

Експресія мікроРНК-371а-3р (miR-371а-3р) як прогностичний фактор у хворих на герміногенні пухлини яєчка

А.В. Сакало¹, В.Є. Досенко²

¹ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАМН України, м. Київ

Герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ) частіше діагностують у віковій групі 20–30 років. Завдяки успіхам сучасної поліхіміотерапії (ПХТ) у більшості хворих вдається досягнути довготривалої ремісії. Пошук нових прогностичних маркерів перебігу хвороби є актуальним завданням, оскільки підвищення рівня АФП, ХГТ та ЛДГ спостерігається в 60% випадків захворювання.

Мета дослідження: вивчення можливості використання мікроРНК-367а-3р як прогностичного фактора у хворих на ГПЯ.

Матеріали та методи. Експресія мікроРНК-367а-3р визначена у сироватці крові у 24 хворих на ГПЯ у процесі лікування, контроль – 2 хворих (з рабдоміосаркомою яєчка та гострим епідідимітом).

Результати. Лікування призначали залежно від морфологічної будови первинної пухлини та стадії захворювання. МікроРНК-367а-3р визначали методом зворотної транскрипції та ПЛР в реальному часі. Під час порівняння AUC встановлено, що чутливість/специфічність мікроРНК-367а-3р перевищує аналогічний показник для АФП та ХГТ. Саме тому мікроРНК-367а-3р може розглядатись в якості молекулярного маркера перебігу захворювання на ГПЯ.

Заключення. Визначено, що для пухлин тератомної будови характерним є відсутність або мінімальний рівень експресії мікроРНК-367а-3р. Крім того, для несеєміномних пухлин рівень мікроРНК-367а-3р статистично вищий, ніж при сеєміні. Попередні дані свідчать про наявність кореляції між рівнем мікроРНК-367а-3р з повною/неповною ремісією після ПХТ, проте гіпотеза потребує підтвердження на більшій кількості хворих.

Ключові слова: герміногенні пухлини яєчка, мікроРНК-367а-3р, прогнозування, пухлинні маркери.

Герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ) є найчастішими новоутвореннями серед чоловіків у віковій групі 20–35 років. Завдяки успіхам хіміотерапевтичного лікування у більшості хворих вдається досягти довготривалої ремісії або одужання. Моніторинг перебігу хвороби базується за даними клінічних обстежень та визначенням рівня пухлинних маркерів – АФП, ХГТ та ЛДГ, але лише у 60% пацієнтів визначається підвищення рівня означених маркерів. Крім того, відомо, що для ЛДГ характерна низька специфічність. Виходячи з цього, пошук нових молекулярних маркерів є актуальним.

Відомо, що мікроРНК (microRNA, miRNA) – це невеликі молекули РНК (18–25 нуклеотидів), які можуть репресувати трансляцію іРНК на рибосомах та регулювати експресію генів. Встановлено роль мікроРНК у процесах ембріогенезу, диференціювання клітин, апоптозу, туморогенезу та репресії функції багатьох генів, при цьому одна мікро-РНК спроможна регулювати функції багатьох генів (у тому числі генів-супресорів канцерогенезу та онкогенів). Продовжуються

дослідження щодо вивчення ролі мікроРНК у стимуляції ракових стовбурових клітин та при розвитку резистентності до поліхіміотерапії (ПХТ). Потенційно мікроРНК можуть бути використані як пухлинні маркери в онкологічній практиці у зв'язку з їхньою стабільністю в рідинах організму та різким підвищенням рівня при багатьох онкологічних захворюваннях [1].

Більшість закордонних публікацій висвітлюють лімітований досвід використання мікроРНК в онкоурологічній практиці, але за останні роки визначено понад 40 мікроРНК, які вважаються перспективними як потенційні маркери для моніторингу онкоурологічних захворювань та розробленні принципово нових лікувальних стратегій, що базуються на селективному моделюванні мікроРНК.

Мета дослідження: визначення можливості використання рівня мікроРНК-367а-3р у сироватці крові хворих на ГПЯ як прогностичного маркера.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проспективне дослідження проводили на базі відділу онкоурології ДУ «Інститут урології НАМН України» та відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАМН України. У 2017 році всього проведено 59 проб на визначення рівня мікроРНК-371а-3р (у подальшому – мікроРНК) у сироватці крові у 24 хворих на ГПЯ, кількість проб в одного хворого становила від 1 до 4 на різних етапах лікування, у всіх випадках визначали рівень мікроРНК до та після видалення первинної пухлини. Додатково, як контроль, мікроРНК визначено у 2 хворих – з рабдоміосаркомою яєчка та з гострим епідідимітом. Залежно від стадії захворювання та морфологічної будови первинної пухлини лікування обмежувалося однобічною орхіфунікулектомією з подальшим спостереженням або з призначенням ПХТ.

Визначення мікроРНК-371а-3р у сироватці крові проводили за допомогою спектрофотометра (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, USA). МікроРНК визначали методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Зворотну транскрипцію виконували із застосуванням набору TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, USA) та специфічного праймера для мікроРНК. Для екстракції РНК з 300 мкл сироватки використано miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher, USA, mirVana™). Кількісну ПЛР у реальному часі проводили з допомогою TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, USA), застосовано U6sn RNA ID001973 як ендogenous контроль. Використано стандартну кількість та режими температурних циклів для денатурації. Найчастіше застосовували наступні температурні цикли ПЛР: ініціальна денатурація – 10 хв 95 °С та 45 циклів 95 °С 15 с та 60 °С 60 с Рівень експресії мікроРНК-371а-3р нормалізовано до

Характеристика 24 хворих на ГПЯ, яким було проведено визначення мікроРНК

Гістологічна будова та стадія	n	Діаметр пухлини, мм	Категорія Т та відповідна кількість хворих	Лікування	
				Тільки ОФЕ	ОФЕ + ПХТ (2-3РЕВ)
Семінома І ст.	9	26,7 (14-40)	T1-6, T2-3	9	0
*НГПЯ І ст.	6	25,8 (15,5-40)	T1-4, T2-3	4	2
Тератома І та ІІ ст.	5	19,5 (16-26)	T1-2, T2-2, T3-1	3	2
НГПЯ ІІ ст.	4	30 (17,5-52,5)	T1-2, T2-2	0	4

Примітки: * НГПЯ – несеміномні герміногенні пухлини яєчка

Таблиця 2

Описова статистика показників експресії мікроРНК при розподілі за гістологічною будовою та за категорією Т первинної пухлини

Група (n)	Середнє арифметичне	Медіана	Стандартне відхилення	95% ДІ для середнього арифметичного		Мін.	Макс.
				Нижня межа	Верхня межа		
Семінома (9)	438,288	216,35	465,68	22,081	854,494	8,0	1299,9
Несемінома (10)	4111,49	2282,3	4544,93	684,37	7538,609	223,7	15627,6
Тератома (5)	79,067	37,0	80,717	0	324,642	8,2	192,0
Категорія Т1 (14)	1181,56	407,6	1865,99	0,4	2421,88	8,0	6910,0
Категорія Т2 (10)	3406,17	15619	4897,9	2,3	7399,42	8,2	15627,6

U6snRNA і представлено в умовних одиницях (УО, calculated using the 2^{-ΔΔCT} method: ΔΔCT = ΔCT – ΔCT calibrator).

Для оцінювання результатів застосовували логістичну регресію з визначенням АUC та кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта Пірсона та двобічним критерієм Мана-Уїтні, рівень значущості відмінностей прийнято на рівні 0,005. Характеристика хворих наведена у табл. 1

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

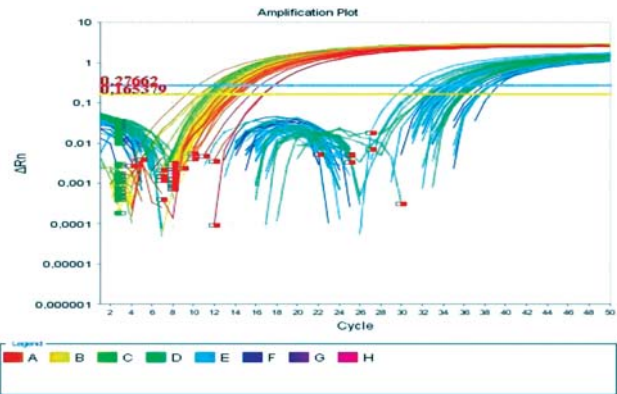
Отримані результати оцінювали за допомогою програмного забезпечення «7500 FastReal-time PCR» (мал. 1).

Описова статистика отриманих результатів наведена у табл. 2.

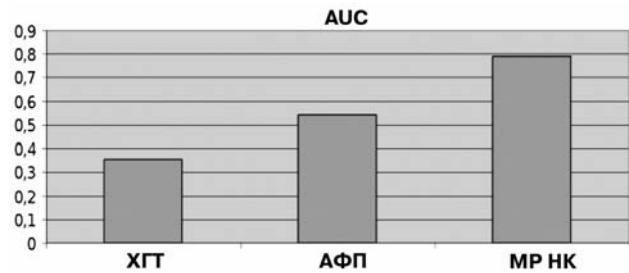
При порівнянні показників АUC для відповідних ROC-кривих, які були визначені за даними логістичної регресії для чутливості та специфічності рівня експресії мікроРНК (АUC=0,787), АФП (АUC=0,539) та ХГТ (АUC=0,353), встановлено, що показник АUC для мікроРНК суттєво перевищує аналогічний показник для АФП та ХГТ (мал. 2).

Середній рівень експресії мікроРНК до ОФЕ для семіноми – 438,288 (95% ДІ: 22,081–854,494), для несеміномних пухлин – 4111,49 (95% ДІ: 684,37–7538,609), для тератоми 79,067 (95% ДІ: 0–324,642). Під час порівняння медіан рівня мікроРНК до ОФЕ залежно від морфології пухлини (за критерієм Мана-Уїтні, двобічним) встановлена вірогідна різниця між семіномними та несеміномними пухлинами та між несеміномними пухлинами та тератоною (p=0,005 та p=0,03 відповідно), різниця між рівнями експресії між семіною та тератоною не вірогідна – p=0,361 (мал. 3). Під час порівняння медіан рівня мікроРНК після ОФЕ різниця між семіною та несеміною залишається вірогідною – p=0,043; між семіною та тератоною та між несеміною та тератоною – p=0,109 та p=0,659 відповідно.

Також встановлена статистично вірогідна позитивна кореляція між рівнем мікроРНК до та після видалення первинної пухлини (R=0,499, середня сила зв'язку). Слід зазначити, що специфічність мікроРНК не є абсолютною. Так, у двох пацієнтів контрольної групи з рабдіоміосаркомою яєчка та з



Мал. 1. Графік приросту інтенсивності флюоресценції у ході ПЛР в реальному часі



Мал. 2. Порівняння показників АUC для моделей логістичної регресії чутливості та специфічності експресії мікроРНК, АФП та ХГТ

гострим епідидимітом рівень мікроРНК до операції виявився підвищеним – 195,18 УО та 40,6 УО відповідно.

Під час порівняння медіан рівня експресії мікроРНК залежно від категорії Т первинної пухлини до ОФЕ також встановлена вірогідна різниця – T1vs T2 p=0,01, після ОФЕ – p=0,303 (мал. 4).

Для больных на НГПЯ у стадиях ПА та ПВ, які отримували ПХТ, спостерігали зниження рівня мікроРНК у процесі лікування (мал. 5).

Отже, отримані данні певним чином співвідносяться з публікаціями, в яких для ГПЯ визначена діагностична цінність кластеру мікроРНК-371а-3р.

За даними М. Spiekermann та співавторів (2015), три мікроРНК можуть розглядатися як потенційні маркери у лікуванні ГПЯ – мікроРНК 371а-3р, 372 та 373-3р, що підтверджується пілотними дослідженнями інших авторів, але найбільша специфічність доведена для мікроРНК-371а-3р [2]. Встановлено, що рівні мікроРНК-367-3р, 371а-3р та 372-3р у сироватці крові у хворих на ГПЯ вірогідно вищі, ніж у здорових чоловіків. При цьому специфічність та чутливість мікро-РНК-371а-3р досягає 84,7% та 99%, що є кращим показником порівняно з ХГТ та АФП. У І стадії захворювання після видалення первинної пухлини спостерігали суттєве зниження рівня мікроРНК-371а-3р, що дає можливість розглядати мікроРНК як потенційно новий діагностичний критерій для вибору тактики активного спостереження або моніторингу резидуальних пухлин після ПХТ.

В інших дослідженнях також встановлено вірогідне підвищення рівня мікроРНК 371, 372, 373 та 367 та відзначено кореляцію рівня мікроРНК зі стадією захворювання. Отже, данні пілотних досліджень останніх років дозволяють розглядати в якості нових потенційних маркерів для ГПЯ мікроРНК371а-3р, 372 та 373-3р [2–7]. Подальші дослідження мають відповісти на наступні запитання: яка роль мікроРНК у патогенезі ГПЯ? Чи дійсно означені мікроРНК продукуються клітинами герміногенних пухлин? Чи можливо виявити за допомогою мікроРНК виявляти ТІН? Чи пов'язано підвищення мікроРНК зі стадією хвороби? Чи можливо виявити та чи має діагностичне або прогностичне значення підвищення рівня мікроРНК в тканині пухлини та інших рідинах (сеча, еякулят)? З клінічної точки зору важливим є швидкість негативації рівня мікроРНК після видалення первинної пухлини у І стадії. Також для підтвердження специфічності тесту необхідно провести визначення рівня мікроРНК у контрольній групі.

ВИСНОВКИ

1. Ураховуючи, що чутливість та специфічність рівня мікроРНК 371а-3р перевищує аналогічні показники для «класичних» пухлинних маркерів (АФП та ХГТ), мікроРНК 371а-3р потенційно може розглядатися як новий молекулярний маркер у хворих на ГПЯ.
2. Пухлини тератомної будови не експресують мікроРНК 371а-3р.
3. Під час аналізу експресії рівня мікроРНК 371а-3р до

Экспрессия микроРНК-371а-3р в качестве прогностического фактора у больных с герминогенными опухолями яичка А.В. Сакало, В.Е. Досенко

Герминогенные опухоли яичка (ГОЯ) чаще диагностируют в возрастной группе 20–35 лет. Благодаря успехам полихимиотерапии (ПХТ) у большинства больных удается достичь длительной ремиссии или выздоровления. Поиск новых маркеров актуален, поскольку повышение уровня стандартных маркеров (АФП, ХГТ и ЛДГ) наблюдается в 60% случаев заболевания.

Цель исследования: изучение возможности использования микроРНК-367-3р в качестве прогностического маркера у больных с ГПЯ.

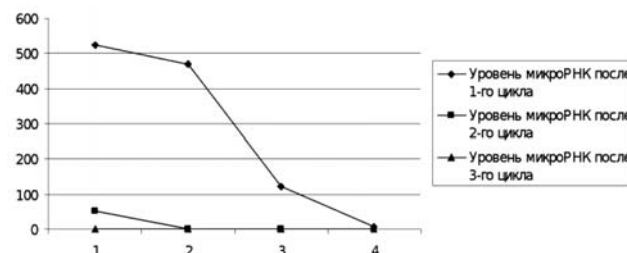
Материалы и методы. Исследована экспрессия микроРНК-367а-3р в сыворотке крови у 24 больных с ГОЯ на разных этапах лечения, контроль – 2 больных с рабдомиосаркомой яичка и острым эпидидимитом.



Мал. 3. Коробкова діаграма рівня мікроРНК за гистологічною будовою первинної пухлини до ОФЕ



Мал. 4. Коробкова діаграма рівня мікроРНК залежно від категорії Т первинної пухлини до ОФЕ



Мал. 5. Зниження рівня мікроРНК після ПХТ

ОФЕ залежно до морфології первинної пухлини встановлено вищий рівень експресії для несеміномних пухлин порівняно із семіномою ($p=0,005$).

4. Попередні дані свідчать, що рівень мікроРНК371а-3р корелює із повною або неповною ремісією після ПХТ, проте ця гіпотеза потребує перевірки на більшій кількості хворих.

Результаты. В зависимости от стадии заболевания и морфологического строения первичной опухоли проводили активное наблюдение или ПХТ. МикроРНК-367а-3р определяли методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Чувствительность/специфичность микроРНК-367а-3р превышает аналогичные показатели для уровня АФП и ХГТ – микроРНК-367а-3р может рассматриваться в качестве молекулярного маркера для ГОЯ. **Заключение.** Выявлено, что в опухолях тератомного строения уровень микроРНК-367а-3р минимальный или экспрессия отсутствует. Кроме того, в несеміномных опухолях уровень микроРНК-367а-3р статистически выше, чем в семіномах. Предварительные данные свидетельствуют о корреляции уровня микроРНК-367а-3р с полной/неполной ремиссией после ПХТ, однако гипотеза требует подтверждения на большем количестве больных.

Ключевые слова: герминогенные опухоли яичка, микроРНК, прогностические, опухолевые маркеры.

MIRNA-371a-3r expression as a predictive factor in patients with germ cell testicular tumors
A.V. Sakalo, V.E. Dosenko

GCTT is more often diagnosed in the age group of 20–35 years, thanks to the success of chemotherapy in most patients it is possible to achieve long-term remission or recovery. The search for new markers is relevant, since an increase of the level of standard markers (AFP, XGT and LDH) is observed in 60% of the cases.

The objective: to study the possibility of using miRNA-367-3p as a prognostic marker in patients with GCTT.

Materials and methods. The expression of miRNA-367-3p in the blood serum was studied in 24 patients with GCTT in different stages, control – 2 patients with rhabdomyosarcoma and acute epididymitis.

Results. Depending on the stage of disease and the morphological structure of the primary tumor, active observation or chemotherapy was performed. miRNA-367-3p was determined by reverse transcription in real-time PCR.

Conclusion. The sensitivity/specificity of miRNA-367-3p exceeds those for AFP and HGT, so, miRNA-367-3p can be considered as a molecular marker for GCTT; in teratomatous tumors the level of miRNA-367-3p is minimal or no expression; in nonseminomatous tumors, the level of miRNA-367-3p is statistically higher than in seminomas. Preliminary data indicate a correlation of the level of miRNA-367-3p with complete or incomplete remission after chemotherapy, but the hypothesis requires confirmation on a larger number of patients.

Key words: GCTT, micro-RNA, prediction, tumor markers.

Сведения об авторах

Сакало Анатолий Валериевич – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. Ю. Коцюбинского, 9а; тел.: (044) 424-13-29, (066) 702-75-58. E-mail: anatoliisakalo@gmail.com

Досенко Виктор Евгеньевич – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАМН Украины, 01601, г. Киев, ул. Академика Богомольца, 4

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Catto J. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review / J. Catto, A. Alcaraz, A. Bjartell [et al.] // Eur Urol. – 2011. – V. 59 (5). – P. 671–81.
- Spiekermann M. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker / M. Spiekermann, G. Belge, N. Winter [et al.] // Andrology. – 2015. – V. 3 (1). – P. 78–84.
- Rounge T. Profiling of the small RNA populations in human testicular germ cell tumors shows global loss of piRNAs / T. Rounge, K. Furu, R. Skotheim [et al.] // Mol Cancer. – 2015. – V. 12 (14). – P. 150–153.
- Syring I. Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer / I. Syring, J. Bartels, S. Holdenrieder [et al.] // J Urol. – 2015. – V. 193 (1). – P. 331–7.
- Gillis A. Target serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of testicular germ cell cancer patients: a proof of principle / A. Gillis, M. Rijlaarsdam, R. Eini [et al.] // Mol Oncol. – 2013. – V. 7 (6). – P. 1083–92.
- Radtke A. Can germ cell neoplasia in situ be diagnosed by measuring serum levels of microRNA371a-3p? / A. Radtke, J.F. Cremers, S. Kliesch [et al.] // J Cancer Res Clin Oncol. – 2017. – V. 143 (11). – P. 2383–2392.
- Dieckman K. Serum Levels of Micro RNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. / K. Dieckman, A. Radtke, Spiekermann M [et al.] // Eur Urol. – 2017. – V. 71 (2). – P. 213–220.

Статья поступила в редакцию 29.11.17