

Применение петлевой изотермической амплификации ДНК для диагностики микрометастазов рака предстательной железы в лимфатические узлы

М.Ю. Шкурников, А.А. Зотиков, М.М. Беляков, К.М. Ньюшко, К.А. Фомичева,
Е.Н. Князев, М.Р. Саневич, В.В. Иванович, Б.Я. Алексеев

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3

Контакты: Максим Юрьевич Шкурников mshkurnikov@gmail.com

Проведен сравнительный анализ результатов выявления метастазов рака в лимфатические узлы с помощью методики одно-этапной амплификации нуклеиновых кислот (*one-step nucleic acid amplification, OSNA*) и посредством морфологических методов. Показаны сопоставимые чувствительность и специфичность OSNA и гистологического исследования лимфатического узла.

Ключевые слова: рак предстательной железы, микрометастаз, полимеразная цепная реакция, OSNA, LAMP

DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-2-63-66

Application of loop-mediated isothermal amplification of DNA for diagnosis of prostate cancer micrometastases in the lymph nodes

M. Yu. Shkurnikov, A. A. Zotikov, M. M. Belyakov, K. M. Nushko, K. A. Fomicheva,
E. N. Knyazev, M. R. Sanevich, V. V. Ivanovich, B. Ya. Alekseev

P. A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center,
Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia

A comparative analysis of the results of diagnosis of cancer metastases in the lymph nodes using a method of one-step nucleic acids amplification (OSNA) and morphological methods was performed. Comparable sensitivity and specificity of OSNA and histological examination of a lymph node were observed.

Key words: prostate cancer, micrometastasis, polymerase chain reaction, OSNA, LAMP

Введение

Заболеваемость раком предстательной железы (РПЖ) как в России, так и в мире неуклонно растет. Так, в России в 2015 г. зарегистрированы 38 042 новых случая РПЖ [1].

Один из основных методов лечения больных РПЖ – радикальная простатэктомия (РПЭ). Тазовая лимфаденэктомия (ТЛЭ) у пациентов с РПЖ считается важным диагностическим этапом при проведении как хирургического, так и лучевого лечения. Основная цель ТЛЭ заключается в оценке состояния тазовых лимфатических узлов (ЛУ). Метастатическое поражение ЛУ у больных РПЖ является неблагоприятным прогностическим фактором, связанным с существенным уменьшением показателей безрецидивной и общей выживаемости пациентов. Тем не менее показано, что у больных с наличием микрометастазов в ЛУ или минимальной плотностью метастатического поражения выполнение РПЭ и расширенной ТЛЭ может способствовать увеличению показателей выживаемости [2].

Согласно данным Американской ассоциации урологов расширенную ТЛЭ проводят более чем 75 % пациентов при выполнении РПЭ [3]. Европейская ассоциация урологов рекомендует расширенную ТЛЭ более чем в 20 % случаев при РПЭ. Решение о необходимости проведения расширенной ТЛЭ принимается с использованием номограмм, которые учитывают стадию рака, уровень простатического специфического антигена в крови и оценку биоптата по шкале Глисона. Чувствительность и специфичность лучших номограмм составляют примерно 80 %, что приводит к значительному числу как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. В случае с ложноположительным результатом пациенту проводится расширенная ТЛЭ, которая может привести к развитию лимфоцеле, тромбоэмболических осложнений и повреждению сосудисто-нервных пучков [4]. При ложноотрицательных результатах ТЛЭ не выполняют пациентам с метастазами в ЛУ, что может привести к возникновению рецидива.

В ряде работ показано, что интраоперационное исследование сторожевых ЛУ помогает оценить наличие метастазов с более высокой точностью, чем оценка с помощью номограмм [5].

Срочное гистологическое исследование для обнаружения метастазов рака в ЛУ на замороженных срезах сопряжено с высокой вероятностью ошибки, а именно с получением ложноотрицательного ответа, что в первую очередь связано с качеством срезов и особенностью лимфоидной ткани. Дополнительный источник ложноотрицательных результатов – невозможность тотального изучения ЛУ при срочном исследовании в условиях ограниченного времени [5]. Показано, что экстенсивное изучение ЛУ при плановом исследовании на серийных или пошаговых срезах с использованием иммуногистохимических реакций повышает частоту выявления метастазов и/или изолированных опухолевых клеток. Однако такой подход связан с увеличением затрат при относительно низком росте диагностических показателей [6].

Описаны подходы к обнаружению метастазов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с обратной транскрипцией [7]. При этом одним из наиболее чувствительных диагностических показателей наличия метастазов рака в ЛУ является матричная РНК (мРНК) гена *KRT19*, кодирующего кератин 19. Для быстрого обнаружения мРНК гена *KRT19* в ЛУ была разработана методика одноэтапной амплификации нуклеиновых кислот (one-step nucleic acid amplification, OSNA), включающая лизирование ЛУ с последующим проведением модифицированной ПЦР, петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) с обратной транскрипцией [8].

LAMP, лежащая в основе OSNA, – быстрый, чувствительный и недорогой метод амплификации нуклеиновых кислот в изотермических условиях. Он был разработан и впервые описан в 2000 г. В ходе реакции используются 4 специфических праймера для узнавания 6 локусов целевого участка нуклеиновой кислоты и *Bst*-полимераза. Благодаря этим 2 особенностям реакция протекает быстро, высокоспецифично, не требует нагревания до высоких температур для плавления двухцепочечной ДНК и применения специализированной и дорогостоящей техники, такой как термоциклеры. Эффективность LAMP выше эффективности стандартной ПЦР, так как синтез идет одновременно в нескольких точках таргетного участка [9]. Была предложена модификация протокола LAMP с введением еще одной пары так называемых петлевых праймеров, которые позволяют еще больше увеличить скорость амплификации, что дает возможность детектировать продукт уже через 10–15 мин от начала реакции [10]. Таким образом, использование метода OSNA могло бы стать альтернативой интраоперационному гистологи-

ческому исследованию сторожевых ЛУ с последующим обязательным плановым исследованием оставшейся ткани.

Цель исследования – сравнительный анализ результатов выявления метастазов рака в ЛУ с помощью OSNA и посредством морфологических методов.

Материалы и методы

В исследование были включены ЛУ размером 4–12 мм. Они доставлялись в отделение онкоморфологии в кратчайшие сроки, непосредственно сразу после их удаления. ЛУ разрезали по длине пополам.

Первую половину использовали для определения метастатического статуса методом OSNA. Транспортировку и хранение осуществляли в криобрирке на льду. Между нарезкой ЛУ и началом выполнения OSNA проходило не более 20 мин или не более 20 мин до заморозки образца в жидком азоте для длительного хранения.

Вторую половину ЛУ использовали для морфологического исследования: после фиксации в формалине и заливки в парафин делали серию срезов толщиной 0,2 мм. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином для стандартной морфологической оценки. Положительными считали ЛУ, в которых обнаруживали микро- и/или макрометастазы.

OSNA проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой [8]. Перед исследованием участки ЛУ помещали в пробирку объемом 15 мл. В каждую пробирку добавляли по 6 мл лизирующего буфера, затем образец гомогенизировали с помощью TissueRuptor (Qiagen, Германия) около 90 с до получения однородной массы. Далее 1 мл полученного гомогенизата переносили в пробирку 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 10 тыс. *gcf* при комнатной температуре. Затем 2 мкл жидкости из верхней водной фазы использовали для дальнейшей постановки LAMP. После центрифугирования сверху над водной фазой может образоваться достаточно плотный жировой слой. Важно избежать попадания его частиц в реакцию. В стандартную смесь для LAMP [8] добавляли краситель SYBR Green I для детекции уровня флуоресцентного сигнала в реальном времени. Амплификацию проводили при температуре 63,0 °C в течение 15 мин. В качестве положительного контроля применяли стандартный образец, содержащий мРНК гена *KRT19*, в качестве отрицательного контроля – образец, содержащий 0 копий/мкл мРНК гена *KRT19*.

Результаты

Проведен анализ 138 ЛУ от 21 пациента. Средний возраст больных (\pm стандартное отклонение) составил $62,0 \pm 7,7$ года; средний уровень простатического специфического антигена – $27,2 \pm 27,2$ нг/мл. Всего в исследование вошли 2 (4,2 %) пациента со стадией T1c,

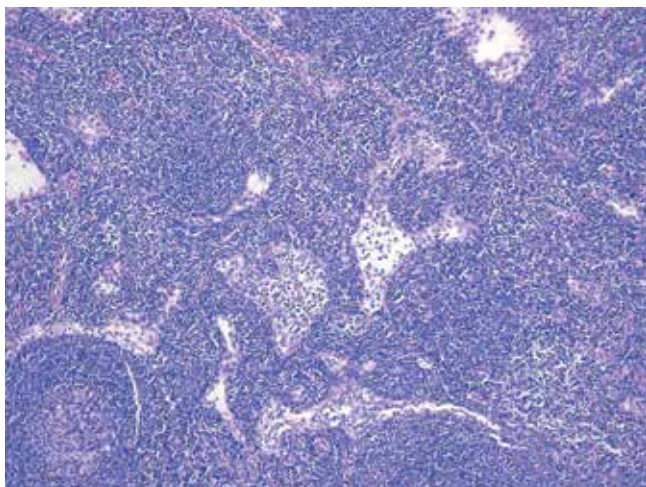


Рис. 1. Макрометастазы рака в лимфатический узел ($\times 10$)
Fig. 1. Cancer macrometastases in a lymph node ($\times 10$)

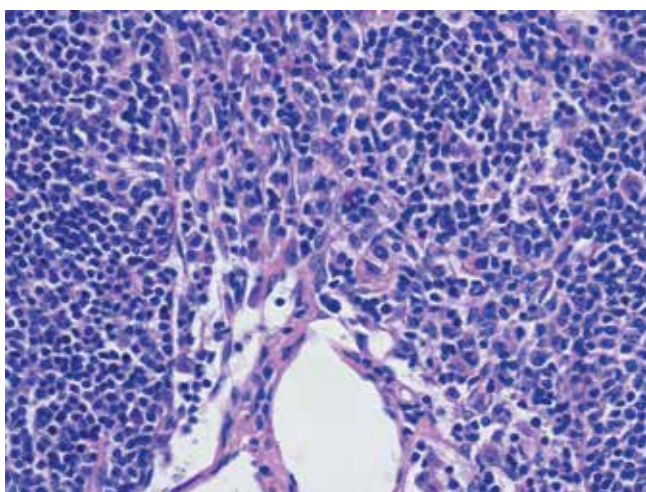


Рис. 2. Микрометастазы рака в лимфатический узел ($\times 40$)
Fig. 2. Cancer micrometastases in a lymph node ($\times 40$)

1 (2,1 %) со стадией T2b, 22 (45,8 %) со стадией T2c, 5 (10,4 %) со стадией T3a и 18 (37,5 %) со стадией T3b. Среднее время проведения OSNA составило 40 мин. У всех больных по данным предоперационного обследования метастатического поражения ЛУ не выявлено.

Для каждого из ЛУ провели морфологическое исследование и OSNA. Морфологическое исследование рассматривали в качестве референсного. Часть ЛУ содержала макрометастазы, определяемые даже при использовании объектива с увеличением 10 (рис. 1). В ряде ЛУ обнаруживались микрометастазы, различимые при применении объектива с увеличением 40 (рис. 2).

Всего по данным морфологического исследования выявили 120 ЛУ без признаков метастазов и 18 ЛУ

с микро- и/или макрометастазами: у 10 пациентов были только отрицательные ЛУ, у 10 больных – отрицательные и положительные, у 1 пациента – только положительные. Метод OSNA определил экспрессию гена *KRT19* в 25 ЛУ (в 8 случаях, когда морфологическое исследование не показало наличия метастазов) и не определил экспрессии в 1 ЛУ, положительном по результатам морфологического исследования. Результаты по остальным ЛУ совпали между LAMP и морфологическим исследованием. Чувствительность метода OSNA относительно морфологического исследования составила 94,4 % (17/18) при специфичности 93,3 % (112/120).

Обсуждение

Использование метода OSNA позволило значительно ускорить интраоперационный анализ ЛУ при ТЛАЭ при сохранении чувствительности и специфичности на уровне стандартного морфологического исследования срезов парафинового блока ЛУ с окраской гематоксилином и эозином. Так, в гистологическом исследовании 6803 ЛУ больных РМЖ были продемонстрированы чувствительность и специфичность 89,3 и 94,8 % соответственно [5]. Ведутся исследования применения OSNA при других злокачественных патологиях, таких как рак желудка [11], легкого [12], щитовидной железы [13]. Чувствительность метода для определения метастазов в ЛУ в данных исследованиях варьирует от 81,8 до 88,9 %, а специфичность – от 87,5 до 100 % [14].

Среднее время проведения OSNA составляет 40 мин, что делает возможным применение метода для интраоперационной диагностики макро- и микрометастазов в ЛУ. Необходимо отметить, что в отличие от морфологического исследования при использовании метода OSNA оценивается целый ЛУ, а не серия срезов.

Необходимы дальнейшие исследования для определения порогового количества копий мРНК гена *KRT19* при принятии решения о необходимости выполнения расширенной ТЛАЭ при РПЖ.

Заключение

РПЭ без проведения расширенной ТЛАЭ может избавить от развития множества интраоперационных и постоперационных осложнений. Поэтому очень важно определять необходимость выполнения расширенной ТЛАЭ как можно точнее. Полученный в данной работе результат свидетельствует о том, что OSNA может стать «золотым стандартом» диагностики метастазов в ЛУ при РПЖ вместо стандартного метода срочного гистологического исследования.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 16-15-00290).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2015. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2016. 236 p. (In Russ.)].
2. Mottet N., Bellmunt J., Bolla M. et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur Urol* 2017;4(71):618–29. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.08.003. PMID: 27568654.
3. Leyh-Bannurah S.R., Budäus L., Pompe R. et al. North American population-based validation of the National comprehensive cancer network practice Guideline recommendation of pelvic lymphadenectomy in contemporary prostate cancer. *Prostate* 2017;77(5):542–8. DOI: 10.1002/pros.23292. PMID: 28093788.
4. Williams S.K., Rabbani F. Complications of lymphadenectomy in urologic surgery. *Urol Clin North Am* 2011;38(4):507–18. DOI: 10.1016/j.ucl.2011.07.013. PMID: 22045181.
5. Schilling D., Hennenlotter J., Gakis G. et al. Prospective assessment of histological serial sectioning of pelvic lymph nodes in prostate cancer: a cost-benefit analysis. *BJU Int* 2012;110(6 Pt B): 166–71. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.10928.x. PMID: 22314026.
6. Karalak A., Homcha-Em P. Occult axillary lymph node metastases discovered by serial section in node-negative breast cancer. *J Med Assoc Thai* 1999;82(10):1017–9. PMID: 10561965.
7. Samatov T.R., Shkurnikov M.U., Tonevitskaya S.A., Tonevitsky A.G. Modelling the metastatic cascade by in vitro microfluidic platforms. *Prog Histochem Cytochem* 2015;49(4):21–9. DOI: 10.1016/j.proghi.2015.01.001. PMID: 25759320.
8. Tsujimoto M., Nakabayashi K., Yoshidome K. et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4807–16. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2512. PMID: 17699859.
9. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):E63. PMID: 10871386.
10. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16(3):223–9. PMID: 12144774.
11. Yaguchi Y., Sugawara H., Tsujimoto H. et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18(8): 2289–96. DOI: 10.1245/s10434-011-1591-9. PMID: 21301968.
12. Inoue M., Hiyama K., Nakabayashi K. et al. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer* 2012;78(3):212–8. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.08.018. PMID: 23026640.
13. Kaczka K., Fendler W., Borowiec M. et al. One-step nucleic acid amplification testing in medullary thyroid cancer lymph nodes: a case series. *Arch Med Sci* 2015;1(11):137–41. DOI: 10.5114/aoms.2015.49206. PMID: 25861300.
14. Tamaki Y. One-step nucleic acid amplification (OSNA): where do we go with it? *Int J Clin Oncol* 2017;22(1):3–10. DOI: 10.1007/s10147-016-1030-9. PMID: 27549784.