

Маркеры *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A* в диагностике рака предстательной железы: результаты исследования

А.В. Сивков¹, Н.Г. Кешишев¹, О.В. Меринова¹, С.Е. Северин², М.В. Савватеева³,
Е.М. Кузнецова², А.А. Раевская³, А.Д. Каприн⁴

¹Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина - Филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

²ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Россия

³Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

⁴ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

Сведения об авторах:

Сивков А.В. – к.м.н., заместитель директора научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. e-mail:uroinfo@yandex.ru

Sivkov A.V. – PhD, assistant director of N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russian Federation. e-mail:uroinfo@yandex.ru

Кешишев Н.Г. – к.м.н., заведующий инновационным отделом научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. e-mail:uronika@mail.ru

Keshishev N.G. – PhD, head of innovative department of N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russian Federation. e-mail:uronika@mail.ru

Меринова О.В. – младший научный сотрудник отдела эндоурологии научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. e-mail:ovs3@yandex.ru

Merinova O.V. – minor scientific staff in department of endourology of N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russian Federation. e-mail:ovs3@yandex.ru

Северин С.Е. – д.х.н., член-корреспондент РАН, генеральный директор ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Россия

Severin S.E. – Dr. Sc., corresponding member of Russian Academy of science, director of Research institute of medical ecology

Савватеева М.В. – научный сотрудник биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. e-mail:savvateeva@ya.ru

Savvateeva M.V. – scientific staff in biological faculty in MSU of Lomonosov. e-mail:savvateeva@ya.ru

Кузнецова Е.М. – к.м.н., научный сотрудник ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии Департамента здравоохранения г. Москвы. e-mail:ursula44@yandex.ru

Kuznetsova E.M. – PhD, scientific staff in Research institute of medical ecology. e-mail:ursula44@yandex.ru

Раевская А.А. – аспирант биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. e-mail:araevskaia@gmail.com

Raevskaya A.A. – postgraduate student in MSU of Lomonosov. e-mail:araevskaia@gmail.com

Каприн А.Д. – д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

Kaprin A.D. – Dr. Sc., professor, member of Russian Academy of science, director of Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russian Federation

Разработка и внедрение в клиническую практику программ ранней диагностики рака предстательной железы (РПЖ) является не только важной медицинской, но и большой социальной и экономической задачей государственного значения.

Около 30 лет назад тест PSA перевернул диагностику РПЖ, вызвав, при этом, значительный подъем частоты обнаружения заболевания на более ранних, курабельных стадиях [1,2,3]. Однако убедительные данные исследований свидетельствуют о недостаточной диагностической значимости данного маркера [4]. Кроме того, опубликованные наблюдения предоставили неоднозначные результаты о роли изучения PSA в снижении смертности от РПЖ [5,6]. Также, в связи с низкой специфичностью теста PSA, особую сложность представляет вопрос проведения

биопсий, в особенности повторных, при уровне PSA в «серой зоне» (4-10 нг/мл) [7]. Актуальным является поиск новых маркеров РПЖ и разработка на их основе тест-систем.

На сегодняшний день выявлено более 90 различных генов и их продуктов, потенциально вовлеченных в развитие РПЖ и способных, в той или иной степени, считаться маркерами данного заболевания [8-13]. Изменения ткани предстательной железы (ПЖ) в процессе малигнизации затрагивают все основные клеточные функции и находят отражение на различных уровнях клеточных структур и процессов, таких как цитоморфологические изменения, изменения в уровне экспрессии генов и их продуктов, эпигенетические изменения.

При злокачественных заболеваниях ПЖ одними из наиболее значимых событий на молекулярном уровне являются эпигенетические изменения, в частности, статуса метили-

рования ДНК [10-20]. Установлено, что опухоль-специфическое гиперметилирование 5'-регуляторных областей ряда генов, приводящее к их инактивации, можно использовать для диагностики разных патологических состояний ткани предстательной железы [21]. Одной из наиболее широко описанных эпигенетических аномалий в опухолевых клетках (в том числе ПЖ) является изменение профиля метилирования промоторной области гена *GSTπ1* (*Glutathione-S-Transferase π1*), вовлеченного в регуляцию апоптоза и утилизацию ксенобиотиков [13]. Также при малигнизации ткани ПЖ значительные эпигенетические изменения наблюдаются среди генов-супрессоров опухолевого роста [21,22]. Метилирование CpG-островков в промоторных областях таких генов приводит к их инактивации и повышению риска возникновения злокачественных заболеваний.

Из большого числа инактивируемых при РПЖ супрессоров опухолевого роста нами были выбраны следующие гены: *RARβ2* (Retinoic Acid Receptor β2), гормоно-чувствительный, вовлеченный в рецептор-опосредованную супрессию опухолевого роста и *RASSF1A* (RAS association domain family protein 1A), участвующий в регуляции апоптоза и поддержании генетической стабильности клетки [23]. Так как получение биоптата ткани ПЖ является достаточно инвазивным методом, одной из задач данного исследования было сравнение диагностических параметров исследуемых маркеров при использовании биоматериала различных типов для разработки неинвазивного способа диагностики РПЖ.

Нами определены границы промоторных областей выбранных генов и выявлены GC-богатые участки, а также предложены пары праймеров для амплификации метилированной и неметилированной последовательностей данных генов, которые могут быть использованы для детекции данных маркеров методом метил-специфической ПЦР.

Таким образом, целью настоящей работы явилось повышение эффективности диагностики РПЖ путем определения наиболее специфичной и чувствительной комбинации указанных выше молекулярных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал работы представлен результатами клинических, лабораторных и морфологических исследований 135 пациентов европеоидной расы с подозрением на РПЖ, находившихся на обследовании в НИИ урологии¹ в 2009-2012 годах и 22 здоровых добровольцев. Критерием включения в основную группу пациентов было значение PSA крови от 4 до 10 нг/мл. Контрольная группа была сформирована из практически здоровых мужчин без выявленных патологических изменений в ПЖ. В данной группе не

было образцов ткани ПЖ в силу отсутствия показаний к биопсии.

На основе гистологически верифицированных диагнозов были сформированы следующие экспериментальные группы:

I – группа больных хроническим простатитом вне обострения (n=46);

II – группа больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) с простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН) разной степени (n=62);

III – группа больных РПЖ (аденокарцинома ПЖ) разной степени дифференцировки (n=27);

IV – группа условно-здоровых лиц без выявленных патологических изменений в предстательной железе (n=22).

Для сравнения параметров получаемого генетического материала, эффективности проведения амплификации и с учетом экономической целесообразности исследования, были выбраны следующие типы биологического материала: цельная кровь; моча, собираемая после проведения процедуры пальцевого ректального исследования (ПРИ) предстательной железы; образцы ткани ПЖ, полученные при биопсии, как наиболее полноценный тип материала для исследования. Из данных видов биоматериала выделены образцы ДНК и сформирован банк материалов для дальнейшего изучения указанной панели молекулярных маркеров.

Для детекции изменений в статусе метилирования промоторных областей указанных выше генов использовали одну из модификаций ПЦР – метилспецифическую ПЦР (МС-ПЦР или MSP). Выделение геномной ДНК (гДНК) проводили при помощи набора реагентов Genomic

DNA Purification kit (Promega), согласно инструкции производителя. Концентрацию гДНК определяли спектрофотометрически. Затем гДНК подвергали метабисульфитной конверсии при помощи набора реагентов EpiTect® Bisulfite kit (Qiagen) согласно инструкции производителя.

Оценивали чувствительность, специфичность, предсказательную ценность положительного теста и предсказательную ценность отрицательного результата. При расчете диагностических параметров разрабатываемой системы маркеров использовали условные обозначения, определения и формулы стандартной четырехпольной таблицы (Р. Флетчер «Клиническая эпидемиология»). Также были рассчитаны показатели площади под ROC-кривой (AUC). Качество исследуемых диагностических маркеров оценивали по экспертной шкале для значений AUC.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст пациентов с доброкачественными заболеваниями ПЖ I-II групп составил $66,6 \pm 8,0$ лет [M ± m] (41-82). Средний уровень PSA у этих пациентов был равен $7,0 \pm 1,8$ нг/мл (4,0-9,9), а у больных РПЖ (III группа) – $7,3 \pm 1,7$ (4,7-9,7). Средний объем ПЖ в I и II группах составил $51,6 \pm 24,2$ см³ (46,9-56,2), а у больных РПЖ (III) – $41,4 \pm 24,3$ см³ (31,8-51). Среднее значение показателя Gleason в группе с диагностированным РПЖ составило $6,6 \pm 0,7$ балла (5-8). Индекс Gleason ≤ 6 баллов выявлен у 20 (74%) больных, ≥ 7 баллов – у 7 (26%). Среднее число «положительных» биоптатов – $3,6 \pm 2,5$ (1-12), средний процент поражения биоптата $49,3 \pm 28,0\%$ (10-100) (табл. 1). ■

Таблица 1. Общая характеристика больных РПЖ (n=27)

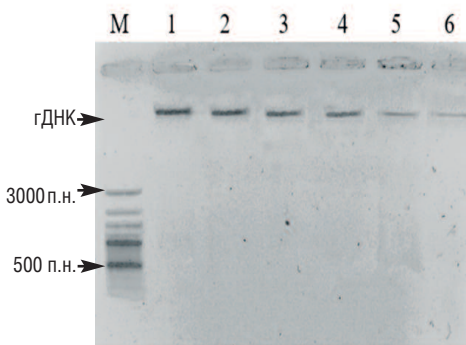
Показатель	Среднее значение
Возраст	67,3±8,3 (47-79)
PSA	7,3±1,7 (4,7– 9,7)
Показатель Gleason	6,3±0,7 (5-8)
Среднее число «положительных» биоптатов	3,6±2,5 (1-12)
Средний % поражения биоптата	49,3±28,0 (10-100)

¹ в настоящее время - НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

В группе больных РПЖ отмечено следующее распределение по стадиям заболевания:

- T1cN0M0 – 37% (n=10);
- T2aN0M0 – 22% (n=6);
- T2bN0M0 – 14,8% (n=4);
- T2cN0M0 – 14,8% (n=4);
- T3aN0M0 – 3,7% (n=1);
- T3bN0M0 – 7,4% (n=2).

При спектрофотометрическом определении концентрации полученной гДНК было обнаружено, что наиболее эффективное ее выделение возможно из образцов ткани ПЖ, цельной крови больных и лимфоцитов (образцы 1-4), в то время как выделение гДНК из клеток, обнаруживаемых в образцах мочи, оказалось гораздо менее эффективным (образцы 5 и 6). Таким образом, была определена наиболее перспективная среда и способ хранения биологического материала (рис. 1).



Условные обозначения:

М – маркеры молекулярной массы.

1 – гДНК, выделенная из образца ткани предстательной железы, полученного при биопсии и замороженного при -70°C ,
 2 – гДНК, выделенная из цельной крови, замороженной при -20°C ,
 3,4 – гДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови, лизированных и замороженных при -70°C ,
 5 – гДНК, выделенная из клеток, обнаруженных в моче после проведения ПРИ, лизированных и замороженных при -70°C .
 6 – гДНК, выделенная из клеток, обнаруженных в моче после проведения ПРИ и замороженных в PBS при -20°C .

Рис. 1. Электрофоретический анализ качества геномной ДНК, выделенной из различных типов биологического материала, хранившегося в различных условиях (0,7% агарозный гель)

Чувствительность, специфичность, предсказательная ценность положительного и отрицательного тестов были вычислены для каждого маркера в отдельности и для системы маркеров в целом. В таблице 2 отражены значения чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической ценности исследуемых ДНК-маркеров, с учетом типа биологического мате-

риала, из которого была выделена ДНК для проведения анализа.

При анализе характеристик диагностической системы, вычисленных на выборке образцов гДНК, выделенных из цельной крови, чувствительность составила 77,8%, а специфичность – 58,3%. Чувствительность и специфичность системы маркеров, определенная в выборке образцов гДНК, выделенных из мочи, оказалась несколько ниже: 74,1% и 52,8%, тогда как для ткани ПЖ эти показатели достигли 88,9% и 84,3%, соответственно.

Произведена оценка качества диагностической модели определения исследуемых маркеров в различных диагностических средах посредством ROC-анализа для каждого маркера в отдельности и их совокупности. При определении исследуемой панели маркеров в совокупности AUC составил: для мочи после ПРИ – 0,672 (95% ДИ 0,586 – 0,751); для крови – 0,736 (95% ДИ 0,653-0,808) и для биоптатов ПЖ – 0,891 (95% ДИ 0,826 – 0,938) (рис. 2). Согласно экспертной шкале значений AUC, эти показатели соответствуют диагностической модели среднего, хорошего и очень хорошего качества, соответственно.

Таким образом, наиболее эффективное выделение изучаемой гДНК возможно из образцов ткани

ПЖ и цельной крови, в то время, как выделение ДНК из клеток, обнаруживаемых в образцах мочи, является значительно менее эффективным.

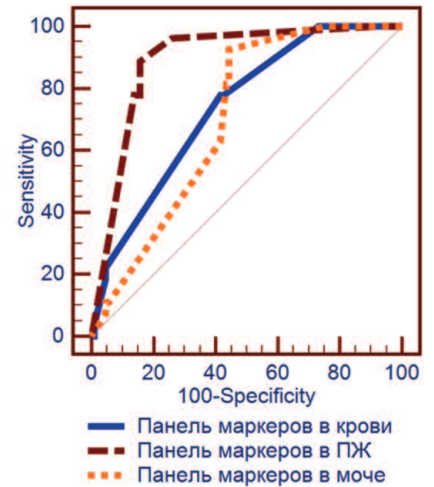


Рис. 2. ROC- кривая панели маркеров, определенных в крови, моче и биопсийном материале

Проведен корреляционный анализ зависимости экспрессии исследуемых маркеров в различных средах организма при РПЖ от других клиничко-морфологических параметров. Определяли коэффициент корреляции Спирмена (r) и коэффициент значимости (p). Статистически значимая корреляционная связь была выявлена между уровнем PSA и маркером $RAR\beta 2$ в крови ($r=0,3950$, $p=0,0414$). Также установлена достоверная обратная корреляция числа позитивных биоптатов с

Таблица 2. Клинические характеристики диагностической системы маркеров РПЖ, выделенных из цельной крови, образцов ткани предстательной железы и мочи после пальцевого ректального исследования

Показатель	Среда	Метилирование промоторной области гена			
		<i>GSTπ1</i>	<i>RARβ2</i>	<i>RASSF1A</i>	Суммарно
Чувствительность	Кровь	63,0	70,4	77,8	77,8
	Биоптат	85,2	88,9	88,9	88,9
	Моча	85,2	66,7	74,1	74,1
Специфичность	Кровь	59,3	33,3	57,4	58,3
	Биоптат	68,5	75,0	84,3	84,3
	Моча	38,0	38,0	57,4	52,8
+ PV	Кровь	28,0	20,7	29,9	26,2
	Биоптат	41,3	46,2	59,8	49,1
	Моча	24,4	21,0	29,9	25,1
- PV	Кровь	86,2	82,5	89,3	86,0
	Биоптат	94,9	95,5	96,5	95,6
	Моча	89,0	81,7	88,9	86,5
Диагностическая точность	Кровь	60,9	44,0	60,6	33,2
	Биоптат	72,8	77,1	85,7	60,3
	Моча	45,7	44,8	60,0	26,9

экспрессией маркера *RASSF1A* в моче ($r=-0,4065$, $p=0,0354$) и статистически значимая обратная корреляция объема ПЖ с экспрессией данного маркера в ткани ПЖ ($r=-0,4505$, $p=0,0184$). Такие параметры, как процент пораженного опухолью столбика, стадия заболевания, сумма баллов по шкале Gleason не выявили статистически значимой корреляции с экспрессией маркеров в различных биологических средах.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы появляется все больше исследований, посвященных генетическим маркерам РПЖ, в том числе и включенным нами в изучаемую панель. Авторы приводят различные данные об их диагностической значимости, в зависимости от метода детекции, среды определения, клинической группы и пр. (табл.3) [24].

Так, чувствительность и специфичность *GSTP1* (*GSTP1*) при исследовании биоптатов оценивают в 73-91% и 100%, в сыворотке крови – 72% и 100%, а в постмассажной порции мочи, как 36-73% и 98-100%, соответственно [25]. В нашем исследовании

эти показатели оказались несколько ниже, практически во всех средах.

Чувствительность и специфичность *RARβ2* в зависимости от метода исследования Т. Gao с соавт. оценивают следующим образом: для биоптатов ПЖ в 54-97% и 77-100%; в моче – 35-62% и 91-97%, соответственно [24]. Отдельные авторы публикуют данные о крайне высокой эффективности определения *RARβ2* в крови с использованием метода количественной ПЦР (КМС-ПЦР или QMSP): чувствительность – 98%; специфичность – 89%; AUC – 0,936 (95% ДИ 0,895 – 0,977; $p<0,001$) [26]. В нашем исследовании чувствительность МС-ПЦР при определении *RARβ2* в крови и специфичность во всех средах оказались несколько ниже.

Ряд авторов указывают на существование некоторых различий экспрессии генов *GSTP1* и *RARβ2* в ткани РПЖ у мужчин кавказской и негроидной рас: AUC для *GSTP1* – 0,969 и 0,811, а для *RARβ2* – 0,969 и 0,922, соответственно [27].

По данным метаанализа J. Pan и соавт. обобщенные показатели чувствительности и специфичности *RASSF1A* в ткани ПЖ достигают

0,79 (95% ДИ 0,64-0,89) и 0,84 (95% ДИ 0,63-0,94), соответственно [28]. Объединенные показатели чувствительности и специфичности *RASSF1A* в биологических жидкостях (кровь, сыворотка, моча) – существенно ниже: 0,6 (95% ДИ 0,08-0,96) и 0,93 (95% ДИ 0,75-0,98). Эти же тенденции отмечены и в нашем исследовании.

Найдены результаты лишь одного исследования, в котором оценивали метилирование в сыворотке крови комбинации генов, аналогичной нашей (*GSTP1*, *RARβ2* и *RASSF1A*), методом МС-ПЦР [29]. Чувствительность и специфичность теста по данным авторов составила 20% и 100%, соответственно, тогда как в нашей работе эти показатели были равны 77,8% и 58,3%.

Сравнение диагностических параметров разрабатываемой панели с другими маркерами РПЖ демонстрирует преобладание ее специфичности в крови относительно PSA (58,3% против 13,9%, $p<0,05$), при сопоставимой чувствительности. С клинической точки зрения определенный интерес представляет возможность совместного применения теста PSA и исследуемых маркеров в крови, для увеличения диагностической эффективности за счет повышения чувствительности и специфичности комбинации. Проведенные расчеты показали некоторое увеличение AUC до 0,746 (95% ДИ(0,664-0,817) при таком подходе, что соответствует диагностической модели хорошего качества (рис. 3). ■

Таблица 3. Метилированные гены, определяемые при диагностике РПЖ в биоптатах и других биологических жидкостях [24]

Gene/Gene cohort	Specimen	Sensitivity %	Specificity %	Refs.
<i>GSTP1</i>	Biopsy	91 (10/11)	100	52
<i>GSTP1</i>	Biopsy	73 (11/15)	100	141
<i>GSTP1</i>	Biopsy	75 (46/61)	100	142
<i>GSTP1, RARβ2, APC, TIG1</i>	Biopsy	97 (59/61)	100	144
<i>GSTP1</i>	Biopsy washing	100 (10/10)	100	143
<i>GSTP1</i>	Ejaculate	44 (4/9)	NA	139
<i>GSTP1</i>	Ejaculate	50 (4/8)	100	140
<i>GSTP1</i>	Serum	72 (23/32)	100	140
<i>GSTP1, PTGS2, Reprimo, TIG1</i>	Serum	42–47	92	148
<i>GSTP1, RASSF1, RARβ2</i>	Serum	28 (24/83)	100	149
<i>GSTP1</i>	Urine	27 (6/22)	100	145
<i>GSTP1</i>	Urine post massage	36 (4/11)	100	140
<i>GSTP1</i>	Urine post massage	73 (29/40)	98	152
<i>GSTP1</i>	Urine post biopsy	39 (7/18)	NA	151
<i>GSTP1, APC, EDNRB</i>	Urine post biopsy	71 (12/17)	NA	153
<i>GSTP1, INK4α, ARF, MGMT</i>	Urine	87 (45/52)	100	154
<i>GSTP1, INK4α, ARF, MGMT, RARβ2, TIMP3, CDH1, RASSF1A, APC</i>	Urine	100 (52/52) (positive for at least one gene)	<100	154
<i>GSTP1, RARβ2, APC, RASSF1A</i>	Urine post massage	86	89	86
<i>GSTP1, RASSF1A, ECDH1, APC, DAPK, MGMT, p14, p16, RARβ2, TIMP3</i>	Urine post massage	93 (positive for at least one gene)	NA	86
<i>GSTP1, RARβ2, APC</i>	Urine	55	80	120
<i>GSTP1, gal3</i>	Biopsy	96 (26/27)	100	127
<i>GSTP1, gal3</i>	Serum	100 (4/4)	100	127
<i>GSTP1, gal3</i>	Urine	100 (22/22)	ND	Unpublished



Рис. 3. ROC-кривая для совокупной панели маркеров и PSA, определенных в сыворотке крови

Специфичность изучаемой в настоящей работе панели маркеров превосходит таковую для соотношения свободного fPSA к PSA, нового маркера [-2]proPSA и PHI («индекс здоровья ПЖ»), для которых при 90% чувствительности она составляет 17%, 33% и 32%, соответственно [30]. В то же время, как свидетельствуют недавно опубликованные нами данные, чувствительность и специфичность комбинации генов *PCA3* и *TMPRSS2-ERG* при определении их в постмассажной порции мочи, превышает параметры изучаемой панели и составляют 83% и 78%, соответственно [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, одновременное использование нескольких перспективных и активно изучаемых молекулярно-генетических маркеров, таких

как *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A*, оправдано с учетом крайней гетерогенности и «мультифакторной» природы РПЖ. Специфичность панели превышает таковую для большинства применяемых в клинике маркеров РПЖ (PSA; fPSA; [-2]proPSA; PHI), уступая лишь *PCA3* и *TMPRSS2-ERG*, определяемых в постмассажной моче.

По данным настоящей работы экспрессия исследуемой панели маркеров в биологических средах не связана со степенью дифференцировки РПЖ по Gleason и стадией заболевания, в связи с чем, ее использование для оценки агрессивности и стадирования РПЖ считаем нецелесообразным.

Различия диагностических показателей по отдельным генам и системе маркеров в целом, отмеченные в настоящем исследовании, по сравнению с литературными данными, вероятно, носят технологический

характер и связаны с особенностями примененной методики детекции, которая требует совершенствования.

Наиболее репрезентативным типом биологического материала является ткань ПЖ, однако кровь, с точки зрения неинвазивной диагностики и скрининга – наиболее выигрышна, т.к. не требует участия специалиста для получения постмассажной мочи, а также позволяет произвести забор необходимых анализов и маркеров «единым пакетом». Диагностические параметры системы *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A*, рассчитанные для определения в крови, клинически приемлемы. При совместном применении с PSA возможно создание диагностической модели хорошего качества. Клиническая и медико-экономическая целесообразность такой комбинации требует дополнительных исследований. ■

Ключевые слова: рак предстательной железы, скрининг, диагностика, онкомаркеры, молекулярные маркеры, ДНК-маркеры, маркеры *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A*.

Key words: prostate cancer, screening, diagnosis, tumor markers, molecular markers, DNA markers, *GSTπ1*, *RARβ2* and *RASSF1A*.

Резюме:

Введение. Около 30 лет назад тест PSA перевернул диагностику рака предстательной железы (РПЖ), однако, в настоящее время существуют убедительные данные о недостаточной диагностической значимости данного маркера. Актуальным становится поиск новых маркеров рака предстательной железы и разработка на их основе тест-систем.

Материалы и методы: Клинический материал работы представлен результатами исследований 135 пациентов с уровнем ПСА крови от 4 до 10 нг/мл, и 22 здоровых добровольцев. Были выбраны следующие типы биологического материала: кровь, моча после проведения процедуры пальцево-ректального исследования (ПРИ) и биоптаты предстательной железы (ПЖ). Для детекции изменений в статусе метилирования промоторных областей *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A* использовалась ПЦР.

Результаты и обсуждения. Средний возраст больных в группе с доброкачественными заболеваниями ПЖ составил $66,62 \pm 7,98$ лет [M ± m] (41-82). Чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов определения статуса метилирования промоторных областей генов *GSTπ1*, *RARβ2*, *RASSF1A* (суммарно), при определении в ткани ПЖ, составляет 88,9%, 84,3%, 49,5% и 95,6%; при определении в крови – 77,8%, 58,3%, 26,2% и 86%; при определении в образцах мочи после массажа ПЖ – 74,1%, 52,8%, 25,1% и 86,5%, соответственно. При сравнении диагностических характеристик

Summary:

Markers for prostate cancer diagnostics: *GSTπ1*, *RARβ2* and *RASSF1A*. Results from a study

Sivkov A. V., Keshishev N. G., Merinova O. V., Severin S. E., Savvateeva M. V., Kuznetsova E. M., Raevskaya A. A., Kaprin A. D.

Introduction. 30 years ago, the PSA test made a radical change in prostate cancer diagnostics. However, today there is hard data indicating its limited diagnostic relevance of this marker. A search for new markers of prostate cancer and development of test systems on their basis is becoming relevant.

Materials and methods. The clinical material for the study was represented by the results of examining 135 patients with PSA blood level ranging from 4 to 10 ng/ml and also from 22 healthy volunteers. The following types of biological materials were chosen: blood, urine after digital rectal examination (DRE) and prostate biopsy. PCR was used to determine the changes in methylation status of *GSTπ1*, *RARβ2* and *RASSF1A* promoter regions.

Results and discussion. The mean age of patients with benign prostate diseases was 66.62 ± 7.98 years [M ± m] (41-82). Sensitivity, specificity and prognostic values of positive and negative results of determination of methylation status of *GSTπ1*, *RARβ2* and *RASSF1A* promoter regions constitute 88.9%, 84.3%, 49.5% and 95.6% (for prostate tissue analysis); 77.8%, 58.3%, 26.2% and 86% (for blood analysis) and 74.1%, 52.8%, 25.1% and 86.5% (for urine samples analy-

маркеров *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A*, определяемых в крови, с PSA, специфичность диагностической системы превосходит специфичность теста PSA (58,3% против 13,9%, $p < 0,05$). Экспрессия исследуемых маркеров в биологических средах не взаимосвязана со степенью дифференцировки РПЖ по Глиссону и стадией заболевания.

Выводы: Одновременное использование молекулярно-генетических маркеров, таких как *GSTπ1*, *RARβ2* и *RASSF1A* для диагностики РПЖ наиболее полно характеризует происходящие генетические изменения и является оптимальным с учетом крайней гетерогенности и «мультифакторной» природы онкологических заболеваний железы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

sis after prostate massage), respectively. When diagnostic properties of blood-determined *GSTπ1*, *RARβ2* and *RASSF1A* markers are compared with PSA, the specificity of this diagnostic system is higher than the PSA test specificity (58.3% versus 13.9%, $p < 0.05$). Expression of the investigated markers in biological media does not correlate with the stage of the disease and differentiation status (according to Gleason score).

Results. Simultaneous detection of molecular genetic markers, such as *GSTπ1*, *RARβ2* and *RASSF1A*, regarded as an optimal way for it diagnostics of prostate cancer and provides an indepth characterization of genetic changes and is, if considering extreme heterogeneity and multifactorial nature of prostate diseases.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317(5): 909-916.
2. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL Jr, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, et al. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol* 1990; 143(6): 1146-1154.
3. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 1991; 325(18): 1156-1161.
4. Yao SL, Lu-Yao G. Understanding and appreciating overdiagnosis in the PSA era. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(13): 958-960.
5. Collin SM, Martin RM, Metcalfe C, Gunnell D, Albertsen PC, Neal D, et al. Prostate-cancer mortality in the USA and UK in 1975-2004: an ecological study. *Lancet Oncol* 2008; 9(5):445-52. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70104-9.
6. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 2014; 384(9959):2027-35. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60525-0.
7. Krumholz JS, Carvalhal GE, Ramos CG, Smith DS, Thorson P, Yan Y, et al. Prostate-specific antigen cutoff of 2.6 ng/mL for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features. *Urology* 2002; 60(3):469-473.
8. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009; 360(13):1320-1328. doi: 10.1056/NEJMoa0810084.
9. O'Shaughnessy M, Konety B, Warlick C. Prostate cancer screening: issues and controversies. *Minn Med* 2010; 93(8):39-44.
10. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-196.
11. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; 70 (1):5-8.
12. Merlo A., Herman J.G., Mao L., Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1(7): 686-692.
13. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(12):6870-6875.
14. Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol* 2005; 23(27):6569-6575.
15. Cooper CS, Foster CS. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer* 2009; 100(2): 240-245. doi: 10.1038/sj.bjc.6604771
16. Nelson WG, Yegnasubramanian S, Agoston AT, Bastian PJ, Lee BH, Nakayama M, et al. Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer. *Front Biosci* 2007; 12:4254-4266.
17. Dobosy JR, Roberts JL, Fu VX. The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2007; 177(3):822-831.
18. Li LC. Epigenetics of prostate cancer. *Front Biosci* 2007; 12:3377-3397.
19. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8(4):286-298.
20. Hoque MO, Kim MS, Ostrow KL, Liu J, Wisman GB, Park HL, et al. Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome. *Cancer Res* 2008; 68(8):2661-2670. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5913
21. Henrique R, Jerónimo C, Teixeira MR, Hoque MO, Carvalho AL, Pais I, et al. Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2006; 4 (1):1-8.
22. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 10:8472-8478.
23. Aitchison A, Warren A, Neal D, Rabbitts P. RASSF1A promoter methylation is frequently detected in both pre-malignant and non-malignant microdissected prostatic epithelial tissues. *Prostate* 2007; 67(6):638-644.
24. Gao T, He B, Pan Y, Li R, Xu Y, Chen L, Nie Z, Gu L, Wang S. The association of retinoic acid receptor beta2 (RARβ2) methylation status and prostate cancer risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS One* 2013; 8(5):62950. doi: 10.1371/journal.pone.0062950
25. Ahmed H. Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomarkers in Cancer* 2010; 2010(2):17-33.
26. Dumache R, Puiu M, Minciú R, Bardan R, David D, Tudor A, Bumbăcilă B. Retinoic acid receptor β2 (RARβ2): noninvasive biomarker for distinguishing malignant versus benign prostate lesions from bodily fluids. *Chirurgia (Bucur)* 2012; 107(6):780-784.
27. Kwabi-Addo B, Wang S, Chung W, Jelinek J, Patierno S, Wang B, et al. Identification of Differentially Methylated Genes in Normal Prostate Tissues from African American and Caucasian Men. *Clin Cancer Res* 2010; 16(14):3539-3547. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3342
28. Pan J, Chen J, Zhang B, Chen X, Huang B, Zhuang J, Mo C, et al. Association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLOS One* 2013; 8(9):75283. doi:10.1371/journal.pone.0075283
29. Sunami E, Shinozaki M, Higano CS, Wollman R, Dorff TB, Tucker SJ, et al. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clin Chem* 2009; 55(3):559-567. doi: 10.1373/clinchem.2008.108498
30. Filella X, Giménez N. Evaluation of [-2]proPSA and Prostate Health Index (phi) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(4):729-739. doi: 10.1515/cclm-2012-0410.
31. Sivkov A, Efremov G, Mihaylenko D, Apolikhin O. PCA3 and TMPRSS2-ERG for prostate cancer diagnosis. 8th European Multidisciplinary Meeting on Urological Cancers