

РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫЕ АНТИГЕНЫ В МОЧЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 Ю.М. Шляпников^{1*}, Е.А. Малахова¹, А.З. Винаров², Н.В. Потолдыкова²,
В.И. Владимиров³, Е.Ю. Зерний⁴, А.А. Замятнин мл.^{4,5,6}, Е.А. Шляпкинова¹

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: yuri.shlyapnikov@gmail.com*

² *Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,
Институт урологии и репродуктивного здоровья человека, 119991 Москва, Россия*

³ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117437 Москва, Россия*

⁴ *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия*

⁵ *Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,
Институт молекулярной медицины, 119991 Москва, Россия*

⁶ *Научно-технологический университет «Сириус»,
354340 Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Россия*

Поступила в редакцию 07.04.2022

После доработки 02.10.2022

Принята к публикации 13.10.2022

Недавно было показано, что комбинация зрительного аррестина с рековерином может служить эффективным мочевым биомаркером рака почки с чувствительностью и специфичностью выше 92%. В настоящей работе изучена возможность детекции указанных антигенов в моче при других урологических онкозаболеваниях – раке мочевого пузыря (РМП) и предстательной железы (РПЖ). С использованием ультрачувствительного иммуноанализа на микрочипах, имеющего предел детектирования 0,1 пг/мл, были проанализированы образцы мочи 40 больных РМП и 40 больных РПЖ. Показано, что при РМП чувствительность определения комбинации аррестина с рековерином составляет 58% (AUC 0,76; 95% доверительный интервал 0,66–0,86), в то время как при РПЖ – 60% (AUC 0,78; 95% доверительный интервал 0,68–0,88). Установлено, что у больных с РМП и РПЖ, имевших положительный результат анализа, после удаления опухоли указанные антигены в моче не обнаруживаются в 90% случаев. Полученные результаты в будущем могут стать основой для создания новых подходов для своевременного выявления рецидивов таких заболеваний и наблюдения за ходом лечения, а также для развития новых диагностических методов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: раково-сетчаточные антигены, иммуноанализ, урологические онкозаболевания, микрочипы, магнитные частицы.

DOI: 10.31857/S0320972522110100, EDN: LWНОКА

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в области молекулярной медицины, высокочувствительные и специфичные биомаркеры урологических онкозаболеваний практически отсутствуют. В настоящее время моча рассматривается в качестве уникального источника биомаркеров урологических онкозаболеваний, в первую очередь ввиду её прямого контакта

с опухолью. Немаловажно, что простой неинвазивный способ получения образцов, позволяющий избежать тяжёлых для пациента процедур, не требует дополнительной пробоподготовки. Потенциальные мочевые биомаркеры рака мочевыводящих путей подробно описаны в многочисленных работах [1–6]. Поиск новых белковых мочевых онкомаркеров представляется перспективным по нескольким причинам. Во-первых, наличие большого чис-

Принятые сокращения: ПСА – простатический специфический антиген; РМП – рак мочевого пузыря; РПЖ – рак предстательной железы; AUC – площадь под ROC-кривой; ROC – операционная характеристика приёмника.

* Адресат для корреспонденции.

ла хорошо отработанных методов иммунохимического анализа белков позволяет выбрать оптимальный метод детекции заданного биомаркера. Во-вторых, крайне низкое содержание белков в моче, в том числе по сравнению с кровью, облегчает проведение иммуноанализа. Наконец, антигены выделяются опухолью непосредственно в анализируемую среду, избегая разбавления в кровяном русле. В результате многолетних исследований мочевых белковых биомаркеров почечно-клеточного рака были выявлены наиболее перспективные индивидуальные биомаркеры, а также предложены панели, которые демонстрируют чувствительность, близкую к 100%. К ним относятся аквапорин-1 в комбинации с перилипином-2 (100% чувствительность и 95% специфичность) [7], комбинация белка, ингибирующего Raf-киназу, с его фосфорилированной формой [8] и др. В отношении рака мочевого пузыря было предложено множество диагностических тестов мочи, включая UBC-тест, UroVysion (FISH), тесты на основе определения ядерного матриксного белка (NMP22®), рецептора фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) и др. Все они имеют высокую чувствительность и специфичность [6], однако ни одна из предложенных систем не была рекомендована для клинической практики [9, 10]. Проанализировав эффективность как одиночных мочевых биомаркеров, так и панелей, составленных из комбинации белков для диагностики рака мочевого пузыря (РМП), мы предположили, что использование более чувствительных методов детекции может помочь открытию новых перспективных белковых онкомаркеров [6].

Рак предстательной железы (РПЖ) является ведущей причиной смерти мужчин от онкологических заболеваний [11]. Обычно его подозревают на основании пальцевого ректального исследования и/или наличия изменений уровней в сыворотке крови простатического специфического антигена (ПСА). Применение ПСА в качестве сывороточного маркера произвело революцию в диагностике РПЖ, несмотря на его ограниченную чувствительность и специфичность [12]. До сих пор ПСА остаётся единственным диагностическим биомаркером РПЖ, который рекомендован для широкого практического использования. В последние годы были предложены новые биомаркеры рака предстательной железы, определяемые в моче и плазме [13–16]. Из мочевых биомаркеров последнего поколения наибольшее внимание привлекают ПСА3 (Progenza), SelectMDx, MiPS и EchoDx [17]. Ряд тестов, например, ПСА3 и SelectMDx, направлен на выявление в моче

специфических мРНК. Согласно данным мета-анализа, чувствительность теста ПСА3 составляет 46,9–82,3%, специфичность – 56,3–89% [18]. SelectMDx показал обнадеживающие результаты с AUC, равной 0,90 [19]. Тест EchoDx Prostate (IntelliScore) предсказывает рак предстательной железы с AUC = 0,80 [20]. Однако в настоящее время как оценка MiPS, так и анализ EchoDx считаются экспериментальными. Таким образом, в целом можно говорить о том, что в настоящее время не существует методик определения каких-либо биомаркеров в моче, пригодных для достоверной диагностики РПЖ.

Известно, что некоторые фоторецепторные белки, такие как аррестин и рековерин, экспрессируются как раково-сетчаточные антигены опухолями различных типов. Это подтверждено определением как антигенов в самих опухолевых тканях, так и аутоантител к ним в сыворотке крови [21, 22]. Недавно мы показали, что комбинация аррестина с рековерином может служить эффективным мочевым биомаркером рака почки с чувствительностью 96% и специфичностью 92% [23]. В то же время моча может контактировать с опухолью и при других урологических онкозаболеваниях, в том числе при РМП и РПЖ. В настоящей работе мы определили уровни аррестина и рековерина в моче 80 больных раком мочевого пузыря и предстательной железы и сравнили их с результатами анализа 50 пациентов с урологическими незлокачественными заболеваниями. Кроме того, нами были проанализированы образцы мочи больных РМП и РПЖ до и после удаления опухоли. Для решения этих задач в работе был использован мультиплексный иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками, имеющий предел обнаружения 0,1 пг/мл [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Реагенты и мембрана из регенерированной целлюлозы (толщина 40 мкм) приобретены в «Sigma-Aldrich» США. Карбоксилированные магнитные частицы (Dynabeads MyOne, диаметр 1 мкм) приобретены в «Invitrogen» США. Получение рекомбинантных антигенов и антител описано ранее [6, 23].

Пациенты и образцы. Сбор образцов проводился в Институте урологии и репродуктивного здоровья Сеченовского университета в 2019–2021 гг. Образцы мочи хранили при –80 °С. Диагноз РМП и РПЖ подтверждался гистологическим исследованием образцов ткани, полученных в ходе оперативного лечения. Среди больных РМП было 32 мужчины и 8 женщин;

медианный возраст (диапазон) составил 66 (30–86) и 68 (48–81) лет для больных РМП и РПЖ соответственно. Количество больных РМП с разными стадиями опухоли составили: T1 – 32, T2 – 2, T3 – 1, T4 – 5 (T1 соответствует наиболее лёгкой стадии с наименьшим размером опухоли); в случае РПЖ: T1 – 38, T2 – 1, T3 – 1, T4 – 0. У всех пациентов метастазы в отдалённые органы и лимфоузлы отсутствовали. В контрольной группе 25 пациентов имели диагноз мочекаменная болезнь, 18 – доброкачественная гиперплазия предстательной железы, 3 – стриктура уретры, 3 – гидронефроз и 1 – кисты почки [23]. Содержание ПСА в сыворотке больных РПЖ определяли с помощью стандартных коммерческих наборов.

Проведение иммуноанализа. Процедура изготовления белковых микрочипов описана ранее [20]. Микрочипы помещали в пробирки с мочой (1–1,5 мл) и инкубировали в течение ночи при +4 °С с вращением со скоростью 20 об./мин. Микрочип промывали водой и фиксировали в проточной ячейке, описанной ранее [24], под которую устанавливали магнит (рис. 1, а). Суспензию магнитных частиц, конъюгированных с антителами к аррестину и рековерину, с общей концентрацией 0,001% прокачивали через ячейку в течение 2–3 мин. Изображения микрочипа получали с помощью оптического микроскопа Микмед-6 («ЛОМО», Россия) с темнопольным осветителем и обрабатывали, как описано ранее [25] с некоторыми модификациями [23]. При этом в каждом эксперименте анализировалось большое число (до 1000) связанных на поверхности микрочипа магнитных частиц, что позволило определить

статистическую значимость результата анализа для каждого образца мочи.

Статистическая обработка результатов. Для оценки различий между опытными и контрольными группами использовали χ^2 -тест; для определения различий в содержании аррестина и рековерина до и после операции – критерий знаков; для определения различий в содержании ПСА – критерий Манна–Уитни. Расчёты осуществлялись в OriginPro 2018. Варьируя значение пороговой концентрации (0,1; 0,3; 1; 3; 10 пг/мл), строили ROC-кривые (receiver operator characteristic), представляющие собой зависимость доли истинно положительных от доли ложноположительных результатов. Для оценки предсказательной способности биомаркеров определяли площадь под ROC-кривой (AUC, area under curve). По построению, площадь под кривой, равная 1, соответствует идеальной предсказательной способности, а при AUC, равной 1/2, предсказательная способность полностью отсутствует. Для оценки доверительных интервалов значений AUC использовали биномиальную модель [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для мультиплексного иммуноанализа методом электрораспыления были изготовлены микрочипы на низкоадгезивной мембране из регенерированной целлюлозы [24]. Описанная технология позволяет параллельно изготавливать до 100 микрочипов с минимальным расходом антител – около 10 нг на один микрочип. На основе таких микрочипов нами была раз-

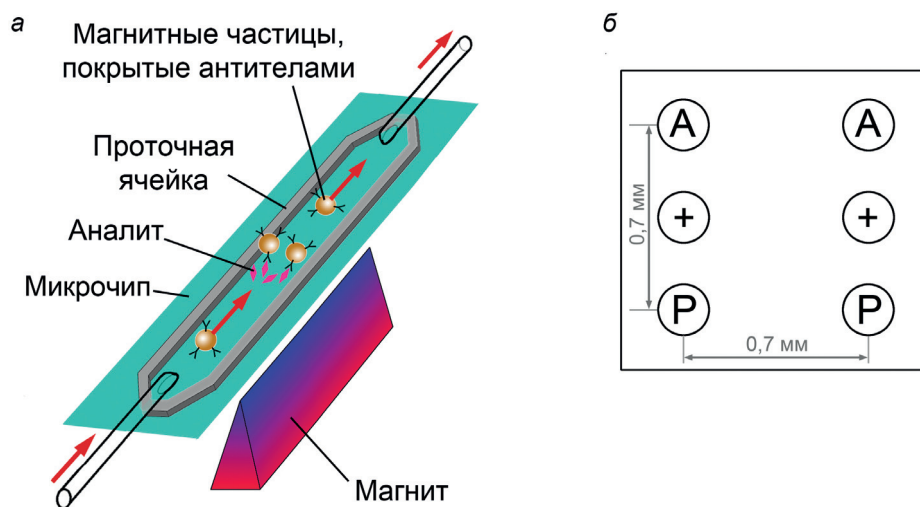


Рис. 1. Иммуноанализ на микрочипах. а – Схема ультразвуковой детекции сигнала на микрочипе с помощью магнитных частиц, покрытых специфическими антителами. Стрелки указывают траекторию движения магнитных частиц. б – Схема микрочипа. Обозначения активных зон: А – моноклональные антитела к аррестину, Р – поликлональные антитела к рековерину, + – положительный контроль (рекомбинантный рековерин). Роль отрицательного контроля выполняет пространство между активными зонами микрочипа

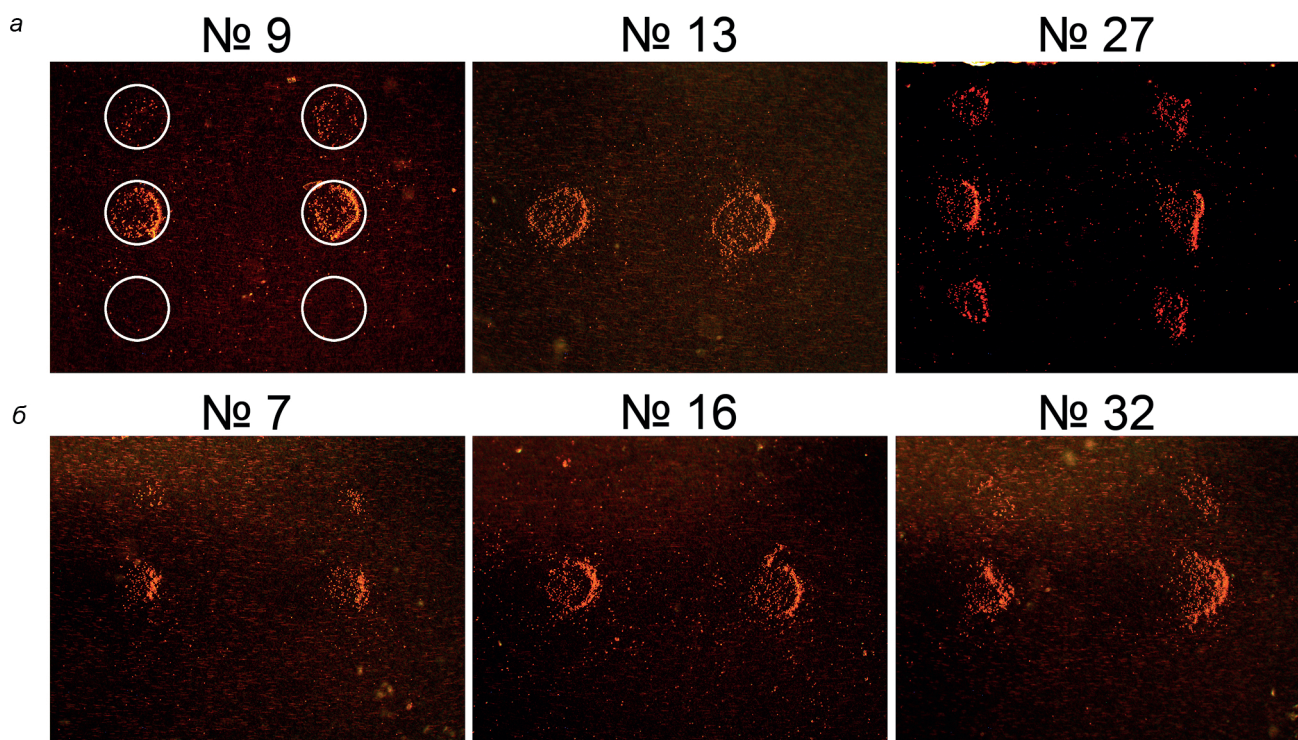


Рис. 2. Репрезентативные примеры результатов анализа образцов мочи, полученных от больных РМП (*а*) и РПЖ (*б*). Номера образцов соответствуют указанным в табл. S1 и S2 в Приложении. На верхней левой фотографии отмечены зоны, в которых анализируется сигнал

работана ультрачувствительная тест-система для определения раково-сетчаточных антигенов [23]. На рис. 1, *а* приведено схематическое изображение ячейки, использованной в иммуноанализе, и схема детекции сигнала на микрочипе. В настоящем исследовании микрочипы включали активные зоны антител к аррестину и рековерину, а также зоны положительного

контроля в двух повторах (рис. 1, *б*). В качестве положительного контроля использовался один из исследуемых антигенов, а именно рекомбинантный рековерин. На первом этапе был определён предел детектирования аррестина и рековерина в контрольном образце мочи, в котором данные антигены изначально отсутствовали. Он составил 0,1 пг/мл для обоих антигенов.

Таблица 1. Характеристики эффективности определения аррестина, рековерина и их комбинации в моче больных РМП и РПЖ

Биомаркер	Характеристика	Рак мочевого пузыря	Рак предстательной железы
Аррестин	чувствительность ¹	30% ($n = 40$)	53% ($n = 40$)
	специфичность ²	94% ($n = 50$)	
	AUC ³	0,63 (0,51–0,75)	0,74 (0,63–0,85)
Рековерин	чувствительность ¹	38% ($n = 40$)	13% ($n = 40$)
	специфичность ²	96% ($n = 50$)	
	AUC ³	0,67 (0,55–0,79)	0,54 (0,42–0,66)
Комбинация аррестина с рековерином	чувствительность ¹	58% ($n = 40$)	60% ($n = 40$)
	специфичность ²	92% ($n = 50$)	
	AUC ³	0,76 (0,66–0,86)	0,78 (0,68–0,88)

Примечание. ¹ Значения чувствительности и специфичности рассчитаны для пороговой концентрации 0,1 пг/мл.

² Специфичность определяли для контрольной группы из 50 урологических больных, не имеющих злокачественных образований [23].

³ В скобках указаны значения 95% доверительного интервала.

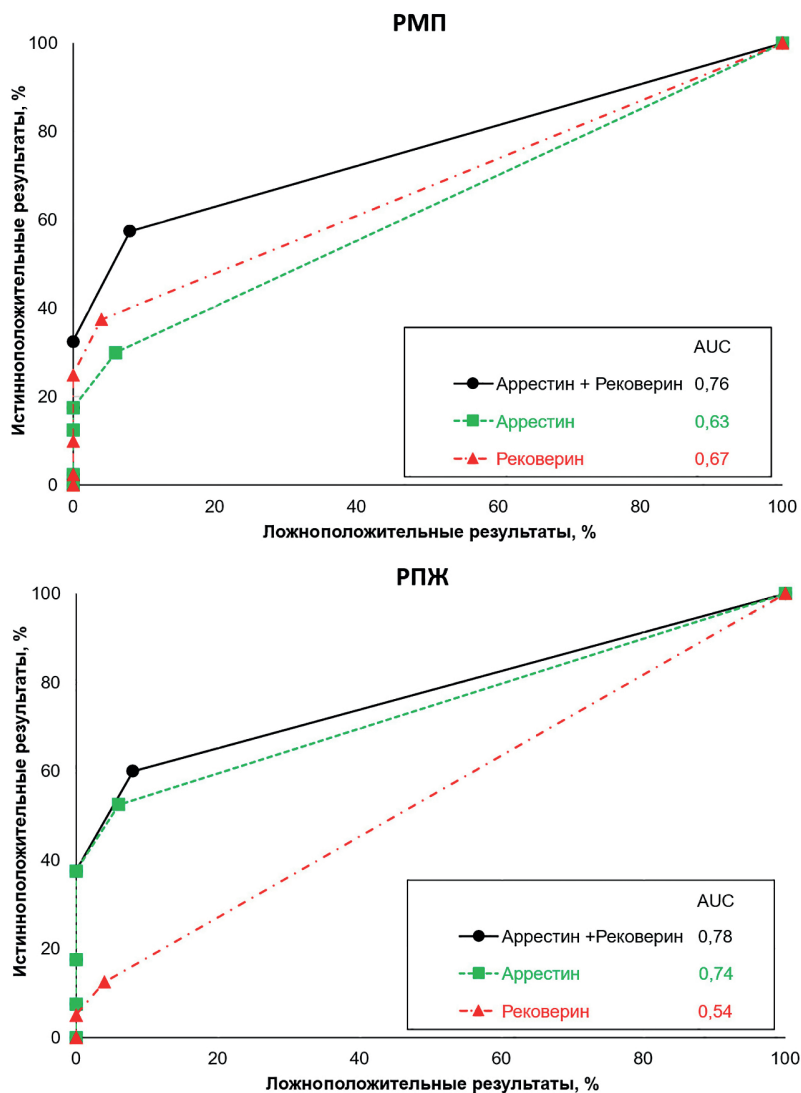


Рис. 3. ROC-кривые для определения раково-сетчаточных антигенов при РМП и РПЖ. Результаты статистической обработки ROC-кривых (доверительные интервалы для значений AUC) содержатся в табл. 1

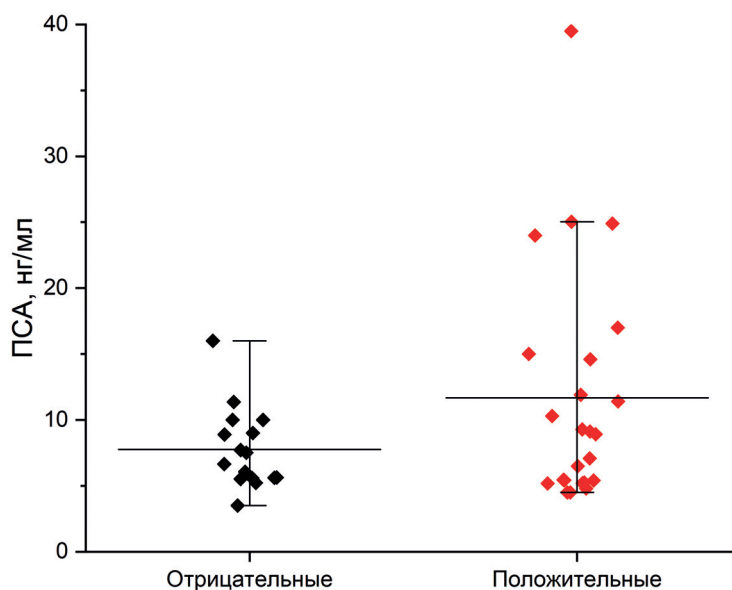


Рис. 4. Сравнение содержания ПСА в образцах сыворотки пациентов с положительным и отрицательным анализом мочи на аррестин и рековерин. Приведены медианы и 5–95% перцентили

Далее, были построены калибровочные кривые, позволяющие проводить полуколичественное измерение концентрации белков с точностью $\frac{1}{2}$ десятичного порядка [23]. Надо отметить, что высокая чувствительность иммуноанализа достигается благодаря детекции сигнала покрытыми специфическими антителами магнитными частицами, которые в ламинарном потоке при приложении магнитного поля сканируют поверхность микрочипа. Такой способ проведения анализа, как мы показали ранее, позволяет выявлять даже единичные межмолекулярные взаимодействия [27].

Всего в работе на присутствие зрительно-го аррестина и рековерина было проанализировано 40 образцов мочи больных РМП и 40 образцов больных РПЖ. Репрезентативные фотографии микрочипов, полученные в результате анализа образцов мочи пациентов с указанными заболеваниями, представлены на рис. 2.

На рис. 3 приведены ROC-кривые и соответствующие значения площади под кривой (AUC) для аррестина и рековерина в отдельности и для их комбинации. Как и в случае рака почки [23], полуколичественный характер

Таблица 2. Результаты анализа образцов мочи, полученных от больных РМП перед операцией и через 7 дней после операции

Пациент #	Аррестин, пг/мл		Рековерин, пг/мл	
	до операции	после операции	до операции	после операции
1	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
2	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
3	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
4	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
5	0,3–1,0	<0,1	<0,1	<0,1
6	<0,1	<0,1	0,3–1,0	<0,1
7	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
8	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
9	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
10	<0,1	0,3–1,0	1–3	<0,1

Примечание. # Номера образцов соответствуют указанным в табл. S1 и S2 в Приложении. Различия в содержании аррестина и рековерина до и после операции являются статистически значимыми ($p < 0,01$).

Таблица 3. Результаты анализа образцов мочи, полученных от больных РПЖ перед операцией и через 7 дней после операции

Пациент #	Аррестин, пг/мл		Рековерин, пг/мл	
	до операции	после операции	до операции	после операции
1	3–10	<0,1	1–3	<0,1
2	1–3	<0,1	<0,1	<0,1
3	0,3–1,0	<0,1	<0,1	<0,1
4	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
5	0,1–0,3	0,1–0,3	<0,1	<0,1
6	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
7	0,1–0,3	<0,1	<0,1	<0,1
8	<0,1	<0,1	0,1–0,3	<0,1
9	1–3	<0,1	<0,1	<0,1
10	0,3–1,0	<0,1	<0,1	<0,1

Примечание. # Номера образцов соответствуют указанным в табл. S1 и S2 в Приложении. Различия в содержании аррестина и рековерина до и после операции являются статистически значимыми ($p < 0,01$).

используемого метода объясняет небольшое количество доступных значений пороговой концентрации – 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 пг/мл. Очевидно, что оптимальным является минимальное значение пороговой концентрации 0,1 пг/мл. В табл. 1 указаны доверительные интервалы для значений AUC, а также значения чувствительности и специфичности определения аррестина и рековерина, отвечающие порогу концентрации 0,1 пг/мл. Исходные данные для вычисления указанных значений приведены в табл. S1 и S2 в Приложении.

В данной работе мы проанализировали также по 10 образцов мочи, взятой через 7 дней после удаления опухоли у больных с РМП и РПЖ, у которых тест на раково-сетчаточные антигены до операции был положительным. Результаты анализа приведены в табл. 2 и 3. Как в случае РМП, так и РПЖ в 90% образцов больных после операции аррестин с рековерином не были обнаружены.

Наконец, мы исследовали корреляцию содержания традиционного биомаркера ПСА в сыворотке крови и аррестина и рековерина в моче у больных РПЖ. Для этого мы сравнили содержание ПСА в сыворотке пациентов, имеющих положительный и отрицательный анализ мочи на аррестин и рековерин (рис. 4). Показано, что для больных, в моче которых детектированы данные антигены, характерен более высокий уровень ПСА, хотя различие не является статистически значимым ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы определили содержание раково-сетчаточных антигенов – аррестина и рековерина – в моче больных РМП и РПЖ и пациентов с доброкачественными урологическими заболеваниями и сравнили их с результатами, полученными ранее для больных раком почки [23]. Из данных, полученных в результате анализа 40 образцов больных РМП и представленных на рис. 3, можно сделать вывод о том, что лучшей предсказательной способностью, как и ожидалось, обладает комбинация биомаркеров: значение AUC повышается с 0,63 – для аррестина и 0,67 – для рековерина до 0,76. Совсем другая картина наблюдалась при исследовании 40 образцов мочи больных РПЖ. Показано, что эффективность рековерина в качестве потенциального биомаркера РПЖ близка к нулю (AUC = 0,54). В результате предсказательная способность комбинации рековерина с арре-

стином для РПЖ оказалась такой же, как для самого аррестина (AUC = 0,78 и 0,74 соответственно). Для объяснения этих результатов требуется детальное понимание механизмов, управляющих aberrантной экспрессией раково-сетчаточных антигенов различными типами раковых клеток, однако пока эти механизмы остаются невыясненными. В работах Golovastova et al. [22] и Vazhin et al. [28] показана роль деметилирования CpG в промоторной области гена рековерина в регуляции его aberrантной экспрессии в клетках рака почки, меланомы и других типов рака. Примечательно, что некоторые образцы опухолей с неизменённым статусом метилирования ДНК промотора рековерина оказались тем не менее способными продуцировать белок [22]. Это не исключает описанного эпигенетического механизма, однако предполагает наличие альтернативных путей, регулирующих экспрессию рековерина в злокачественных опухолях.

Помимо уровня экспрессии биомаркеров в опухолях различных типов, на диагностическую эффективность может влиять способность биомаркеров экстрагироваться из опухолевой ткани в мочу. Полученные нами результаты могут быть частично объяснены с учётом этого обстоятельства. Обобщая данные по содержанию аррестина и рековерина в моче при различных урологических онкозаболеваниях, можно заключить, что предсказательная способность раково-сетчаточных антигенов существенно выше в случае рака почки, чем для РМП и РПЖ. Вместе с тем, согласно литературным данным, одиночные биомаркеры рака простаты в среднем уступают по чувствительности и предиктивной способности биомаркерам рака почки и мочевого пузыря [6, 17–20]. Надо отметить, что единственный широко применяемый в клинической практике белковый биомаркер, ПСА в крови, имеет весьма низкую предсказательную способность (AUC = 0,67) [29], то есть ниже предсказательной способности комбинации аррестина и рековерина в моче. Известно, что при РПЖ опухоль локализуется преимущественно в периферической зоне предстательной железы [30], из которой массоперенос белков в мочу может быть затруднён по анатомическим причинам. В то же время в случае рака почки развитая внутренняя поверхность, эффективно омываемая мочой, способствует более полной экстракции биомаркеров. Ткани мочевого пузыря также хорошо омываются мочой, однако плотный барьерный слой эпителиальных клеток пузыря может затруднять диффузию веществ, особенно срав-

нительно гидрофобных белков, таких как раково-сетчаточные антигены. Этим может объясняться их невысокая диагностическая эффективность в случае РМП по сравнению с раком почки.

Однако, несмотря на указанные проблемы, мочевые биомаркеры белковой природы представляются более перспективными для диагностики урологических онкозаболеваний по сравнению с биомаркерами крови. Как было показано ранее [23], определение аррестина и рековерина в сыворотке крови неэффективно вследствие низкой специфичности анализа. Вероятно, высокое содержание белков в крови мешает получению специфического сигнала при ультрачувствительном иммуноанализе. Если сравнить уровень содержания ПСА в крови и моче, оказывается, что у здоровых мужчин среднее значение в 200 раз выше в моче, чем в крови: 800 нг/мл против 4 нг/мл [31], а у больных РПЖ концентрация ПСА в моче может превышать 900 нг/мл [32]. Очевидно, что в случае урологических онкозаболеваний концентрация выделяемых опухолью белковых биомаркеров в моче существенно выше по сравнению с кровью, что, в сочетании с более низким содержанием общего белка в моче, может способствовать более высокой диагностической эффективности мочевых биомаркеров.

Оценку специфичности аррестина, рековерина и их комбинации проводили на основании результатов анализа образцов 50 пациентов, не имеющих злокачественных или доброкачественных опухолей почки и мочевого пузыря, таких как онкоцитома; однако в группе было 13 больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, и в 2 образцах таких больных был детектирован аррестин [23]. Доля положительных анализов в случае гиперплазии предстательной железы оказалась существенно ниже ($2/13 = 15\%$), чем в случае РПЖ (60%), но больше, чем для контрольной группы пациентов, у которых доброкачественные урологические опухоли отсутствовали ($2/37 = 5\%$). Хотя малая выборка не позволяет говорить о статистической достоверности результатов, тем не менее они согласуются с литературными данными [21, 22], в которых показана экспрессия аррестина и рековерина в доброкачественных урологических опухолях. Стоит отметить, что концентрация ПСА в крови также может повышаться при доброкачественных заболеваниях предстательной железы [29]. Вместе с тем систематическое изучение возможности дифференциальной диагностики доброкачественных и

злокачественных опухолей по раково-сетчаточным антигенам, а также урологических и неурологических онкозаболеваний является самостоятельной задачей.

Наконец, следует обсудить перспективы использования аррестина и рековерина в качестве предиктивных биомаркеров. После удаления опухоли у больных с РМП и РПЖ аррестин с рековерином в моче не детектируются в 90% случаев. Это наблюдение согласуется с результатами, полученными ранее для больных почечно-клеточным раком [23], и подтверждает опухолевое происхождение обнаруживаемых в моче аррестина и рековерина. Данный факт выгодно отличает раково-сетчаточные антигены от многих других биомаркеров, в частности, ПСА, концентрация которого в моче оставалась довольно высокой (в среднем 21,4 нг/мл) даже после удаления предстательной железы [31], и может иметь большое практическое значение, например, для отслеживания эффективности лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе установлено, что при РМП и РПЖ из опухоли в мочу могут выделяться раково-сетчаточные антигены – аррестин и рековерин – в концентрации менее 1 пг/мл, которые не могут быть детектированы традиционными методами иммуноанализа, такими как ИФА, Вестерн-блоттинг или иммунохроматография. Эффективным методом выявления антигенов в столь низких концентрациях является «активный» иммуноанализ на микрочипах с магнитными метками, не требующий дорогостоящего оборудования и большого расхода антител. Выявление аррестина и рековерина в моче пациента позволяет подозревать как рак почки, так и рак мочевого пузыря и предстательной железы. Это означает, что в случае положительного теста на данные антигены больному требуется пройти дополнительное обследование для дифференциальной диагностики этих урологических онкозаболеваний. Важно отметить, что аррестин с рековерином могут рассматриваться и как потенциальные неинвазивные биомаркеры для оценки состояния послеоперационных больных и эффективности проводимого лечения. В связи с этим мы предполагаем, что описанный в настоящей работе тест по новым мочевым биомаркерам может представлять интерес для специалистов, работающих в области урологической онкологии, и в перспективе может быть использован в клинической практике.

Вклад авторов. Ю.М.Ш., А.З.В., А.А.З. – концепция и руководство работой; Ю.М.Ш., Е.А.М., Е.А.Ш. – проведение экспериментов; Н.В.П. – сбор и обработка образцов; В.И.В. и Е.Ю.З. – получение антител и антигенов; Ю.М.Ш., А.З.В., А.А.З. – обсуждение результатов исследования; Е.А.Ш. и Ю.М.Ш. – написание текста; Ю.М.Ш., Е.Ю.З. – редактирование финального текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все исследования проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г., пересмотренной в 2008 г.; они были также одобрены Этическим комитетом Сеченовского университета (№ 10-18; 17/11/2018). От всех пациентов было получено добровольное письменное согласие на участие в исследовании.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Flitcroft, J. G., Verheyen, J., Vemulkar, T., Welbourne, E. N., Rossi, S. H., et al. (2022) Early detection of kidney cancer using urinary proteins: a truly non-invasive strategy, *BJU Int.*, **129**, 290-303, doi: 10.1111/bju.15601.
2. Dakubo, G. D. (2019) *Cancer Biomarkers in Body Fluids (Biomarkers in Proximal Fluids)*, Springer, doi: 10.1007/978-3-030-24725-6.
3. Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A., Vasdev, N. (2020) Urinary biomarkers in bladder cancer: a review of the current landscape and future directions, *Urol. Oncol.*, **39**, 1-11, doi: 10.1016/j.urolonc.2020.08.016.
4. Maas, M., Bedke, J., Stenzl, A., and Todenhöfer, T. (2019) Can urinary biomarkers replace cystoscopy? *World J. Urol.*, **37**, 1741-1749, doi: 10.1007/s00345-018-2505-2.
5. Batista, R., Vinagre, N., Meireles, S., Vinagr, E. J., Prazeres, H., Leão, R., et al. (2020) Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: a comprehensive review, *Diagnostics*, **10**, 39, doi: 10.3390/diagnostics10010039.
6. Shlyapnikov, Y. M., Malakhova, E. A., Vinarov, A. Z., Zamyatnin, A. A., and Shlyapnikova, E. A. (2021) Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 620687, doi: 10.3389/fmolb.2020.620687.
7. Morrissey, J. J., Mellnick, V. M., Luo, J., Siegel, M. J., Figenshau, R. S., et al. (2015) Evaluation of urine aquaporin-1 and perilipin-2 concentrations as biomarkers to screen for renal cell carcinoma: a prospective cohort study, *JAMA Oncol.*, **1**, 204-212, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0213.
8. Papale, M., Vocino, G., Lucarelli, G., Rutigliano, M., Gigante, M., et al. (2017) Urinary RKIP/p-RKIP is a potential diagnostic and prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget*, **8**, 40412-40424, doi: 10.18632/oncotarget.16341.
9. URL: <https://uroweb.org/guidelines/> EAU Guidelines 2022.
10. Babjuk, M., Burger, M., Compérat, E., Gontero, P., Mostafid, A. H., Palou, J., et al. (2019) European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and CIS), *Eur. Urol.*, **76**, 639-657, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.016.
11. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H., and Jemal, A. (2021) Cancer Statistics, 2021, *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 7-33, doi: 10.3322/caac.21654.
12. Koo, K. M., Mainwaring, P. N., Tomlins, S. A., and Trau, M. (2019) Merging new-age biomarkers and nanodiagnosics for precision prostate cancer management, *Nat. Rev. Urol.*, **16**, 302-317, doi: 10.1038/s41585-019-0178-2.
13. Eskra, J. N., Rabizadeh, D., Pavlovich, C. P., Catalona, W. J., and Luo, J. (2019) Approaches to urinary detection of prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **22**, 362-381, doi: 10.1038/s41391-019-0127-4.
14. Fujita, K., and Nonomura, N. (2018) Urinary biomarkers of prostate cancer, *Int. J. Urol.*, **25**, 770-779, doi: 10.1111/iju.13734.
15. Hendriks, R. J., van Oort, I. M., and Schalken, J. A. (2017) Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **20**, 12-19, doi: 10.1038/pcan.2016.59.
16. Cooperberg, M. R., Carroll, P. R., Dall'Era, M. A., Davies, B. J., Davis, J. W., et al. (2019) The state of the science on prostate cancer biomarkers: the San Francisco consensus statement, *Eur. Urol.*, **76**, 268-272, doi: 10.1016/j.eururo.2019.05.013.
17. Salciccia, S., Capriotti, A. L., Laganà, A., Fais, S., Logozzi, M., et al. (2021) Biomarkers in prostate cancer diagnosis: from current knowledge to the role of metabolomics and exosomes, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4367, doi: 10.3390/ijms22094367.
18. Luo, Y., Gou, X., Huang, P., and Mou, C. (2014) Prostate cancer antigen 3 test for prostate biopsy decision: a systematic review and meta-analysis, *Chin. Med. J. (Engl)*, **127**, 1768-1774.
19. Van Neste, L., Hendriks, R. J., Dijkstra, S., Trooskens, G., Cornel, E. B., et al. (2016) Detection of high-grade

- prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score, *Eur. Urol.*, **70**, 740-748, doi: 10.1016/j.eururo.2016.04.012.
20. Donovan, M. J., Noerholm, M., Bentink, S., Belzer, S., Skog, J., et al. (2015) A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **18**, 370-375, doi: 10.1038/pcan.2015.40.
 21. Baldin, A. V., Grishina, A. N., Korolev, D. O., Kuznetsova, E. B., Golovastova, M. O., et al. (2019) Autoantibody against arrestin-1 as a potential biomarker of renal cell carcinoma, *Biochimie*, **157**, 26-37, doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.019.
 22. Golovastova, M. O., Tsoy, L. V., Bocharnikova, A. V., Korolev, D. O., Gancharova, A. S., et al. (2016) The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors, *Tumour Biol.*, **37**, 9899-9907, doi: 10.1007/s13277-016-4885-5.
 23. Shlyapnikov, Y. M., Malakhova, E. A., Potoldykova, V. I., Svetocheva, Y. A., Vinarov, A. Z., et al. (2022) Non-invasive kidney cancer diagnostics using ultrasensitive immunodetection of cancer-retina antigens, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 658-666, doi: 10.1134/S0006297922070070.
 24. Morozov, V. N., and Morozova, T. Y. (2006) Active bead-linked immunoassay of protein microarrays, *Anal. Chim. Acta*, **564**, 40-52, doi: 10.1016/j.aca.2005.09.068.
 25. Shlyapnikov, Y. M., Shlyapnikova, E. A., Simonova, M. A., Shepelyakovskaya, A. O., Brovko, F. A., et al. (2012) Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins, *Anal. Chem.*, **84**, 5596-6603, doi: 10.1021/ac300567f.
 26. Hanley, J. A., and McNeil, B. J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, *Radiology*, **143**, 29-36, doi: 10.1148/radiology.143.1.7063747.
 27. Shlyapnikov, Y. M., Kanev, I. L., and Shlyapnikova, E. A. (2020) Rapid ultrasensitive gel-free immunoblotting with magnetic labels, *Anal. Chem.*, **92**, 4146-4153, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00314.
 28. Bazhin, A. V., De Smet, C., Golovastova, M. O., Schmidt, J., and Philippov, P. P. (2010) Aberrant demethylation of the recoverin gene is involved in the aberrant expression of recoverin in cancer cells, *Exp. Dermatol.*, **19**, 1023-1025, doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01126.x.
 29. Hoffman, R. M., Gilliland, F. D., Adams-Cameron, M., Hunt, W. C., and Key, C. R. (2002) Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice, *BMC Fam. Pract.*, **3**, 19, doi: 10.1186/1471-2296-3-19.
 30. Sato, S., Kimura, T., Onuma, H., Egawa, S., and Takahashi, H. (2020) Transition zone prostate cancer is associated with better clinical outcomes than peripheral zone cancer, *BJUI Compass.*, **2**, 169-177, doi: 10.1002/bco2.47.
 31. Sato, I., Morihisa, S., Ishiwari, A., Nishijima, H., Ito, E., et al. (2002) Use of the "SMITEST" PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine, *Forensic Sci. Int.*, **127**, 71-74, doi: 10.1016/s0379-0738(02)00111-1.
 32. Iwakiri, J., Granbois, K., Wehner, N., Graves, H. C., and Stamey, T. (1993) An analysis of urinary prostate-specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate-specific antigen by the periurethral glands, *J. Urol.*, **149**, 783-786, doi: 10.1016/s0022-5347(17)36207-9.

CANCER-RETINA ANTIGENS IN THE URINE OF BLADDER AND PROSTATE CANCER PATIENTS

**Yu. M. Shlyapnikov^{1*}, E. A. Malakhova¹, A. Z. Vinarov², N. V. Potoldykova², V. I. Vladimirov³,
E. Yu. Zernii⁴, A. A. Zamyatnin, Jr.^{4,5,6}, and E. A. Shlyapnikova¹**

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russi; E-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com*

² *Institute for Urology and Reproductive Health, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117437 Moscow, Russia*

⁴ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

⁵ *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

⁶ *Sirius University of Science and Technology, 354340 Krasnodar Region, Federal Territory Sirius, Russia*

It has recently been shown that combination of arrestin and recoverin can serve as an effective urinary biomarker for renal cell carcinoma with sensitivity and specificity of over 92%. In this work, we studied the possibility of detecting these antigens in the urine in other urological oncological diseases – bladder

cancer (BC) and prostate cancer (PCa). Urine samples from 40 BC patients and 40 PCa patients were analyzed using an ultrasensitive microarray immunoassay with a detection limit of 0.1 pg/ml. It was shown that in BC the sensitivity of determining the combination of arrestin with recoverin is 58% (AUC 0.76, 95% CI 0.66-0.86), while in PCa it is 60% (AUC 0.7, 95% CI 0.68-0.88). It has been established that in patients with bladder and prostate cancer who had a positive test, these antigens are not detected in 90% of cases after removal of the tumor. In the future, the obtained results could become the basis for developing new approaches for timely detection of relapses of such diseases and treatment control, as well as for the development of new diagnostic methods.

Keywords: cancer-retina antigens, immunoassay, urological cancer, microarrays, magnetic particles