Исследования и практика в медицине 2019, т.6, №3, с. 10-19

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ. ОНКОЛОГИЯ

DOI: 10.17709/2409-2231-2019-6-3-1

АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX, BCL2* С БИОХИМИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРОВАНИЕМ У БОЛЬНЫХ ЛОКАЛИЗОВАННЫМ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ф.С.Бова, О.И.Кит, А.Ю.Максимов

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, д. 63

Резюме

Цель исследования. Идентифицировать ассоциацию экспрессии генов *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX, BCL2* в клетках аденокарциномы предстательной железы с биохимическим рецидивированием локализованного рака простаты.

Пациенты и методы. В исследовании формировали три группы больных — основную, группу сравнения и контрольную группу. У больных раком предстательной железы (РПЖ) в основной группе (n = 56) при наличии биохимического рецидива (БР) в течение 2 лет после радикальной операции, а также у 60 пациентов без БР (группа сравнения) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в ткани рака простаты определяли экспрессию генов *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX, BCL2*. Контрольную группу составили 55 пациентов, у которых при выполнении диагностический биопсии при подозрении на РПЖ были взяты биоптаты в пределах здоровых тканей. Возраст пациентов трех групп варьировал от 57 до 74 лет (медиана 63 года). При количественной оценке экспрессии генов *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX, BCL2* определяли разность значений пороговых циклов реакции (Ct), установленных для изучаемого и референсного генов. Относительный уровень (Expr) представлял собой отношение медиан Ct для каждого гена в двух сравниваемых группах из трех изучаемых: в основной группе — к показателю в контрольной группе, в группе сравнения — показателю в контроле, а также между основной группой и группой сравнения.

Результаты. При сравнительном анализе экспрессии генов в ткани рака простаты основной группы и группы сравнения установлено статистически значимое повышение (p < 0,05) относительного показателя для гена *HIF1* (в 2,7 раза), гена *VEGFA* (в 2,4 раза) и гена *NFKB1* (в 2 раза). Следовательно, у пациентов с локализованным РПЖ при раннем рецидивировании исходно в ткани предстательной железы установлен более высокий уровень экспрессии генов *NFKB1*, *HIF1* и *VEGFA*. В группе сравнения по отношению к контрольной группе экспрессия проапоптического гена *BAX* была выше в 1,6 раза (p < 0,05), а для антиапоптического гена *BCL2* изменений не выявлено (p = 0,09). Таким образом, у пациентов с локализованным РПЖ при отсутствии БР после радикальной простатэктомии исходно повышение экспрессии гена *BAX* способствовало активации процессов апоптоза. У пациентов с локализованным РПЖ при последующем биохимическом рецидивировании изначально в ткани аденокарциномы простаты наблюдалось угнетение апоптоза за счет повышения экспрессии гена *BCL2*.

Заключение. Усиление экспрессии генов *NFKB1*, *VEGFA*, *HIF1* и *BCL2* в ткани предстательной железы ассоциировано с развитием БР у больных локализованным РПЖ.

Ключевые слова:
рак предстательной железы, биохимический рецидив, экспрессия генов, транскрипция, неоангиогенез, прогностические маркеры

Оформление ссылки для цитирования статьи
Бова Ф.С., Кит О.И., Максимов А.Ю. Ассоциация экспрессии генов *NFKB1*, *HIF1*, *VEGFA*, *VEGFB*, *BAX*, *BCL2* с биохимическим рецидивированием у больных локализованным раком предстательной железы. Исследования и практика в медицине. 2019; 6(3): 10-19. DOI: 10.17709/2409-2231-2019-6-3-1

Для корреспонденции
Бова Филипп Сергеевич, к.м.н., докторант ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, д. 63
E-mail: alald@inbox.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2782-3288

Информация о финансировании. Финансирование данной работы не проводилось.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.06.2019 г., принята к печати 08.08.2019 г.

Research and Practical Medicine Journal. 2019, v.6, №3, p. 10-19

ORIGINAL ARTICLE. ONCOLOGY

DOI: DOI: 10.17709/2409-2231-2019-6-3-1

ASSOCIATION OF EXPRESSION OF *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX, BCL2* GENES WITH BIOCHEMICAL REMEDIATION IN PATIENTS WITH LOCALIZED PROSTATE CANCER

Ph.S.Bova, O.I.Kit, A.Yu.Maksimov

Rostov Research Institute of Oncology (RRIO), 63, 14 line, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

Abstract

Aim. To identify the association of *NFKB1*, *HIF1*, *VEGFA*, VEGFB, *BAX*, *BCL2* gene expression in prostate adenocarcinoma cells with biochemical recurrence of localized prostate cancer.

Patients and methods. Three groups of patients were formed in the study – the main one, the comparison group and the control group. In patients with prostate cancer (PC) in the main group (n = 56) with biochemical recurrence (BR) for two years after radical surgery, as well as in 60 patients without BR (experimental group) by real-time PCR in prostate cancer tissue the expression of genes *NFKB1*, *HIF1*, *VEGFA*, *VEGFB*, *BAX*, *BCL2* was determined. The control group consisted of 55 patients in whom, when performing diagnostic punctures for benign prostate tumors, biopsy specimens were taken in healthy tissues. The age of patients in the three groups ranged from 57 to 74 years (median 63 years). When quantifying expression of genes *NFKB1*, *HIF1*, *VEGFA*, *VEGFB*, *BAX*, *BCL2*, the difference in the values of reaction threshold cycles (Ct) fixed for the studied and reference genes was determined. The relative level (Expr) was the ratio of Ct medians for each gene in two compared groups of the studied three ones: in the main group to the indicator in the control group, in the experimental group to the indicator in the control group, and also between the main group and the experimental group.

Results. A comparative analysis of gene expression in prostate cancer tissue in the main group compared with the experimental group showed a statistically significant increase (p < 0,05) in the relative index for the *HIF1* gene (2,7 times), the *VEGFA* gene (2,4 times) and the *NFKB1* gene (2 times). Consequently, in patients with localized early recurrence prostate cancer, initially in the prostate tissue, a higher level of expression of the *NFKB1*, *HIF1* and *VEGFA* genes was established. In the experimental group relative to the control group, the expression of the proapoptic gene *BAX* was 1,6 times higher (p < 0,05), and for the antiapoptic gene *BCL2* no changes were detected (p = 0,09). Thus, in patients with localized prostate cancer in the absence of BR, after radical prostatectomy, an initial increase in the expression of the *BAX* gene promoted the activation of apoptosis. In patients with localized prostate cancer, subsequent biochemical recurrence initially in the tissue of prostate adenocarcinoma inhibition of apoptosis due to increased expression of the *BCL2* gene was observed.

Conclusion. Enhancement of *NFKB1*, *VEGFA*, *HIF1* and *BCL2* gene expression in prostate tissue is associated with the development of BR in patients with localized prostate cancer.

Keywords:
prostate cancer, biochemical recurrence, gene expression, transcription, neoangiogenesis, prognostic markers

For citation
Bova Ph.S., Kit O.I., Maksimov A.Yu Association of expression of *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX, BCL2* genes with biochemical remediation in patients with localized prostate cancer. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2019; 6(3): 10-19. DOI: 10.17709/2409-2231-2019-6-3-1

For correspondence
Philip S. Bova, MD, PhD, doctoral candidate Rostov Research Institute of Oncology (RRIO)
Address: 63, 14 line, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation
E-mail: alald@inbox.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2782-3288

Information about funding. No funding of this work has been held.
Conflict of interest. Authors report no conflict of interest.

The article was received 20.06.2019, accepted for publication 08.08.2019

Раковые клетки опухоли по сравнению с окружающими высокодифференцированными клеточными элементами перитуморальной зоны отличаются высокой пролиферативной активностью. Активация синтеза матричной РНК, микроРНК, транскрипционных факторов поддерживает пролиферативный потенциал раковых клеток на высоком уровне. Активно делящиеся клетки приобретают устойчивость к ингибиторам факторов роста и блокаторам их рецепторов, а также к проапоптическим сигналам [1]. В результате наблюдается не только рост опухолевой ткани в пределах органа, но и повышается ее инвазивный и метастатический потенциал, раковые клетки становятся способными мигрировать в организме [2]. В последнее время подчеркивается значимость изучения влияния генетических факторов на способность к инвазии и миграции опухолевых клеток, что раскрывает возможности для прогнозирования течения заболевания и разработки новых подходов к мониторингу и лечению [2]. Комплексное одномоментное изучение генетических факторов контроля пролиферации и транскрипции за счет изменения экспрессии генов *NFKB1*, *HIF1*, неоангиогенеза путем оценки экспрессии генов (*VEGFA*, *VEGFB*), апоптоза опухолевых клеток, контролируемого генами *BAX*, *BCL2*, направлено на исследование ассоциации изменений генетического контроля основных патофизиологических процессов в опухолевой ткани и клинических характеристик течения рака предстательной железы (РПЖ). Сопряжение генетических и клинических результатов исследования дает продуктивные результаты в понимании течения онкологического заболевания, а следовательно, — его прогноза. Например, хромосомные мутации в локусах 8q24 приводят к изменению кодирования генов *MYC* и *PVT1*, экспрессии протоонкогенного белка *MYC*, что сопровождается повышением риска развития РПЖ при первой степени родства в 2 раза [3]. Таким образом, в данной цепочке событий генетические и молекулярные изменения способствовали активации ранних стадий онкогенеза.

Изменчивость генома может обеспечивать также вариативность числа копий генов (Copy Number Variation), спорадические однонуклеотидные полиморфизмы [4]. Однако чаще других при развитии опухоли в геноме встречаются локус-специфичные мутации. Частота локус-специфичных мутаций превышает число спорадических однонуклеотидных полиморфизмов в 1000–10 000 раз, что, в свою очередь, перестраивает экспрессию кодирующей или некодирующей РНК, белков [5]. В опухолевых клетках часто отмечается дисбаланс между выраженностью экспрессии онкогенов и супрессивных генов [6], что можно рассматривать как информативный признак, ассоциированный с малигнизацией и прогрессированием роста опухоли [7, 8].

Цель исследования — идентифицировать ассоциацию экспрессии генов *NFKB1*, *HIF1*, *VEGFB*, *VEGFB*, *BAX*, *BCL2* в клетках аденокарциномы предстательной железы с биохимическим рецидивированием локализованного рака простаты.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты, включенные в исследование, были оперированы в 2015–2018 гг. в Центре урологии, нефрологии и гемодиализа ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2», отделении онкоурологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России. При планировании исследования было получено разрешение (№ 4 от 3.02.2015) Локального независимого этического комитета ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России.

До радикальной простатэктомии (РПЭ) и через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 и 24 мес после операции в сыворотке крови больных методом иммуноферментного анализа измеряли концентрацию простатспецифического антигена (ПСА), используя фотометр Multiscan-P 2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). При превышении концентрации ПСА в сыворотке крови выше порогового уровня 0,2 нг/мл, а также при сохранении повышенного значения маркера при мониторинге с интервалом 2–3 нед в двух последующих пробах формировали заключение о наличии биохимического рецидива (БР).

Критерии включения пациентов в наблюдение:

1. наличие локализованного РПЖ (T1 c–T2 c) как по клинической, так и по патоморфологической стадии по результатам гистологического исследования биопсийных и операционных образов ткани;
2. наличие измерений дооперационного уровня ПСА;
3. отсутствие отдаленных метастазов по результатам компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии, радиоизотопного сканирования костей, ультразвукового исследования и в сомнительных случаях — позитронно-эмиссионной томографии с 11 C-холином.

Критерии исключения пациентов: наличие экстракапсулярной инвазии опухоли по результатам гистологического исследования хирургических образцов ткани предстательной железы (ПЖ). Последующий период наблюдения за больными после операции составил 2 года. По результатам послеоперационного мониторинга концентрации ПСА

в крови формировали 2 группы — основную и группу сравнения. Основную группу формировали из пациентов, у которых при наблюдении в течение 2 лет после РПЭ был выявлен БР. В основную группу были включены 56 пациентов (ПСА в сыворотке крови до операции 10,4 ± 1,3 нг/мл, медиана 10,3 нг/мл). В группе сравнения за 2 года после РПЭ БР не наблюдали (ПСА в сыворотке крови до операции 10,1 ± 1,3 нг/мл, медиана 9,8 нг/мл). Таких больных было 60. Таким образом, основную группу и группу сравнения формировали ретроспективно, учитывая дополнительный критерий — наличие или отсутствие БР после РПЭ в течение 2 лет после операции. Тип исследования был ретроспективным.

Контрольную группу составили 55 пациентов, у которых при выполнении диагностических пункций по поводу доброкачественных образований ПЖ, кроме биоптатов доброкачественного образования, получены биоптаты здоровых тканей (ПСА в сыворотке крови 4,8 ± 0,5 нг/мл перед диагностическим исследованием, медиана 4,4 нг/мл).

Возраст пациентов 3 групп варьировал от 57 до 74 лет. Медиана возраста соответствовала в основной группе 65 годам, группе сравнения — 61 году, в контрольной группе — 64 годам.

При гистологическом исследовании операционных биоптатов ПЖ у всех пациентов основной группы и группы сравнения был установлен гистологический тип опухоли как аденокарцинома. Кроме того, определяли степень гистопатологической дифференцировки опухолевых клеток.

Для лизиса опухолевых клеток и выделения общей РНК тканевые фрагменты помещали в пробирку с предварительно подготовленным буфером набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в объеме 350 мкл, включая 1% бета-меркаптоэтанола. Согласно инструкции фирмы-производителя, последовательно осуществляли экстракцию, выделение и элюирование общей РНК с последующим определением концентрации РНК на флюориметре QubitTM (Invitrogen, США) с помощью набора QuantiT^{TM} RNA Assay Kit (Invitrogen, США).

РНК денатурировали в течение 5 мин при 65 °С, затем реакционную смесь охлаждали на льду. Далее 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с целью получения комплементарной ДНК (кДНК). Для этого использовали метод ПЦР с обратной транскрипцией и набор реагентов с обратной транскриптазой Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Германия), а также 10 μM p (dN)8 случайных гексамерных праймеров (TIB MOLBIOL, Германия). Инактивацию обратной транскриптазы Omniscript проводили путем нагрева реакционной смеси в течение 5 мин при 93 °С. Затем кДНК хранили до RT-qPCR-анализа при температуре –20 °С. Перед использованием в качестве ПЦР-матрицы кДНК разводили 1:5.

Экспрессию генов *HIF1α*, *NFKB1*, контролирующих транскрипцию, генов *VEGFA*, *VEGFB*, активирующих неоангиогенез, а также генов *BAX* и *BCL2*, контролирующих апоптоз, оценивали методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого использовали систему ABI Prism (Applied Biosystems, США) из готовых праймеров и зондов TaqMan. Зонды TaqMan были меченными флуоресцентным красителем FAM5'- (6-карбоксифлуоресцеин). Краситель гасили с помощью TAMPA (6-карбокситетраметилродамин) на тимидиновой основе вблизи 3'-конца. Реакционная смесь содержала: ПЦР-буфер [200 мМ Трис-HCl (pH 8,4), 500 мМ KCl], 4,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ dNTP, 0,5 U платиновой Taq ДНК-полимеразы (Invitrogen, Германия), 0,2 мкМ каждого праймера, 120 нМ специфического зонда TaqMan и 1 мкМ 6-карбокси-X-родамина (Molecular Probes, Нидерланды). Матрица для ПЦР в конечном объеме 25 мкл включала 2 мкл предварительно разбавленной кДНК. Временная характеристика этапов цикла: первичная денатурация 94 °С — 3 мин; 45 циклов: 94 °С — 20 с, отжиг и элонгация праймера при температуре, специфичной для каждого гена, в течение 30 с. Кратность ПЦР-РВ при оценке экспрессии каждого гена была трехкратной. Использовались термоциклер Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) и специальное программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1).

Как референсный использовали ген *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1) (NM_000194, Gen Bank) с готовыми праймерами фирмы Roche Applied Science (Германия) системы Light Cycler-h-HPRT 181 1.97 (Housekeeping Gene Set).

Количественную оценку экспрессии генов рассчитывали при определении разности значений пороговых циклов реакции (Ct), установленных для изучаемого и референсного генов. Относительный уровень (Expr) представлял собой отношение медиан Ct для каждого гена в основной группе к показателю в контрольной группе, в группе сравнения — к показателю в контроле, а также между основной группой и группой сравнения. Величина Expr представляла собой кратность увеличения или уменьшения экспрессии гена одной группы по отношению ко второй.

Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 12 (StatSoft, США) и методы описательной статистики, построения таблиц сопряженности и оценки значимости сопряжения по критерию χ^2. Для относительных показателей определяли уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническую стадию РПЖ у пациентов изучаемых групп определяли до операции. В основной группе стадия cT_{1c} встречалась у 3/56 (5,3%), cT_{2a} — у 5/56 (8,9%), cT_{2b} — у 21/56 (37,5%), cT_{2c} — у 27/56 (48,2%) пациентов. В группе сравнения стадия РПЖ cT_{1c} имела место у 3/60 (5%), cT_{2a} — у 3/60 (5%), cT_{2b} — у 21/60 (35%), cT_{2c} — у 33/55 (55%). В основной группе, как и в группе сравнения, превалировала стадия $T2_c$ (48,2% и 55% пациентов соответственно). После операции, учитывая результаты патоморфологического стадирования по итогам гистологического исследования, вновь определяли стадию РПЖ. Существенных отличий по сравнению с предоперационным клиническим стадированием выявлено не было (p > 0,05).

В основной группе высокая степень гистопатологической дифференцировки (≤6 баллов по шкале Глисона) встречалась у 6/56 (10,7%), умеренная (7 баллов по шкале Глисона) — у 45/56 (80,4%) и низкая (8–10 баллов по шкале Глисона) — у 5/56 (8,9%) больных. В группе сравнения высокая степень гистопатологической дифференцировки (≤6 баллов по Глисону) встречалась у 8/60 (13,3%), умеренная (7 баллов по Глисону) — у 48/60 (80%) и низкая (8–10 баллов по Глисону) — у 4/60 (6,7%) больных.

Динамика ПСА в сыворотке крови после РПЭ у пациентов основной группы и группы сравнения представлена в таблице 1.

После РПЭ содержание ПСА в сыворотке крови у пациентов снижалось ниже 0,2 нг/мл. Начиная с 6-месячного периода после РПЭ и до конца наблюдения, уровень ПСА в крови в основной группе статистически значимо был выше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения. Временной интервал после РПЭ до выявления БР в основной группе в среднем составил 17,9 ± 1,4 мес (медиана 16,6 мес). У пациентов с развитием БР средняя скорость прироста ПСА в сыворотке крови в год составила 0,61 ± 0,17 нг/мл/год (медиана 0,63 нг/мл/год).

По итогам оценки экспрессии генов в опухолевых клетках в основной группе по сравнению с контрольной группой было установлено многократное и статистически значимое (p < 0,05) превышение экспрессии гена *HIF1α* в 4,9 раза (p < 0,001), гена *NFKB1* — в 3,8 раза, гена *VEGFA* — в 3,1 раза (p < 0,001). Для транскрипционных генов и гена, контролирующего неоангиогенез, относительная величина экспрессии превышала критический уровень в 1,5 раза. Кратность повышения экспрессии антиапоптического гена *BCL2* в основной группе по сравнению с контрольной была умеренной, но достоверной и составила 1,4 раза ($p < 0,05$) (рис. 1).

Таблица 1. Динамика ПСА (нг/мл) в сыворотке крови после РПЭ у пациентов основной группы и группы сравнения
Table 1. PSA dynamics (ng/ml) in blood serum after radical prostatectomy in patients of the main group and the comparison group

Период наблюдения после РПЭ, мес The observation period after RPE, months	Основная группа, n = 56 Me [25%;75%] Main group, n = 56 Me [25%;75%]	Группа сравнения, *n* = 60 Me [25%;75%] Experimental group, *n* = 60 Me [25%;75%]	*p*
До операции/Before operation	10,3 [7,1–17,5]	9,8 [7,5–16,7]	0,58
Через 3 мес/In 3 months	0,14 [0–0,23]	0,09 [0–0,15]	0,26
Через 6 мес/In 6 months	0,25 [0–0,8]	0,11 [0–0,17]	0,043
Через 9 мес/In 9 months	0,22 [0–1,7]	0,13 [0–0,18]	0,048
Через 12 мес/In 12 months	0,5 [0–2,4]	0,10 [0–0,15]	0,008
Через 15 мес/In 15 months	0,6 [0,2–2,8]	0,17 [0,05–0,19]	0,005
Через 18 мес/In 18 months	0,8 [0,2–3,4]	0,15 [0–0,19]	0,001
Через 21 мес/In 21 months	0,9 [0,5–3,9]	0,14 [0,03–0,18]	0,001
Через 24 мес/In 24 months	1,2 [0,5–6,8]	0,17 [0,01–0,19]	0,0004

Примечание: Me – медиана, в квадратных скобках представлен межквартильный диапазон, при оценке межгруппового различия уровень значимости p определяли по критерию Манна-Уитни.
Note: Me – is the median, the interquartile range is presented in square brackets; when assessing the intergroup differences, the significance level p was determined by the Mann-Whitney criterion.

Ген *HIF1α* контролирует, в зависимости от кислородного обеспечения в любых тканях, синтез белка HIF1α. В исследовании A. J. Majmundar et al. (2010) показано низкое содержание в цитоплазме клеток белка HIF1α при нормальной оксигенации [9]. При гипоксии и при повышении активности транскрипционных процессов (например, накоплении белка NF-kB) фактор HIF1α стабилизируется, накапливается в цитоплазме и транспортируется к ядру. При транслокации в ядро HIF1α выполняет роль транскрипционного фактора [9]. Активность большинства контролируемых гипоксией генов повышается при накоплении HIF1α [9]. Некоторые гены, например семейства ядерных транскрипционных факторов каппа-B (NF-kB), при снижении парциального напряжения кислорода в тканях могут активироваться параллельно и независимо от HIF1α [10]. Усиленная клеточная продукция факторов транскрипции NF-kB и HIF1α ведет к активации секреции воспалительных цитокинов, ростовых факторов, включая VEGF, синтезу иммунорецепторов и молекул клеточной адгезии, что в совокупности способствует облегченному распространению опухолевых клеток по путям лимфооттока [11]. Гиперэкспрессия гена *VEGFA* как следствие накопления HIF1α способствует повышению плотности и образованию новых кровеносных сосудов опухоли, имеет трофическое влияние и способствует прогрессирующему течению [12]. Ведущую роль в стимуляции ангиогенеза играет регуляторный белок VEGFA [12].

Ранее в экспериментальных исследованиях на мышах при иммуногистохимическом исследовании ткани ПЖ, полученной из спонтанной аутохтонной трансгенной аденокарциномы, авторы доказали патогенетическую роль повышенной экспрессии молекул адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов (PECAM-1), HIF1α и VEGF, повышения внутрипротоковой плотности микрососудов в прогрессии опухоли [13]. Повреждение окислительного фосфорилирования в клетках опухоли простаты снижало внутриклеточное потребление кислорода и способствовало накоплению HIF1α вследствие его стабилизации в клетках аденокарциномы ПЖ. Создавалась ситуация псевдонормоксии и активации в этих условиях факторов транскрипции [14].

В ходе дальнейшего анализа результатов собственных исследований были установлены следующие факты. В основной группе по сравнению с контрольной группой уровни экспрессии гена *VEGFB* (Expr = 1,1; $p > 0,05$) и проапоптического гена *BAX* были сходными (Expr = 0,92; $p > 0,05$).

В группе сравнения по отношению к контрольной группе превышение экспрессии генов *HIF1α* (Expr = 1,8; $p < 0,05$) и *NFKB1* (Expr = 1,9; $p < 0,05$) было умеренным и статистически значимым, для гена *VEGFA*, контролирующего неоангиогенез, изменения экспрессии не обнаружено (Expr = 1,3; $p = 0,17$).

При сравнительном анализе экспрессии генов в клетках аденокарциномы простаты в основной группе по сравнению с группой сравнения выявлено повышение относительного показателя как для

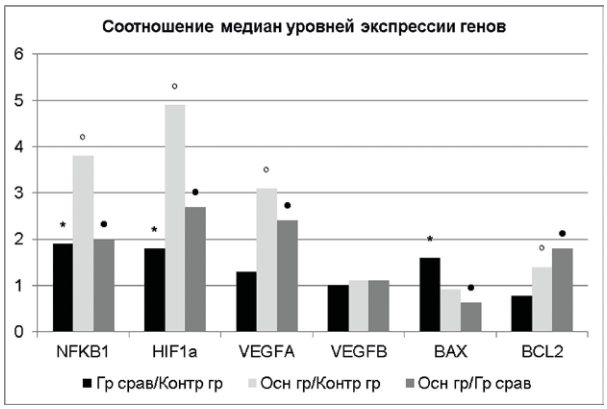

Рис. 1. Соотношение медиан экспрессии генов *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX* и *BCL2* в ткани предстательной железы в основной группе и группе сравнения по отношению к контрольным образцам и между собой.
Достоверные отличия между: * – группой сравнения и контрольной группой; º – между основной и контрольной группами; • – между основной группой и группой сравнения при $p < 0,05$.

Fig. 1. The ratio of the median expression of the *NFKB1, HIF1, VEGFA, VEGFB, BAX,* and *BCL2* genes in the prostate tissue in the main group and the experimental group in relation to the control samples and among themselves.
* – significant differences between the experimental group and the control group, º – between the main and control groups,
•– between the main group and the experimental group at $p < 0.05$

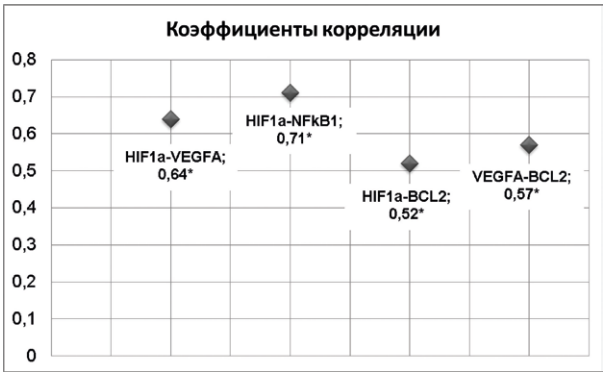

Рис. 2. Коэффициенты корреляции между экспрессией генов в клетках РПЖ.
*доверительная вероятность p < 0,05.

Fig. 2. Correlation coefficients between gene expression in prostate cancer cells.
*confidence probability p < 0.05.

гена *HIF1α* (Expr = 2,7;, $p < 0,05$), так и для гена *VEGFA* (Expr = 2,7; $p < 0,05$) (см. рис. 1).

Следовательно, регуляторные прямые влияния генов на экспрессию транскрипционных и ростовых факторов в ткани опухоли у больных группы сравнения без БР были менее выражены по сравнению с основной группой с ранним рецидивированием заболевания. Для гена *VEGFA* экспрессия в 2 группах была сходной.

В группе сравнения по отношению к контрольной группе экспрессия проапоптического гена *BAX* была выше в 1,6 раза ($p < 0,05$), а для антиапоптического гена BCL2 различий не было ($p = 0,09$). Таким образом, у пациентов с локализованным РПЖ при отсутствии БР после РПЭ исходно повышение экспрессии гена *BAX* способствовало активации процессов апоптоза клеток аденокарциномы простаты. У пациентов с локализованным РПЖ при последующем БР изначально в ткани аденокарциномы простаты наблюдалось угнетение апоптоза за счет повышения экспрессии гена *BCL2*.

При сравнительном анализе экспрессии генов клеток РПЖ в основной группе по сравнению с группой сравнения установлено повышение ($p < 0,05$) экспрессии гена *HIF1α* (в 2,7 раза), гена *VEGFA* (в 2,4 раза) и гена *NFKB1* (в 2 раза). Следовательно, у пациентов с локализованным РПЖ при раннем БР исходно в ткани аденокарциномы простаты установлен более высокий уровень экспрессии генов *NFKB1*, *HIF1α* и *VEGFA*.

Однонаправленное усиление экспрессии генов *HIF1α*, *NFKB1* и *VEGFA* в клетках РПЖ привело к формированию тесной и прямой корреляционной связи между явлениями (коэффициент корреляции уровней экспрессии генов *HIF1α* и *VEGFA* r = 0,64, $p < 0,001$; *HIF1α* и *NFKB1* r = 0,71, $p < 0,001$) (рис. 2). В нашей работе установлена прямая достоверная выраженная связь между уровнем экспрессии генов *VEGFA* и *BCL2* (коэффициент корреляции r = 0,57, $p < 0,001$), генов *BCL2* и *HIF1* (коэффициент корреляции r = 0,52, $p < 0,01$) (рис. 2).

В то же время существуют работы, указывающие, что *BCL2* усиливает стимулирующее действие гипоксии на синтез VEGF в клетках аденокарциномы ПЖ [15]. В исследованиях in vivo при трансфекции *BCL2* в опухолевые клетки путем генной инженерии тканевая экспрессия фактора неоангиогенеза VEGF повышалась, степень васкуляризации опухолевых клеток усиливалась [16]. Таким образом, VEGF, способствующий выживаемости эндотелиальных клеток, являлся косвенным антиапоптическим фактором для опухолевых клеток. Ангиогенез в опухолевой ткани ПЖ активировался в том числе вследствие повышения экспрессии гена, отвечающего за синтез гипоксия-индуцибельного фактора транскрипции. В свою очередь, усиленная экспрессия *BCL2* способствовала усилению интеграции между транскрипционным фактором, активируемым при гипоксии, и фактором роста сосудов.

VEGFA играет ведущее значение для активации неоангиогенеза и роста опухолей при РПЖ в условиях гипоксии тканей [17]. Одним из подтверждений нашего предположения может служить работа K. Eisermann и соавт. (2017), в которой сделано заключение о том, что VEGF-зависимый ангиогенез при РПЖ активируется за счет снижения кислорода в ткани и повышения чувствительности рецепторов

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа влияния экспрессии генов на развитие БР после РПЭ у больных локализованным РПЖ
Table 2. The results of dispersion analysis of gene expression effect on the development of BR after RPE in patients with localized prostate cancer

Кратность повышения экспрессии генов в ткани аденокарциномы простаты в основной группе по сравнению с группой сравнения Multiplicity of gene expression increase in prostate adenocarcinoma tissue in the study group compared to the experimental group	F	*p*
NFKB	9,89	<0,001
HIF1	6,74	<0,001
VEGFA	8,21	<0,001
VEGFB	1,15	0,95
BAX	1,73	0,87
BCL2	4,12	<0,01

Примечание: F – критерий Фишера; p – доверительная вероятность; NFKB (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) – ядерный фактор «каппа-би»; HIF1 (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) – фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа; VEGF (Vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов; BAX – белок BCL2, ассоциированный с X-протеином; BCL2 – белок B-клеточной лимфомы 2.

к андрогенам [18]. Согласно представлениям о паракринной системе регуляции, VEGF секретируется опухолевыми клетками, а мишенью для ростовых факторов являются рецепторы на эндотелиоцитах сосудов VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3. Причем выраженность экспрессии белка VEGF коррелировала с экспрессией антигена Ki-67 и индексом пролиферации опухолевых клеток [19]. То есть VEGF, кроме основной функции регуляции неоангиогенеза, при РПЖ выступает как ауто- и паракринный регулятор пролиферации опухолевых клеток аденокарциномы. Продукция белка VEGF раковыми клетками при РПЖ индуцируется различными внешними и внутренними факторами, среди которых гипоксия является ведущей [20]. Об однонаправленном усилении экспрессии *HIF1α* и VEGF в клетках РПЖ свидетельствовало наличие тесной и прямой корреляционной связи.

На следующем этапе работы с помощью метода дисперсионного анализа ANOVA изучали влияние изменения экспрессии генов у больных РПЖ по сравнению с контрольной группой на развитие раннего БР заболевания. Наличие или отсутствие БР ранжировали 1/0. Повышение экспрессии гена по сравнению с контрольной группой более чем в 1,5 раза обозначали как 2 балла, 1 балл — колебание относительной величины от 1 до 1,5 включительно, 0 баллов — варьирование от 0 до 1. В таблице 2 приведены значения критерия Фишера (F), характеризующие силу влияния изменения экспрессии генов на вероятность БР, а также представлены значения доверительной вероятности *p*, отражающие статистическую значимость влияния.

Таким образом, при развитии БР у больных локализованным РПЖ наблюдается повышение экспрессии генов в иерархии *NFKB1*, *VEGFA*, *HIF1α* и *BCL2* в клетках аденокарциномы ПЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных локализованным РПЖ с развитием БР ассоциировано усиление экспрессии генов *NFKB1* и *HIF1α*, контролирующих активность транскрипционных процессов, гена *VEGFA*, отвечающего за активацию синтеза сосудистого ростового фактора и неоангиогенез, а также антиапоптического гена *BCL2*. Выявление изменения экспрессии генов *NFKB1*, *VEGFA*, *HIF1α* и *BCL2* в опухолевом материале после РПЭ сопряжено с ранним развитием БР у больных локализованным РПЖ, что предъявляет повышенные требования к мониторингу таких пациентов.

Список литературы

1.Iommarini L, Ghelli A, Gasparre G, Porcelli AM. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2017 Aug;1858 (8):582–590. DOI: 10.1016/j.bbabio.2017.02.006

2.Гулиев Ф. А. Предикторы биохимического прогрессирования рака предстательной железы. Казанский медицинский журнал. 2017;98 (6):890–4. DOI: 10.17750/KMJ2017–890

3.Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Guy M, Morrison J, Severi G, et al. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. Nat Genet. 2009 Oct;41 (10):1058–60. DOI: 10.1038/ng.452

4.Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large scale variation in the human genome. Nat Genet. 2004 Sep;36 (9):949–51. DOI: 10.1038/ng1416

5.Kader T, Goode DL, Wong SQ, Connaughton J, Rowley SM, Devereux L, et al. Copy number analysis by low coverage whole genome sequencing using ultra low-input DNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue. Genome Med. 2016 Nov 15;8 (1):121. DOI: 10.1186/s13073–016–0375-z

6.Junnila S, Kokkola A, Karjalainen-Lindsberg M, Puolakkainen P, Monni O. Genome-wide gene copy number and expression analysis of primary gastric tumors and gastric cancer cell lines. BMC Cancer. 2010 Mar 1;10:73. DOI: 10.1186/1471–2407–10–73

7.Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. Nat Genet. 2007 Jul;39 (7 Suppl): S43–7. DOI: 10.1038/ng2084

8.Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. Nat Rev Genet. 2015 Mar;16 (3):172–83. DOI: 10.1038/nrg3871.

9.Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Mol Cell. 2010 Oct 22;40 (2):294–309. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.022

10. Maruyama W, Shirakawa K, Matsui H. Classical NF-kappa B pathway is responsible for APOBEC3 B expression in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 23;478 (3):1466–71. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.148.

11.Liu ZQ, Fang JM, Xiao YY, Zhao Y, Cui R, Hu F, Xu Q. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. Int J Clin Exp Med. 2015 Feb 15;8 (2):2289–98.

12.Rivera-Perez J, Monter-Vera M, Barrientos-Alvarado C, Toscano-Garibay JD, Cuesta-Mejías T, Flores-Estrada J. Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. Oncol Lett. 2018 Jan;15 (1):1072–1078. DOI: 10.3892/ol.2017.7374

13.Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM. Angiogenesis and Prostate Cancer: Identification of

A Molecular Progression Switch. Cancer Res. 2001 Mar 15;61 (6):2736–43.
14.Prior S, Kim A, Yoshihara T, Tobita S, Takeuchi T, Higuchi M. Mitochondrial respiratory function induces endogenous hypoxia. PLoS One. 2014 Feb 21;9 (2): e88911. DOI: 10.1371/journal.pone.0088911
15.Anvari K, Toussi MS, Kalantari M, Naseri S. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. Urol J. 2012 Winter;9 (1):381–8.
16.Renner W, Langsenlehner U, Krenn-Pilko S, Eder P, Langsenlehner T. BCL2 genotypes and prostate cancer survival. Strahlenther Onkol. 2017 Jun;193 (6):466–471. DOI: 10.1007/s00066–017–1126–9
17.Черняев В. А. VEGF и рак предстательной железы. РМЖ. Онкология. 2012;1:17–19.
18.Eisermann K, Fraizer G. The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. Cancers (Basel). 2017 Apr 10;9 (4). pii: E32. DOI: 10.3390/cancers9040032.
19.Ma T, Yang S, Jing H, Cong L, Cao Z, Liu Z, Huang Z. Apparent diffusion coefficients in prostate cancer: correlation with molecular markers Ki-67, HIF-1α and VEGF. NMR Biomed. 2018 Mar;31 (3). DOI: 10.1002/nbm.3884.
20.Ranasinghe WK, Sengupta S, Williams S, Chang M, Shulkes A, Bolton DM, et al. The effects of nonspecific HIF1α inhibitors on development of castrate resistance and metastases in prostate cancer. Cancer Med. 2014 Apr;3 (2):245–51. DOI: 10.1002/cam4.189

References

1. Iommarini L, Ghelli A, Gasparre G, Porcelli AM. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2017 Aug;1858 (8):582–590. DOI: 10.1016/j.bbabio.2017.02.006
2. Guliev FA. Predictors of biochemical recurrence of prostate cancer. Kazan Medical Journal. 2017;98 (6):890–4. DOI: 10.17750/KMJ2017–890 (In Russian).
3. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Guy M, Morrison J, Severi G, et al. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. Nat Genet. 2009 Oct;41 (10):1058–60. DOI: 10.1038/ng.452
4. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large scale variation in the human genome. Nat Genet. 2004 Sep;36 (9):949–51. DOI: 10.1038/ng1416
5. Kader T, Goode DL, Wong SQ, Connaughton J, Rowley SM, Devereux L, et al. Copy number analysis by low coverage whole genome sequencing using ultra low-input DNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue. Genome Med. 2016 Nov 15;8 (1):121. DOI: 10.1186/s13073–016–0375-z
6. Junnila S, Kokkola A, Karjalainen-Lindsberg M, Puolakkainen P, Monni O. Genome-wide gene copy number and expression analysis of primary gastric tumors and gastric cancer cell lines. BMC Cancer. 2010 Mar 1;10:73. DOI: 10.1186/1471–2407–10–73
7. Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. Nat Genet. 2007 Jul;39 (7 Suppl): S43–7. DOI: 10.1038/ng2084
8. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. Nat Rev Genet. 2015 Mar;16 (3):172–83. DOI: 10.1038/nrg3871.
9. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Mol Cell. 2010 Oct 22;40 (2):294–309. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.022
10. Maruyama W, Shirakawa K, Matsui H. Classical NF-kappa B pathway is responsible for APOBEC3 B expression in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 23;478 (3):1466–71. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.148.
11. Liu ZQ, Fang JM, Xiao YY, Zhao Y, Cui R, Hu F, Xu Q. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. Int J Clin Exp Med. 2015 Feb 15;8 (2):2289–98.
12. Rivera-Perez J, Monter-Vera M, Barrientos-Alvarado C, Toscano-Garibay JD, Cuesta-Mejías T, Flores-Estrada J. Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. Oncol Lett. 2018 Jan;15 (1):1072–1078. DOI: 10.3892/ol.2017.7374
13. Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM. Angiogenesis and Prostate Cancer: Identification of A Molecular Progression Switch. Cancer Res. 2001 Mar 15;61 (6):2736–43.
14. Prior S, Kim A, Yoshihara T, Tobita S, Takeuchi T, Higuchi M. Mitochondrial respiratory function induces endogenous hypoxia. PLoS One. 2014 Feb 21;9 (2): e88911. DOI: 10.1371/journal.pone.0088911
15. Anvari K, Toussi MS, Kalantari M, Naseri S. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. Urol J. 2012 Winter;9 (1):381–8.
16. Renner W, Langsenlehner U, Krenn-Pilko S, Eder P, Langsenlehner T. BCL2 genotypes and prostate cancer survival. Strahlenther Onkol. 2017 Jun;193 (6):466–471. DOI: 10.1007/s00066–017–1126–9
17. Chernjaev VA. VEGF and prostate cancer. RMJ (Russian Medical Journal). 2012;1:17–19. (In Russian).
18. Eisermann K, Fraizer G. The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. Cancers (Basel). 2017 Apr 10;9 (4). pii: E32. DOI: 10.3390/cancers9040032.
19. Ma T, Yang S, Jing H, Cong L, Cao Z, Liu Z, Huang Z. Apparent diffusion coefficients in prostate cancer: correlation with molecular markers Ki-67, HIF-1α and VEGF. NMR Biomed. 2018 Mar;31 (3). DOI: 10.1002/nbm.3884.
20. Ranasinghe WK, Sengupta S, Williams S, Chang M, Shulkes A, Bolton DM, et al. The effects of nonspecific HIF1α inhibitors on development of castrate resistance and metastases in prostate cancer. Cancer Med. 2014 Apr;3 (2):245–51. DOI: 10.1002/cam4.189

Информация об авторах:

Бова Филипп Сергеевич, к.м.н., докторант ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федераци. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2782-3288

Кит Олег Иванович, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3061-6108

Максимов Алексей Юрьевич, д.м.н., профессор, заместитель директора ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1397-837X

Information about authors:

Philip S. Bova, MD, PhD, doctoral candidate Rostov Research Institute of Oncology (RRIO). ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2782-3288

Oleg I. Kit, Member Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor, general director Rostov Research Institute of Oncology (RRIO). ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3061-6108

Aleksey Yu. Maksimov, MD, PhD, DSc, professor, deputy director Rostov Research Institute of Oncology (RRIO). ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1397-837X