement in the entire nsEV population and could distinguish between patients with prostate cancer and controls.

Conclusion. The new technique of PSMA⁽⁺⁾ nsEV isolation can be used for the development of novel diagnostic methods for the diagnosis of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, diagnosis, screening, nano-sized extracellular vesicles, microRNAs

For citation: Zabagina L.M., Nikiforova N.S., Nazarova I.V. et al. Analysis of miRNAs in the PSMA-positive fraction of plasma nano-sized extracellular vesicles in patients with prostate cancer. Onkourologiya = Cancer Urology 2021;17(4):65–75. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-4-65-75.

Введение

Диагностика рака предстательной железы. В связи с увеличением средней продолжительности жизни населения и истинной высокой частотой развития рака предстательной железы (РПЖ) у мужчин, по сравнению с опухолями других локализаций, лечение распространенных и метастатических форм РПЖ (особенно кастрационно-резистентного) при поздней диагностике стало значимой социальной проблемой. С начала 1980-х годов в практику введены методы скрининга РПЖ, основанные на оценке концентрации в плазме крови различных простатических специфических протеаз (простатического специфического антигена (ПСА) [1], hK2 [2]), их фракций и сочетаний (индекс здоровья предстательной железы, тест 4K-score) [3]. Однако популяционный эффект применения этих методов имеет неоднозначные оценки [4]. Так, анализ данных Популяционного ракового регистра Санкт-Петербурга выявляет устойчивый рост стандартизированного показателя заболеваемости РПЖ (C61) с 12,3 (в 1980 г.) до 28,3 (в 2008 г.) случая на 100 тыс. мужского населения [5]. Причем доля диагнозов, поставленных при I–II стадиях заболевания, увеличилась с 35,3 % (в 2002–2005 гг.) до 44 % (в 2006–2008 гг.), а доля диагнозов, поставленных при III–IV стадиях, снизилась с 53,6 до 43,5 %. Согласно этим данным

эффективность диагностики РПЖ, преимущественно основанной на оценке циркулирующих форм простат-специфических протеаз, выросла. В то же время показатель относительной 5-летней выживаемости в 1994 г. составлял 66,8 %, в 2004 г. — 68,1 % при колебаниях от 50,5 до 78,1 % за 20-летний период наблюдения [6]. Эти данные отражают относительно стабильный уровень эффективности лечения.

Среди возможных причин, по которым раннее выявление РПЖ не увеличило выживаемость пациентов, можно отметить известный факт низкой диагностической специфичности методов анализа концентрации циркулирующих простатспецифических протеиназ. Поэтому поиск не просто тканеспецифических молекул, а маркеров неопластической трансформации клеток предстательной железы может привести к разработке более эффективных методов скрининга РПЖ или алгоритмов стратификации пациентов с повышенными показателями ПСА.

МикроРНК — короткие (20–22 нуклеотидов) регуляторные молекулы РНК, которые участвуют в процессе посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. К настоящему времени описано более 3 тыс. специфических молекул микроРНК, в клетках различных тканей обычно детектируется характерный набор (pattern) нескольких сотен так называемых мажорных

молекул. Экспрессионный профиль этих молекул может иметь специфические изменения, ассоциированные с различными заболеваниями. Так, изменение профиля микроРНК в клетках предстательной железы в процессе их малигнизации и развития РПЖ детально исследовано, а анализ этих изменений имеет очевидный диагностический потенциал [7]. Несмотря на то что основная (известная) биологическая функция микроРНК реализуется внутри клеток, эти молекулы присутствуют в межклеточном пространстве и могут быть выделены из большинства биологических жидкостей. Циркулирующие с плазмой микроРНК рассматриваются как один из наиболее перспективных маркеров РПЖ [8], что доказано результатами десятков зарубежных и ряда отечественных исследований [9, 10]. Однако в плазме циркулируют молекулы, секретируемые всеми клетками организма. Поэтому неопластическая трансформация клеток предстательной железы и изменение профиля микроРНК в этих клетках вряд ли приводят к существенному изменению состава микроРНК в объеме циркулирующей плазмы, по крайней мере на ранних этапах развития РПЖ [11]. Повысить диагностический потенциал такого анализа можно, например, разработав способ выделения микроРНК, секретируемых клетками предстательной железы. Поскольку сами молекулы микроРНК имеют универсальную для всех клеток организма структуру, то специфичность выделения отдельных популяций этих молекул из плазмы может быть обеспечена путем выделения мультимолекулярных комплексов, содержащих тканеспецифические компоненты и микроРНК.

Внеклеточные нановезикулы. Популяция циркулирующих микроРНК представлена несколькими фракциями: микроРНК, ассоциированные с белками (компонентами комплекса RISC), микроРНК в составе комплексов циркулирующих липопротеинов и микроРНК в составе внеклеточных нановезикул (ВНВ) [12]. Везикулярные микроРНК рассматриваются как наиболее перспективный диагностический маркер. В частности, тест, основанный на анализе микроРНК и других компонентов ВНВ мочи (ExoDx Prostate (IntelliScore)), показал свою эффективность диагностики для пациентов в возрасте старше 50 лет с уровнем ПСА 2–10 нг/мл [13]. Оценка состава микроРНК в ВНВ мочи и спермы позволила с точностью 87,5 % (площадь под ROC-кривой (AUC) 0,857) стратифицировать пациентов с агрессивной и латентной формой РПЖ [14]. МикроРНК в составе ВНВ плазмы также активно исследуются как потенциальные маркеры РПЖ [15]. Однако результаты таких исследований пока относительно скромные. Так, показатель AUC при оценке диагностической значимости везикулярной формы miR-141, miR-125a и их соотношения составил лишь 0,652, 0,691 и 0,793 соответственно [16]. Можно предположить, что в составе ВНВ мочи или спермы

относительное содержание ВНВ, секретируемых клетками предстательной железы, больше, чем в везикулах плазмы, которая имеет более комплексный состав белков, липидов, мультимолекулярных и мембранных образований. Выделение простатспецифической фракции ВНВ плазмы является нетривиальной задачей, но ее решение открывает перспективы разработки новой технологии диагностики РПЖ.

Цель исследования — разработка метода выделения микроРНК из простатспецифической фракции ВНВ плазмы и оценка его диагностического потенциала.

Материалы и методы

Биологические образцы. Образцы плазмы крови были взяты у пациентов с РПЖ ($n = 33$), получающих лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова и клинике Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Плазма здоровых доноров ($n = 30$) получена в отделении переливания крови НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Диагноз РПЖ верифицирован у всех пациентов гистологически. Критериями включения пациентов в исследование явились возраст 55–70 лет, отсутствие хронических воспалительных или метаболических заболеваний, стадия РПЖ T1–2N0M0, умеренная или низкая степень дифференцировки ткани опухоли (сумма баллов по шкале Глисона 5–7). Исследование проведено в рамках государственного задания (AAAA-A18-118032890186-5) после одобрения локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова и в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение и анализ тотальной популяции ВНВ плазмы. Кровь (5 мл) собирали в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), плазму сразу отделяли от крови путем центрифугирования при 1500 g в течение 15 мин и хранили при температуре -80°C . После размораживания плазму центрифугировали при 300 g 10 мин, при 1000 g 10 мин и при 2500 g 10 мин, затем фильтровали через фильтры с размером пор 200 нм (Minisart high flow, Sartorius, Германия). Тотальная популяция ВНВ была получена с применением двухфазной полимерной системы согласно ранее описанному протоколу [17], использовали декстран 450–650 кДа (Sigma-Aldrich, США) и полиэтиленгликоль 35 кДа (Sigma-Aldrich, США). ВНВ, выделенные из 1 мл плазмы, растворяли в 100 мкл фосфатно-солевого буфера.

Оценку размера и концентрации ВНВ плазмы проводили методом анализа траекторий наночастиц. Измерения выполняли на анализаторе NanoSight NS300 (Malvern, Великобритания). Уровень камеры 14, ползунк затвора 1259, усиление ползунка 366, пороговый уровень 5. Каждый образец прокачивали через камеру

наблюдения анализатора так, чтобы провести 5 измерений на разных микрообъемах одного и того же образца. Каждое измерение длилось 60 с, включало 1498 кадров. По результатам 5 измерений выполняли расчет средних значений размера и концентрации наночастиц в суспензии.

Анализ поверхностных маркеров ВНВ плазмы. Пробоподготовка образцов осуществлялась с помощью набора Eхо-FACS (HansaBioMed, Эстония) согласно протоколу производителя и предполагала неспецифическую ассоциацию ВНВ с поверхностью латексных микрочастиц. Детекцию экзосомальных маркеров CD63 и CD9 проводили с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC (CD63-FITC, Ab18235, Abcam, США), PE (CD9-PE, 312105, BioLegends, США), на анализаторе Cytotflex (Beckman Coulter, США), оборудованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм.

Выделение простатспецифических мембранных антиген-положительных ВНВ. Для получения простатспецифической мембранной антиген-положительной (ПСМА⁽⁺⁾) фракции ВНВ были использованы суперпарамагнитные частицы (МЧ) размером 1 мкм (Click Chemistry Tools, США). Поверхность частиц была функционализирована ДНК-аптамером (Апт) 5'>3': gaattcgcggttttcgcttttgcgttttggtcatctgcttacgatagcaatgct-DBCO через азид-алкиновое циклоприсоединение. Реакцию проводили с 1 мкл водной суспензии МЧ (1 мг/мл) и 1 мкл раствора Апт (1 рМ) в течение 1 ч при комнатной температуре. Образованный комплекс МЧ-Апт отмывали от несвязанных молекул Апт и инкубировали с общей популяцией ВНВ плазмы в течение 16 ч. Эффективность связывания комплекса МЧ-Апт и ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ проводили методом проточной цитометрии. Для этого ВНВ предварительно окрашивали липофильным красителем CM-Dil. Истощение фракции ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ в составе общей популяции ВНВ плазмы оценивали методом дот-блоттинга после нормализации содержания общего белка в сравниваемых суспензиях ВНВ методом Брэдфорда. Детекцию белков в составе суспензии ВНВ оценивали с помощью первичных антител к PSMA (Abcam 133579), CD9 (BioLegend 312102), CD63 (BioLegend 353039) и HSP70 (патент РФ 2722398), вторичных антител Goat Anti-Mouse IgG (Abcam 6789) и Goat Anti-Rabbit IgG (Abcam 7171), меченных пероксидазой хрена, и набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение и анализ микроРНК. РНК из общей популяции ВНВ и ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ выделяли с помощью протеолиза с применением набора RNAGEM (MicroGEM, Новая Зеландия). Анализ микроРНК проводили методом обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием 2 мкл смеси, полученной после протеолиза, и соответствующих наборов ALMIR (Альгимед Техно, Республика Беларусь)

согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 45 мин при температуре 25 °С. Условия ПЦР: 5 мин — 95 °С, затем 40 циклов: 5 с — 95 °С, 15 с — 60 °С. Уровень экспрессии маркерных микроРНК рассчитывали по формуле $G = 2^{(\Delta Ct)}$, где ΔCt — разность между Ct выбранной референсной микроРНК и Ct потенциально маркерной микроРНК ($\Delta Ct = Ct (miR-93) - Ct (miR-X)$).

Статистическая обработка. Обработку данных, расчеты и иллюстрации выполняли с помощью программ ImageJ, CFX Manager Software 3.1, SigmaPlot 12.0 и OriginPro 9.1. Статистическую оценку различий между анализируемыми группами проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Для оценки диагностической значимости разработанного метода использовали ROC-анализ и вычисление AUC.

Результаты

Характеристика тотальной популяции. Из всех образцов плазмы, включенных в исследование, были выделены ВНВ с использованием двухфазной полимерной системы. Детальная характеристика технологии выделения представлена ранее [17]. Выделенные ВНВ представляли собой гомогенную популяцию, размер везикул мажорной фракции составлял 90–115 нм, концентрация ВНВ при пересчете на исходный объем плазмы варьировала в диапазоне $2-6 \times 10^{11}$ /мл. На поверхностной мембране ВНВ детектировались так называемые экзосомальные маркеры — тетраспанины CD9 и CD63. Репрезентативный пример результатов анализа общей популяции ВНВ, выделенных из плазмы, представлен на рис. 1. Результаты анализа указывают на содержание в составе выделенных ВНВ фракции везикул эндосомального происхождения (экзосом).

Выделение простатспецифической фракции ВНВ. Мембранный цинксодержащий фермент глутаматкарбоксипептидаза 2-го типа, или ПСМА, экспрессируется преимущественно клетками предстательной железы. В отличие от ПСА, этот белок связан с клеточной мембраной и не секретируется. Поэтому он не применяется в качестве диагностического маркера, но может быть использован как лиганд для таргетной доставки в клетки РПЖ радиоактивных меток [18] или терапевтических препаратов [19]. Разработанная технология выделения простатспецифической фракции ВНВ была основана на предположении о том, что мембрана ВНВ, секретируемых клетками предстательной железы, также имеет в своем составе этот фермент. Это предположение основано на данных ряда публикаций [20, 21], но эффективность выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ и диагностический потенциал методов анализа этих везикул неизвестны. В рамках данного исследования была разработана технология изоляции ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ из общей популяции ВНВ плазмы, для этого использованы 6 образцов донорской плазмы. Подготовительный этап отделения

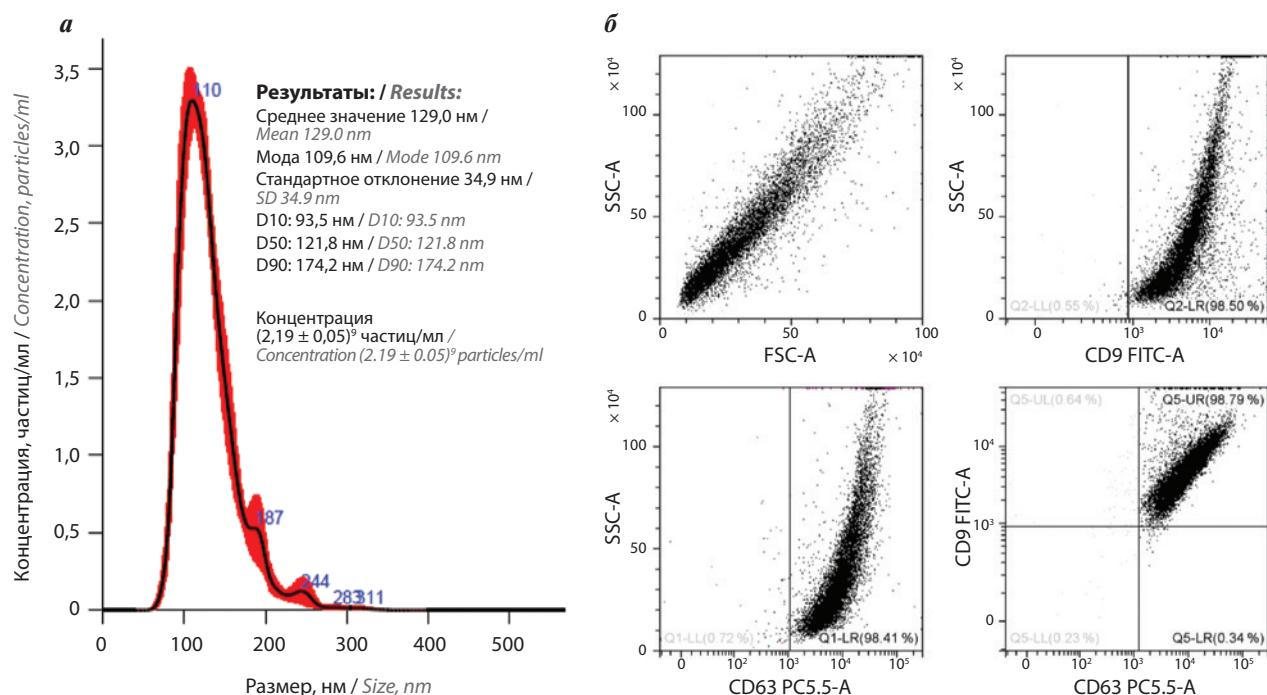


Рис. 1. Характеристика тотальной популяции внеклеточных нановезикул плазмы: а – репрезентативный результат оценки размера и концентрации (анализ траекторий наночастиц); б – репрезентативный результат анализа экспрессии поверхностных маркеров CD63, CD9 на поверхности везикул (проточная цитометрия)

Fig. 1. Characteristics of the entire population of plasma nano-sized extracellular vesicles: а – representative result of size and concentration measurement (analysis of nanoparticle trajectories); б – representative result of the analysis of expression of surface markers CD63 and CD9 on vesicles (flow cytometry)

ВНВ от других компонентов плазмы (мембранных образований, белковых комплексов, липопротеинов) был введен в целях снижения риска неспецифических межмолекулярных взаимодействий. Для сорбции ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ использовали МЧ, поверхность которых была функционализирована Апт: пространственная структура этой молекулы обеспечивала ее аффинное

взаимодействие с молекулой ПСМА и фиксацию ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ к поверхности МЧ [22]. Схема формирования комплекса МЧ-Апт и его селективного взаимодействия с ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ представлена на рис. 2. Необходимо учесть, что рис. 2 не отражает реальное содержание простатспецифических везикул в составе общей популяции ВНВ плазмы, которое можно лишь предполагать

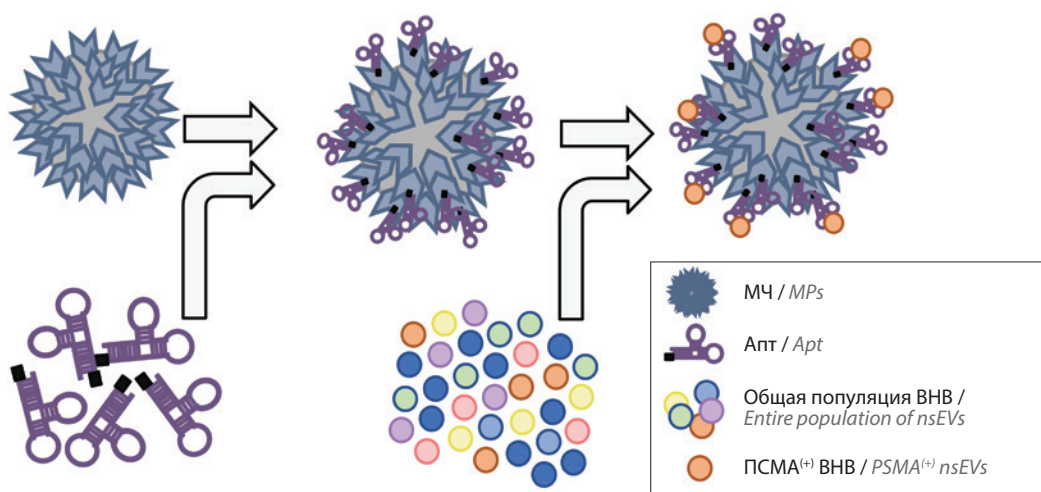


Рис. 2. Схема формирования комплекса МЧ-Апт и селективной сорбции отдельной популяции ВНВ и образования комплекса МЧ-Апт с ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ. Здесь и на рис. 3–6: МЧ – магнитные частицы; Апт – ДНК-аптамер; ВНВ – внеклеточные нановезикулы; ПСМА – простатический специфический мембранный антиген

Fig. 2. Scheme demonstrating the MP-Apt complex formation and selective sorption of a specific nsEV population and binding between MP-Apt and PSMA⁽⁺⁾ nsEVs. Here and in fig. 3–6: MPs – magnetic particles; Apt – DNA-aptamer; nsEVs – nano-sized extracellular vesicles; PSMA – prostatic-specific membrane antigen

с учетом относительной массы предстательной железы, которая не превышает 0,03 % от массы тела здорового мужчины [23, 24].

Важным этапом исследования было подтверждение факта выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ. С учетом отсутствия специфических молекулярных маркеров и крайне низкой концентрации ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ непосредственная оценка эффективности их выделения технически невыполнима, поэтому были использованы методы косвенного анализа. В случае, если разработанная система выделения достаточно эффективна и позволяет выделить значимую фракцию ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ, содержание этих везикул в общей популяции должно снижаться и каждая последующая процедура выделения должна быть менее результативна. Оценка этого эффекта была проведена 2 путями.

Во-первых, везикулы были окрашены мембранотропным флуоресцентным красителем CM-DiI, и полуколичественная оценка ВНВ, фиксированных к комплексам МЧ-Апт, после 2 последовательных процедур выделения была проведена с помощью проточной цитометрии. Сорбцию ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ на МЧ-Апт выполняли в течение 16 ч, затем комплексы удаляли, а суспензию оставшихся ВНВ инкубировали со «свежими» комплексами МЧ-Апт. Результаты представлены на рис. 3. Так, после первого выделения количество положительных комплексов МЧ-Апт, т.е. комплексов, содержащих флуоресцентно-меченные ВНВ, составило 2,55 %. Эта цифра при сравнении, например, с результатами анализа CD63⁽⁺⁾ ВНВ (98,4 %, см. рис. 1)

отражает ожидаемо низкое содержание ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ в составе ВНВ плазмы. Результат повторного выделения из того же образца — 1,75 %. Существенное снижение (<70 %) эффективности выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ указывает на истощение этой фракции ВНВ.

Во-вторых, был проведен анализ содержания нескольких везикулярных маркеров (CD63, CD9, HSP70) и ПСМА в тотальной популяции ВНВ плазмы исходно, после 1 и после 2 процедур выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ. Перед нанесением на мембрану образцы были нормализованы по содержанию общего белка. На рис. 4 представлены фотографии мембран после проведения дот-блоттинга и результаты анализа интенсивности сигнала в среде ImageJ. Так, последовательное выделение ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ значимо не изменяло содержание везикулярных маркеров CD63, CD9, HSP70 в суспензии ВНВ плазмы, при этом наблюдалось очевидное снижение содержания ПСМА. Эти результаты подтвердили факт истощения специфической популяции ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ в суспензии везикул плазмы. Так, анализ везикул, фиксированных к комплексам МЧ-Апт, и везикулярных маркеров в составе суспензии ВНВ плазмы в ходе последовательных процедур выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ подтвердил эффективность разработанной технологии.

Анализ потенциально маркерных микроРНК в составе ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ. После разработки и валидации эффективности технологии выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ эти везикулы были выделены из всех образцов, включенных в исследование. Тотальная РНК была выделена

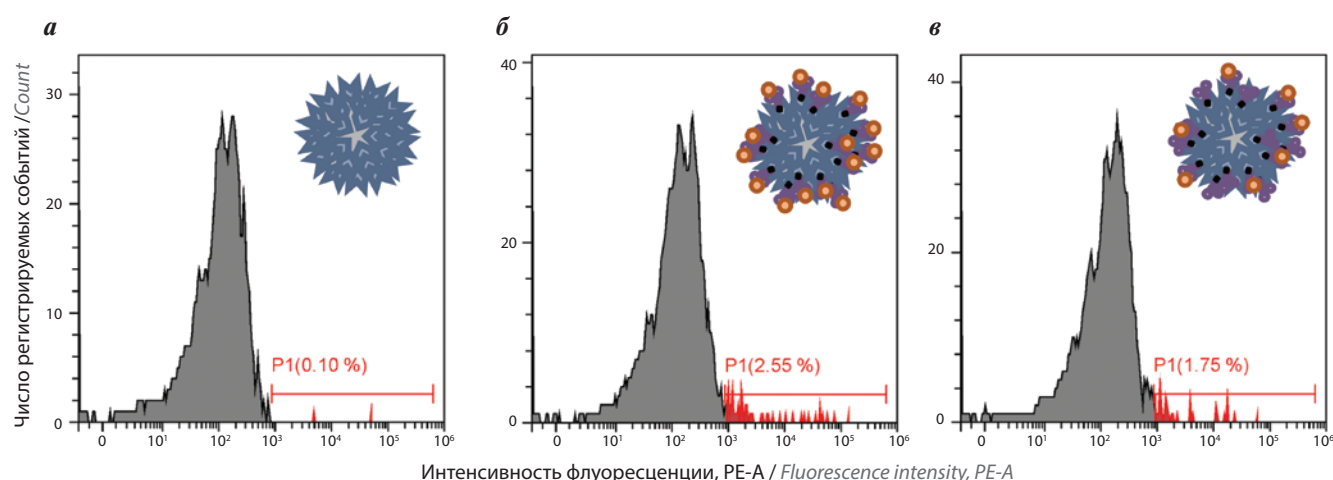


Рис. 3. Анализ интенсивности флуоресценции частиц после 2 последовательных раундов сорбции ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ (проточная цитометрия): а — МЧ до инкубации с ВНВ (отрицательный контроль); б — МЧ после одного раунда инкубации с общей популяцией ВНВ плазмы (флуоресцентный сигнал, отражающий количество адсорбированных ВНВ, детектируется на 2,55 % МЧ); в — после удаления комплексов МЧ-Апт и МЧ-Апт-ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ, суспензия ВНВ была повторно проинкубирована со свежими комплексами МЧ-Апт (флуоресцентный сигнал, отражающий количество адсорбированных ВНВ, детектируется на 1,75 % МЧ)

Fig. 3. Analysis of particle fluorescence intensity after 2 consecutive rounds of PSMA⁽⁺⁾ nsEV sorption (flow cytometry): а — MPs before incubation with nsEVs (negative control); б — MPs after one round of incubation with the entire population of plasma nsEVs (fluorescent signal reflecting the number of adsorbed nsEVs is detected in 2.55 % of MPs); в — after removing the MP-Apt and MP-Apt-PSMA⁽⁺⁾ nsEV complexes, the suspension of nsEVs was re-incubated with fresh MP-Apt complexes (fluorescent signal reflecting the number of adsorbed nsEVs is detected in 1.75 % of MPs)

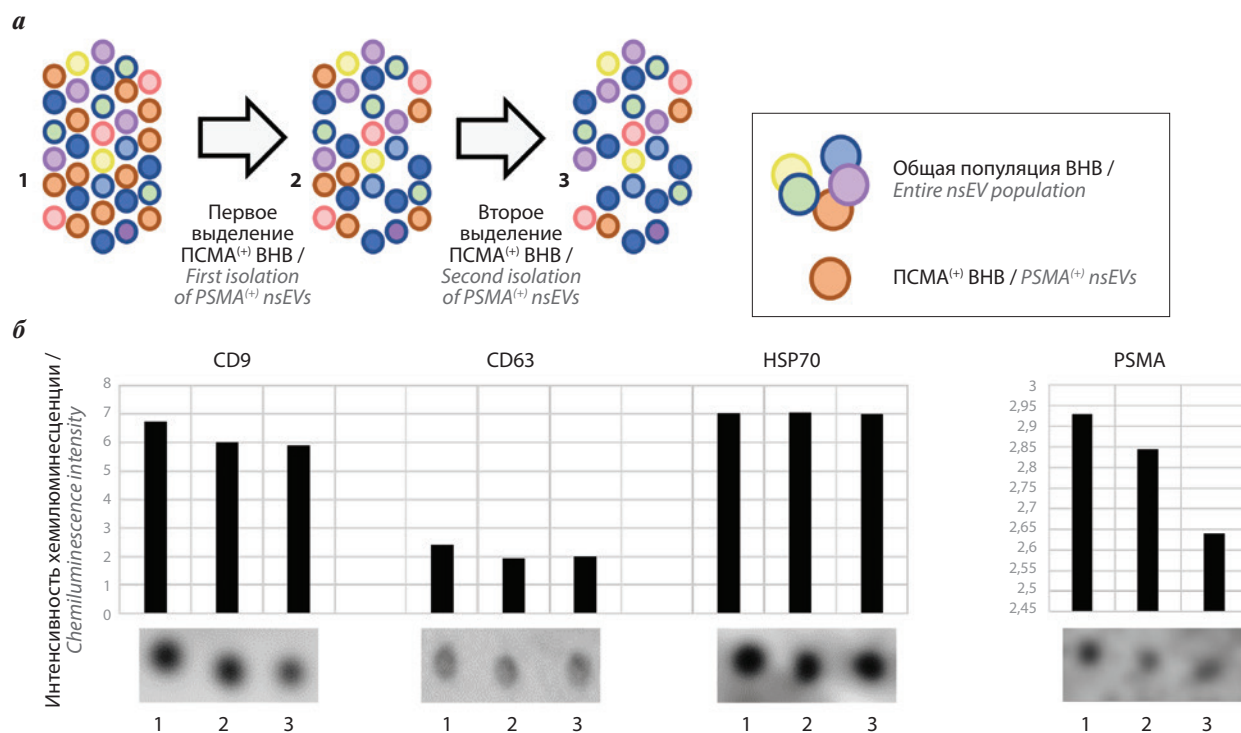


Рис. 4. Анализ концентрации везикулярных маркеров в суспензии ВНВ после 2 последовательных раундов сорбции $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ: а — схема истощения популяции $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ в процессе 2 раундов инкубации с комплексами МЧ-Ант; б — результаты анализа концентрации экзосомальных маркеров CD9, CD63, HSP70 и ПСМА в суспензии ВНВ плазмы до (1), после 1 раунда (2) и после 2 последовательных раундов (3) выделения $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ. Представлены репрезентативные результаты дот-блоттинга и результаты анализа интенсивности сигнала хемилюминесценции с помощью программы ImageJ

Fig. 4. Concentration of vesicular markers in the nsEV suspension after 2 consecutive rounds of $\text{PSMA}^{(+)}$ nsEV sorption: а — depletion of $\text{PSMA}^{(+)}$ nsEV population during two rounds of incubation with MP-Apt complexes; б — concentration of exosomal markers CD9, CD63, HSP70 and PSMA in plasma nsEV suspension before (1), after one round (2), and after 2 consecutive rounds (3) of $\text{PSMA}^{(+)}$ nsEV isolation. Representative results of dot-blotting and the intensity of chemiluminescence signal evaluated using the ImageJ software

из $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ и из общей популяции ВНВ каждого образца. Полуколичественная оценка концентрации 4 молекул микроРНК была выполнена методом ПЦР с обратной транскрипцией. На основании ранее проведенных исследований выбраны потенциально маркерные молекулы (miR-145, -221, -451a, -141). Молекула miR-93 была включена в исследование в качестве нормализатора на основании собственных данных и данных литературы [25]. Каждая реакция проведена в 3 повторах, значения Ct усреднены. Значение Ct для miR-93 действительно мало отличалось среди анализируемых образцов, что оправдало использование этой молекулы в качестве нормализатора. Отдельно был проведен анализ микроРНК в тотальной и $\text{PSMA}^{(+)}$ фракциях ВНВ, на основании нормализованных стандартным методом ($G = 2^{(\text{Ct}(\text{miR-93}) - \text{Ct}(\text{miR-X}))}$) результатов определены средние для клинических групп значения. На рис. 5 представлены результаты для 2 клинических групп (РПЖ и контроль), полученные при анализе микроРНК из всех ВНВ плазмы и микроРНК из фракции $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ. Концентрации

выбранных для анализа микроРНК в $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ фракциях значительно превысили концентрации этих молекул в общей популяции ВНВ. Помимо этого, при анализе $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ наблюдалась более значимая вариативность внутри групп РПЖ и контроля, чем при анализе общей популяции ВНВ. Разница концентрации маркерных молекул, наблюдаемая между группами сравнения, была статистически значима лишь в случае анализа $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ, анализ микроРНК из общей популяции ВНВ плазмы не позволял выявить разницу между группами РПЖ и контроля. Оценка диагностической значимости анализа микроРНК из $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ проведена с помощью ROC-анализа (рис. 6). Как видно из рис. 6, во всех 4 случаях значение AUC было выше в случае анализа $\text{PSMA}^{(+)}$ ВНВ по сравнению с результатами анализа общей популяции ВНВ плазмы.

Представленные результаты подтверждают гипотезу исследования: анализ отдельной популяции простатспецифической фракции ВНВ плазмы имеет больший диагностический потенциал, чем анализ общей популяции везикул.

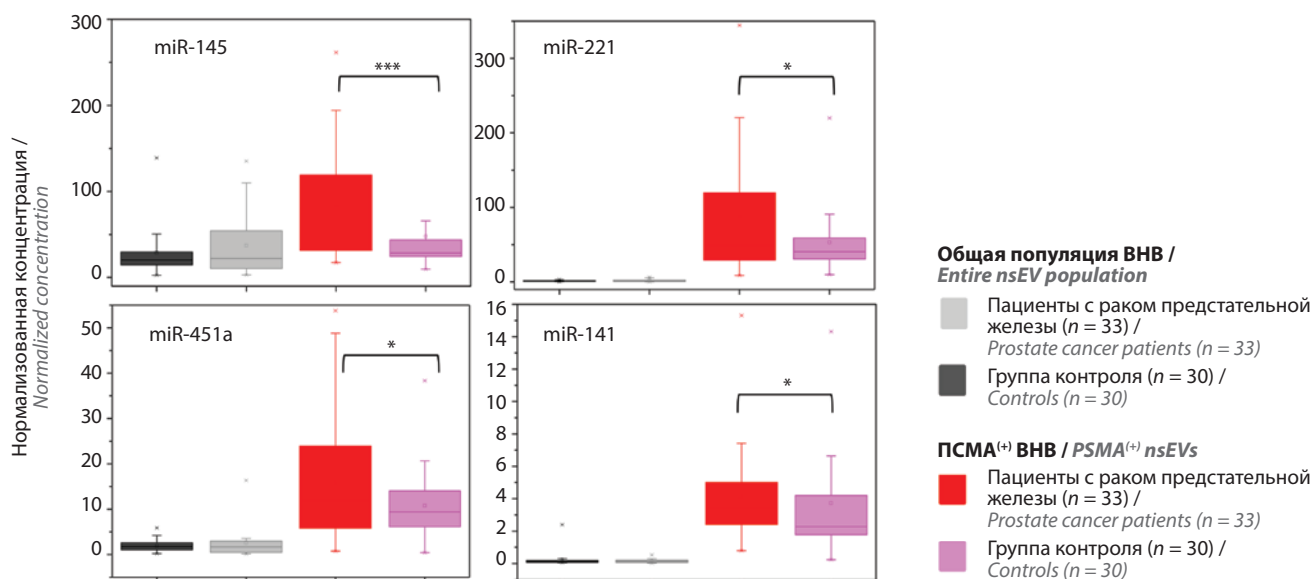


Рис. 5. Анализ концентрации отдельных микроРНК в ВНВ здоровых доноров и пациентов с раком предстательной железы. Проведено независимое исследование 2 популяций ВНВ: общей и ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ. Результаты анализа отдельных образцов нормализованы относительно miR-93, рассчитаны средние значения для групп рака предстательной железы (n = 33) и контроля (n = 30). Оценка статистической значимости наблюдаемых различий проведена методом Манна–Уитни. *p < 0,05; ***p < 0,0005

Fig. 5. Concentration of some miRNAs in nsEVs of healthy donors and prostate cancer patients. We performed an independent examination of two nsEV populations: entire and PSMA⁽⁺⁾ nsEVs. The results of individual samples were normalized against miR-93; medians were calculated for prostate cancer patients (n = 33) and controls (n = 30). The significance of differences was calculated using the Mann–Whitney U-test. *p < 0.05; ***p < 0.0005

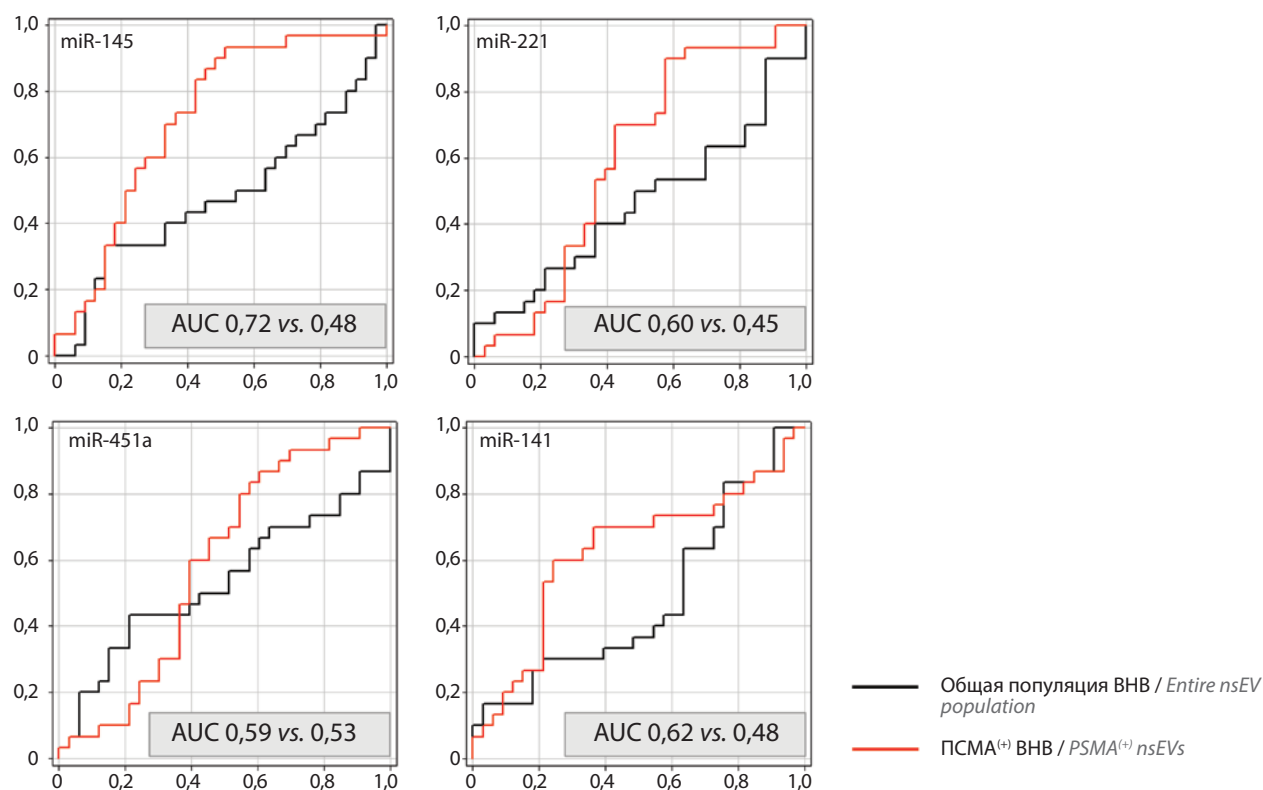


Рис. 6. Оценка диагностической значимости анализа микроРНК в ВНВ здоровых доноров и пациентов с раком предстательной железы. Методом ROC-анализа проведена оценка диагностической значимости результатов анализа 4 молекул микроРНК в 2 популяциях ВНВ: общей и ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ. AUC — площадь под ROC-кривой

Fig. 6. Diagnostic accuracy of microRNA analysis in nsEVs of healthy controls and prostate cancer patients. ROC analysis was used to assess performance characteristics of 4 miRNAs in two nsEV populations: entire and PSMA⁽⁺⁾ nsEVs. AUC — area under the ROC curve

Показатели диагностической значимости анализа отдельных микроРНК в простатспецифической мембранной антиген-положительной фракции внеклеточных нановезикул

Performance characteristics of the analysis of individual microRNAs in prostate-specific membrane antigen-positive fraction of nano-sized extracellular vesicles

Показатель Parameter	miR-145	miR-221	miR-451a	miR-141
Чувствительность Sensitivity	48,48	42,42	45,45	75,76
Специфичность Specificity	93,33	90,0	80,0	60,0
Положительное предиктивное значение Positive predictive value	88,89	82,35	71,43	67,57
Отрицательное предиктивное значение Negative predictive value	62,22	58,70	57,14	69,23
Диагностическая точность Diagnostic accuracy	69,84	65,08	61,90	68,25

В целях более детальной оценки диагностической значимости анализа выбранных микроРНК в ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ проведен расчет основных показателей (см. таблицу). Расчеты выполнены при определенных значениях cut-off результатов ПЦР с обратной транскрипцией, выбор которых позволяет оптимизировать сочетание показателей диагностической специфичности/чувствительности и положительного/отрицательного предиктивного значения. Анализ одной молекулы микроРНК, например miR-145, в ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ обеспечивает 93 % диагностической специфичности при всего 48 % чувствительности. При указанных параметрах диагностической значимости разработанный метод может быть успешно применен на этапе выбора диагностической тактики для пациентов, у которых значение общего ПСА находится в «серой» зоне (4–10 нг/мл) и целесообразность проведения биопсии неочевидна.

Обсуждение

В рамках исследования разработана технология выделения ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ, доказана возможность повышения диагностической ценности анализа микроРНК в этой фракции везикул по сравнению с общей популяцией ВНВ плазмы. Эта технология может быть использована для создания нового метода диагностики РПЖ, который должен иметь существенно более высокую диагностическую специфичность, чем традиционные методы анализа уровня ПСА плазмы. Однако для эффективного применения этой технологии требуются решения 2 задачи. Во-первых, ПСМА не является абсолютно простатспецифическим белком. Менее активная, чем в предстательной железе, экспрессия ПСМА детектируется в клетках почек, тонкого кишечника, слюнных желез [26]. В рамках данной

работы этот маркер был использован в качестве модели. Поэтому для повышения эффективности технологии выделения простатспецифических ВНВ необходимо найти более (абсолютно) специфические мембранные маркеры клеток предстательной железы. Кроме этого, создание и использование одновременно нескольких лигандов (антител или аптамеров) к разным тканеспецифическим мембранным белкам могут повысить эффективность выделения простатспецифических везикул. Во-вторых, правильный выбор маркерных молекул микроРНК, изменение содержания которых в клетках предстательной железы и простатспецифических ВНВ связано с развитием РПЖ, должен быть основан на широком профайлинговом анализе, проведенном на относительно большой коллекции биологического материала тем же методом, который предполагается для использования в диагностической системе. В рамках данной работы выбор потенциально маркерных молекул был сделан отчасти эмпирически, так как стояла задача показать их более высокое содержание в ПСМА⁽⁺⁾ фракции ВНВ. Однако сравнительный анализ 7 технологий ПЦР с обратной транскрипцией микроРНК (miRCury (Exiqon), OpenArray (Life Technologies), TaqMan Cards (Life Technologies), TaqMan Cards preAmp (Life Technologies), miScript (QIAGEN), qScript (Quanta BioSciences) и SmartChip (WaferGen)) продемонстрировал крайне низкую воспроизводимость результатов: лишь для 3 % молекул все методы показали сходные результаты [27]. Зависимость результатов анализа микроРНК от использованного сочетания технологий выделения, обратной транскрипции и ПЦР является известным фактом. Поэтому для создания эффективного метода диагностики РПЖ, основанного на анализе микроРНК в ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ, необходимо провести оценку

широкой панели потенциально маркерных молекул с использованием описанной в данной работе технологии. Теоретически метод диагностики, основанный на анализе микроРНК в простатспецифической фракции ВНВ плазмы, должен быть существенно более специфичен, чем определение уровня ПСА. Однако для достоверной сравнительной оценки 2 методов и разработки алгоритма их оптимального сочетания необходимо провести масштабное клиническое исследование.

Заключение

Специфическая фракция ВНВ, секретируемых клетками предстательной железы, может быть выделена из общей популяции ВНВ плазмы с помощью МЧ, поверхность которых функционализирована Апт, связывающим ПСМА в мембране везикул. Анализ микроРНК в составе ПСМА⁽⁺⁾ ВНВ более эффективен, чем анализ тех же молекул в общей популяции ВНВ плазмы. Разработанная технология может быть использована для создания нового метода диагностики РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Liu T., Mendes D.E., Berkman C.E. Functional prostate-specific membrane antigen is enriched in exosomes from prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2014;44(3):918–22. DOI: 10.3892/ijo.2014.2256.
- Potter S.R., Partin A.W. Tumor markers: an update on human kallikrein 2. *Rev Urol* 2000;2(4):221–2.
- Duffy M.J. Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(3):326–39. DOI: 10.1515/ccm-2019-0693.
- Basch E., Oliver T.K., Vickers A. et al. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen testing: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol* 2012;30(24):3020–5. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.3441.
- Мерабишвили М.В. Выживаемость онкологических больных. Выпуск 2. Часть 1. Под ред. Ю.А. Шербука. СПб.: Коста, 2011. 329 с. [Merabishvili M.V. Survival of cancer patients. Issue 2. Part 1. Ed.: Yu.A. Shcherbuk. Saint-Petersburg: Costa, 2011. 329 p. (In Russ.)].
- Мерабишвили М.В. Выживаемость онкологических больных. Выпуск 2. Часть 2. Под ред. Ю.А. Шербука. СПб.: Коста, 2011. 406 с. [Merabishvili M.V. Survival of cancer patients. Issue 2. Part 2. Ed.: Yu.A. Shcherbuk. Saint-Petersburg: Costa, 2011. 406 p. (In Russ.)].
- Luu H.N., Lin H.Y., Sørensen K.D. et al. miRNAs associated with prostate cancer risk and progression. *BMC Urol* 2017;17(18). DOI: 10.1186/s12894-017-0206-6.
- Al-Kafaji G., Said H.M., Alam M.A., Al Naieb Z.T. Blood-based microRNAs as diagnostic biomarkers to discriminate localized prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and allow cancer-risk stratification. *Oncol Lett* 2018;16(1):1357–65. DOI: 10.3892/ol.2018.8778.
- Bryzgunova O.E., Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A. et al. Data analysis algorithm for the development of extracellular miRNA-based diagnostic systems for prostate cancer. *PLoS One* 2019;14(4):e0215003. DOI: 10.1371/journal.pone.0215003.
- Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. The Panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms. *Diagnostics* 2020;10(1):38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038.
- Abramovic I., Ulapec M., Katusic Bojanac A. et al. miRNA in prostate cancer: challenges toward translation. *Epigenomics* 2020;12(6):543–58. DOI: 10.2217/epi-2019-0275.
- Sohel M.H. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Ach Life Sci* 2016;10(2):175–86. DOI: 10.1016/j.als.2016.11.007.
- Tutrone R., Donovan M.J., Torkler P. et al. Clinical utility of the exosome based ExoDx Prostate (IntelliScore) EPI test in men presenting for initial Biopsy with a PSA 2–10 ng/mL. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2020;23(4):607–14. DOI: 10.1038/s41391-020-0237-z.
- Ruiz-Plazas X., Altuna-Coy A., Alves-Santiago M. et al. Liquid biopsy-based exo-oncomiRNAs can predict prostate cancer aggressiveness. *Cancers* 2021;13(2):250. DOI: 10.3390/cancers13020250.
- Valentino A., Reclusa P., Sirera R. et al. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2017;19(6):651–7. DOI: 10.1007/s12094-016-1599-5.
- Li W., Dong Y., Wang K.J. et al. Plasma exosomal miR-125a-5p and miR-141-5p as non-invasive biomarkers for prostate cancer. *Neoplasma* 2021;67(06):1314–8. DOI: 10.4149/neo_2020_191130N1234.
- Slyusarenko M., Nikiforova N., Sidina E. et al. Formation and evaluation of a two-phase polymer system in human plasma as a method for extracellular nanovesicle isolation. *Polymers* 2021;13(3):458. DOI: 10.3390/polym13030458.
- Bouchelouche K., Tagawa S.T., Goldsmith S.J. et al. PET/CT imaging and radioimmunotherapy of prostate cancer. *Sem Nucl Med* 2011;41(1):29–44. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2010.08.005.
- Kim D., Jeong Y.Y., Jon S. A drug-loaded aptamer – gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer. *ACS Nano* 2010;4(7):3689–96. DOI: 10.1021/nn901877h.
- Mizutani K., Terazawa R., Kameyama K. et al. Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Res* 2014;34(7):3419–23.
- Brett S.I., Lucien F., Guo C. et al. Immunoaffinity based methods are superior to kits for purification of prostate derived extracellular vesicles from plasma samples. *Prostate* 2017;77(13):1335–43. DOI: 10.1002/pros.23393.
- Brett S.I., Lucien F., Guo C. et al. Immunoaffinity based methods are superior to kits for purification of prostate derived extracellular vesicles from plasma samples. *Prostate* 2017;77(13):1335–43. DOI: 10.1002/pros.23393.
- Walpole S.C., Prieto-Merino D., Edwards P. et al. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. *BMC Public Health* 2012;12(1):439. DOI: 10.1186/1471-2458-12-439.
- Leissner K.H., Tisell L.E. The weight of the human prostate. *Scand J Urol Nephrol* 1979;13(2):137–42. DOI: 10.3109/00365597909181168.
- Song J., Bai Z., Han W. et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 2012;57(4):897–904. DOI: 10.1007/s10620-011-1981-7.
- The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org>.
- Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L. et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 2014;11(8):809–15. DOI: 10.1038/nmeth.3014.

Вклад авторов

Л.М. Забегина: разработка методологии, сбор и анализ данных, написание текста рукописи;
Н.С. Никифорова, И.В. Назарова, М.С. Князева, Е.В. Цырлина, С.А. Рева, А.К. Носов: анализ данных;
А.М. Малек: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions

L.M. Zabagina: developed the study methodology, performed data collection and analysis, article writing;
N.S. Nikiforova, I.V. Nazarova, M.S. Knyazeva, E.V. Tsyrlina, S.A. Reva, A.K. Nosov: analysis of the data;
A.M. Malek: developing the research design, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.М. Забегина / L.M. Zabagina: <https://orcid.org/0000-0003-0827-1641>
Н.С. Никифорова / N.S. Nikiforova: <https://orcid.org/0000-0001-7464-4237>
И.В. Назарова / I.V. Nazarova: <https://orcid.org/0000-0002-6812-3088>
М.С. Князева / M.S. Knyazeva: <https://orcid.org/0000-0002-5064-2234>
Е.В. Цырлина / E.V. Tsyrlina: <https://orcid.org/0000-0002-0882-6697>
С.А. Рева / S.A. Reva: <https://orcid.org/0000-0001-5183-5153>
А.К. Носов / A.K. Nosov: <https://orcid.org/0000-0003-3850-7109>
А.М. Малек / A.M. Malek: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование было проведено в рамках государственного задания «Разработка тест-системы для малоинвазивной ранней диагностики и мониторинга эффективности лечения рака предстательной железы» (AAAA-A18-118032890186-5).

Financing. This study was funded within the state program “Development of a test system for minimally invasive early diagnosis of prostate cancer and monitoring of treatment efficacy” (AAAAA-A18-118032890186-5).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 13.05.2021. Принята к публикации: 03.11.2021.

Article submitted: 13.05.2021. Accepted for publication: 03.11.2021.