

УДК 575.174.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ 11 ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ В ТКАНИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПАЦИЕНТОВ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ, РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЛИЦ БЕЗ ПАТОЛОГИИ

**А. Е. Силин, В. Н. Мартинков, Э. А. Надыров, Е. В. Пестриков,
О. М. Либуркин, А. А. Задорожнюк, И. Б. Тропашко, А. А. Силина,
С. М. Мартыненко, А. В. Воропаева**

**Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель
Гомельский областной клинический онкологический диспансер**

С использованием метилспецифической полимеразной цепной реакции проведен сравнительный анализ статуса метилирования промоторных областей 11 различных генов-супрессоров в группах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, раком предстательной железы и лиц без патологии.

В группе лиц без патологии метилирование практически отсутствовало. В группе пациентов с доброкачественными гиперплазиями предстательной железы в большинстве случаев метилирование отсутствовало либо встречалось только в одном из 11 генов. В 5-ти случаях выявлено метилирование двух и более генов, по которым при дополнительном гистологическом исследовании отмечались морфологические признаки карциномы *in situ*.

В результате сравнительного анализа групп исследования выбраны 5 генов-кандидатов для формирования панели генетических маркеров дифференциальной диагностики патологии предстательной железы.

Ключевые слова: доброкачественная гиперплазия предстательной железы, рак предстательной железы, гиперметилирование генов-супрессоров, полимеразная цепная реакция.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHYLATION STATUS OF SUPPRESSOR GENES IN THE PROSTATE GLAND TISSUE IN PATIENTS WITH BENIGN PATHOLOGY, PROSTATE CANCER AND IN PATIENTS WITHOUT PATHOLOGY

**A. Silin, V. Martinkov, E. Nadyrov, E. Pestrikov, O. Liburkin, A. Zadorozhnyuk,
I. Tropashko, A. Silina, S. Martynenko, A. Voropayeva**

**Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel
Gomel Regional Clinical Oncologic Dispensary**

The comparative analysis of the methylation status of promoter regions of eleven different suppressor genes has been carried out in the groups of patients with benign prostatic hyperplasia, prostate cancer and in patients without pathology with the use of methylation-specific polymerase chain reaction.

The group without pathology revealed no methylation. The group of the patients with benign prostatic hyperplasia in most cases revealed either no methylation or it occurred in only one of the eleven genes. Methylation of two or more genes was found in five cases which in further histological examination showed morphological evidence of *in situ* carcinoma.

As a result of the comparative analysis of the study groups five candidate genes were selected for the genetic markers panel for differential prostate pathology diagnosis.

Key words: benign prostatic hyperplasia, prostate cancer, hypermethylation of suppressor genes, polymerase chain reaction.

Введение

В настоящее время актуальным является поиск новых дополнительных маркеров рака предстательной железы (РПЖ) и создание на их основе высокочувствительной диагностической панели, которая наряду с традиционными методами позволит повысить точность диагноза на ранних стадиях развития злокачественного процесса.

В последнее 10-летие при поиске новых маркеров злокачественных новообразований, включая РПЖ, все большее внимание уделяется молекулярно-генетическим маркерам. Известно несколько десятков генов и их продуктов, которые потенциально вовлечены в разви-

тие РПЖ и могут в той или иной степени рассматриваться в качестве маркеров злокачественного процесса. Особое внимание в настоящее время уделяется эпигенетическим событиям, происходящим в опухолевых клетках, а именно — изменению статуса метилирования ДНК в области промоторов генов-супрессоров. Так называемое сверхметилирование (гиперметилирование) приводит к полной инактивации генов, чьи продукты являются ключевым фактором регуляции клеточной пролиферации и апоптоза. Установлено, что инактивация генов-супрессоров опухоли, ассоциированная с гиперметилированием промоторной области,

является таким же характерным признаком опухолей человека, как и генетические нарушения и служит альтернативным механизмом потери функции генов-супрессоров [1–3].

Как было установлено в ряде исследований, гиперметилирование генов-супрессоров сопровождается такие заболевания, как рак печени, легкого, мочевого пузыря, щитовидной железы [4–7] и злокачественные новообразования ряда других локализаций. К настоящему времени накопилось много данных о фактах гиперметилирования различных генов при раке предстательной железы [8].

Особенностью гиперметилирования является неоднородность его проявления в злокачественных новообразованиях различных локализаций. Так, при одной форме рака ген может быть метилирован в подавляющем большинстве случаев, в то время как при другой форме метилирование данного гена практически отсутствует [8]. При этом показано, что по некоторым генам метилирование наблюдается как в нормальной ткани изучаемого органа, так и при доброкачественных изменениях. Исходя из этого, для создания высокочувствительной диагностической панели генетических маркеров РПЖ необходимо подобрать гены-супрессоры, метилирование которых существенно при РПЖ, но крайне редко встречается либо отсутствует при доброкачественной патологии и в нормальной ткани предстательной железы.

Цель работы

Проведение сравнительного анализа статуса метилирования 11 различных генов-супрессоров в группах пациентов с РПЖ, доброкачественной патологией и без патологии.

Материалы и методы исследования

Группы исследования и пробоподготовка.

Группы исследования доброкачественной патологии и РПЖ были сформированы из пациентов Учреждение «Гомельский областной клинический онкологический диспансер», проходивших обследование и лечение в 2010–2012 гг. Материал для исследования в виде ткани предстательной железы, взятой посредством пунк-

ционной биопсии, был получен после подписания пациентом формы информированного согласия. В группу пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) входило 20 человек, средний возраст — 68,9 года. В большинстве случаев ДГПЖ сочеталась с простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН). Группу пациентов с РПЖ составили 50 человек. Во всех случаях РПЖ был представлен мелкоацинарной аденокарциномой. Средний возраст пациентов в данной группе составил 72,2 года. Была также сформирована группа сравнения из лиц, не имеющих патологии предстательной железы. Материалом для генетического анализа в группе сравнения являлись аутопсийные образцы ткани предстательной железы 24 мужчин (35 лет и моложе), погибших по различным причинам.

Выделение ДНК из ткани предстательной железы проводилось с использованием набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Анализ гиперметилирования предусматривает этап модификации ДНК бисульфитным методом. В нашей работе образцы ДНК модифицировали с использованием набора для бисульфитной модификации CpGenome™ Universal DNA Modification Kit (Chemicon) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Молекулярно-генетический анализ. Анализ гиперметилирования промоторных областей генов-супрессоров осуществлялся посредством метилспецифической полимеразной цепной реакции (МС-ПЦР) с последующей детекцией результатов амплификации при помощи агарозного гель-электрофореза. Исследование проводилось по 11 различным генам: RARβ, HIN1, DAPK, GSTP1, APC, Cyclin D2, RASSF1A, p16, E-Cadherin, hMLH1 и BRCA1. Следуя методике МС-ПЦР, для анализа каждого из генов были использованы две пары олигонуклеотидных праймеров — для выявления неметилированной ДНК и для определения метилированной последовательности (таблица 1).

Таблица 1 — Праймеры для анализа гиперметилирования промоторных областей 11 генов и оптимальные условия проведения МС-ПЦР

Ген/ локализация	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Параметры МС-ПЦР	
			MgCl ₂ , mM	T _{отж.} , °C
RARβ 3p24	RAR-U-F	GGATTGGGATGTTGAGAATGT	2,0	60
	RAR-U-R	CAACCAATCCAACCAAAACAA		
	RAR-M-F	GAACGCGAGCGATTTCGAGT		
	RAR-M-R	GACCAATCCAACCGAACCG		
RASSF1A 3p21.3	PAN-F	GGAGGGAAGGAAGGGTAAG	2,5	54
	PAN-R	CAACTCAATAAACTCAAACCTCC		
	MSP-F	GGGTTTTGCGAGAGCGCG		
	MSP-R	GCTAACAAACGCGAACCG	64	
	USP-F	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG		2,5
USP-R	CACTAACAAACACAAACCAAAC			

Окончание таблицы 1

Ген/ локализация	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Параметры МС-ПЦР	
			MgCl ₂ , mM	T _{отж.} , °C
HIN1 1q23.1	HIN-U-F	GGTATGGGTTTTTTATGGTTTGT	2,0	60
	HIN-U-R	CAAAACTTCTTATACCCAATCCTCA		
	HIN-M-F	GGTACGGGTTTTTTACGGTTCGTC		
	HIN-M-R	AACTTCTTATACCCGATCCTCG		
DAPK 9q34.1	DAPUF	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	2,5	60
	DAPUR	CAAATCCCTCCCAAACACCAA		
	DAPMF	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC		
	DAPMR	CCCTCCCAAACGCCGA		
GSTP1 11q13-qter	MS-F	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	2,5	59
	MS-R	GCCCCAATACTAAATCACGACG		
	UMS-F	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT		
	UMS-K	CCACCCAATACTAAATCACAACA		
Cyclin D2 12p13	D2UM-F	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	2,5	56
	D2UM-R	ACATCCTCACCAACCCTCCA		
	D2M-F	GGCGGATTTTATCGTAGTCG		
	D2M-R	CTCCACGCTCGATCCTTCG		
hMLH1 3p22.3	H1UM-F	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	2,5	56
	H1UM-R	ACCACCTCATCATAACTACCCACA		
	H1M-F	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTTCGC		
	H1M-R	CCTCATCGTAACTACCCGCG		
APC 5q21-q22	APCUM-F	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	2,5	61
	APCUM-R	CCAATCAACAACCTCCCAACA		
	APCM-F	TATTGCGGAGTGCGGGTC		
	APCM-R	TCGACGAACTCCCGCGA		
p16 9p21	p16UM-F	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	2,5	59
	p16UM-R	CAACCCCAAACACAAACCATAA		
	p16M-F	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC		
	p16M-R	GACCCCGAACC GCGACCGTAA		
E-Cadherin 16q22.1	CDH1-UF	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	2,5	56
	CDH1-UR	CACAACCAATCAACAACACA		
	CDH1-MF	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT		
	CDH1-MR	TAATAAAAATTACCTACCGAC		
BRCA1 17q21	BRCAUM-F	GGTTAATTTAGAGTTTTGAGAGATG	2,5	61
	BRCAUM-R	TCAACAACTCACACCACACAATCA		
	BRCAM-F	GGTTAATTTAGAGTTTCGAGAGACG		64
	BRCAM-R	TCAACGAACTCACCCGCGCAATCG		

Состав реакционной смеси для проведения МС-ПЦР в нашей работе был следующим: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 mM Трис-НСl pH 8,3, 200 mM KCl, 50mM (NH₄)₂SO₄), 1 мкл 10 mM смеси dNTP (Fermentas), 0,1 мкл каждого 100 мкM праймера, 2,0-2,5 мкл 25mM MgCl₂ (таблица 1), 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5ед./мкл) (Fermentas), 1 мкл образца модифицированной ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР используются специальные пробирки объемом 0,2 мл.

Общая схема программы для амплификатора выглядит следующим образом: начальная денатурация — 4 мин. при 95 °C, затем 40 циклов 30-секундной денатурации при 94 °C, отжиг праймеров — 30 с при температуре 54–64 °C (таблица 1) и элонгация 30 с при 72 °C. В завершении — финальная элонгация 5 мин. при 72 °C и охлаждение до 4 °C. Реакцию амплификации осуществляли в приборе GeneAmp 2400 PCR System (Perkin-Elmer).

Анализ продуктов МС-ПЦР осуществлялся посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в камере SE-2 (Helicon) с источником питания Эльф-4 (ДНК-технология). Примеры электрофоретической детекции гиперметилирования представлены на рисунке 1 (инвертированное изображение).

Результаты и обсуждение

В результате молекулярно-генетического анализа группы лиц без патологии предстательной железы установлено, что в подавляющем большинстве случаев метилирование промоторных областей исследуемых генов-супрессоров отсутствовало. Единичные случаи метилирования отмечены для генов RARβ, APC, HIN1 и BRCA1. При этом метилирование наблюдалось только по какому-либо 1 из 11 проанализированных генов (таблица 2).

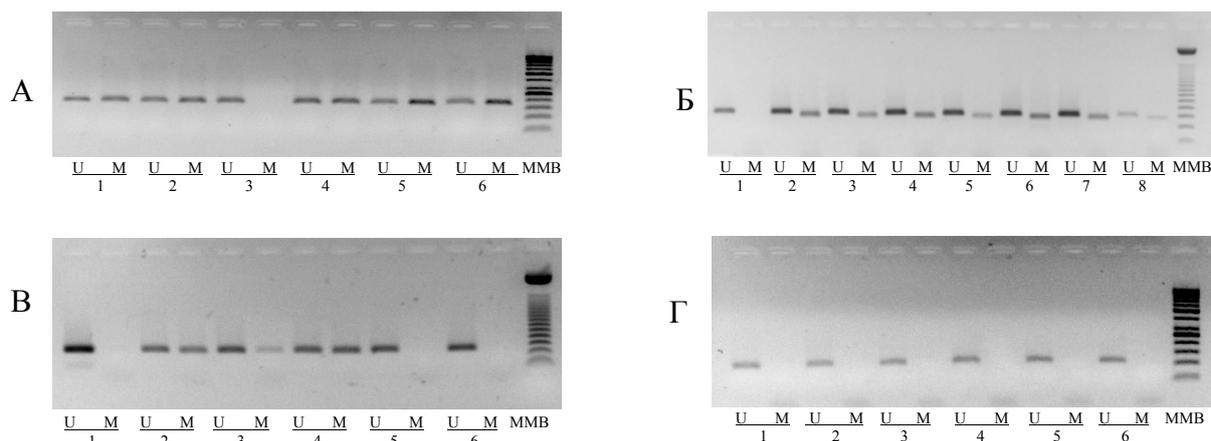


Рисунок 1 — Результат электрофоретической детекции продуктов МС-ПЦР по генам RASSF1A (А), RARβ (Б), HIN1 (В) и DAPK (Г). U — результат амплификации неметилированной ДНК, М — результат амплификации метилированной ДНК, ММВ — маркер молекулярного веса

Таблица 2 — Результаты анализа гиперметилирования 11 генов-супрессоров в группе пациентов без патологии предстательной железы

№ п/п	ID	RARβ	DAPK	GSTP1	APC	Cyclin D2	hMLH1	HIN1	RASSF1A	p16	E-Cadherin	BRCA1
1	PA01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	PA02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	PA03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	PA04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	PA05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	PA06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	PA07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	PA08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	PA09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	PA10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	PA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	PA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	PA13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	PA14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15	PA15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	PA16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	PA17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	PA18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	PA19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	PA20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	PA21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	PA22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	PA23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	PA24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
	Всего	24	24	24	24	24	23	24	21	24	24	24
	%	4,17%	0,00%	0,00%	4,17%	0,00%	0,00%	4,17%	0,00%	0,00%	0,00%	8,33%

В группе пациентов с ДГПЖ/ПИН в подавляющем большинстве случаев метилирование по 11 исследуемым генам либо отсутствовало, либо было представлено единичными случаями (таблица 3). В то же время было выявлено пять случаев (выделены в таблице 3), когда метилирование распространялось на 2 и более гена. Учитывая результаты проведенного анализа, сотрудниками патологоанатомического отделения У «ГОКОД» было проведено

повторное уточняющее гистологическое исследование ткани предстательной железы этих пациентов. В результате данного исследования установлено, что во всех этих пяти случаях присутствуют морфологические признаки карциномы in situ. В связи с этим данные пациенты будут дополнительно обследованы с повторным забором пункционного материала и последующим расширенным гистологическим и иммуногистохимическим анализом.

Таблица 3 — Результаты анализа гиперметилирования 11 генов-супрессоров в группе пациентов с ДГПЖ/ПИН

№ п/п	ID	РПЖ	RARβ	DAPK	GSTP1	APC	Cyclin D2	hMLH1	HIN1	RASSF1A	p16	E-Cadherin	BRCA1
1	Pt111	ДГП	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	Pt71	ДГП PIN1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3	Pt67	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Pt100	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Pt103	ДГП PIN2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	Pt115	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	Pt117	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	Pt118	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9	Pt141	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Pt142	ДГП PIN2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11	Pt146	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Pt123	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Pt124	ДГП PIN2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	Pt125	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Pt144	ДГП PIN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Pt135	ДГП PIN2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
17	Pt133	ДГП PIN2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
18	Pt130	ДГП PIN2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
19	Pt145	ДГП PIN2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
20	Pt143	ДГП PIN2	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
	+		4	0	1	2	4	0	5	6	0	0	0
	Всего		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	%		20,00%	0,00%	5,00%	10,00%	20,00%	0,00%	25,00%	30,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Наиболее метилированными в группе ДГПЖ/ПИН оказались 4 гена — RARβ, Cyclin D2, HIN1 и RASSF1A (таблица 3). Отсутствие метилирования наблюдалось по 5 генам — DAPK, hMLH1, p16, E-Cadherin и BRCA1.

В исследованной группе пациентов с РПЖ из 11 проанализированных только по 2 генам не выявлено ни одного случая метилирования — DAPK и E-Cadherin (таблица 4). Учитывая, что по данным генам метилирование отсутствовало также в группе ДГПЖ/ПИН и у лиц без патологии, следует признать нецелесообразным использование DAPK и E-Cadherin в качестве

диагностических маркеров РПЖ. По 3 генам из 11 наблюдались единичные случаи метилирования. Так, по генам hMLH1 и p16 из 50 случаев РПЖ метилирование отмечено по каждому гену только в одном случае. Для BRCA1 метилирование выявлено у 2 пациентов. Таким образом, учитывая крайне низкий процент метилирования при РПЖ, а также то, что по гену BRCA1 метилирование присутствовало в нормальной ткани предстательной железы, следует признать гены hMLH1, p16 и BRCA1 малоинформативными для использования в дифференциальной диагностике патологии предстательной железы.

Таблица 4 — Результаты анализа гиперметилирования 11 генов-супрессоров в группе пациентов с РПЖ

№ п/п	ID	RARβ	DAPK	GSTP1	APC	Cyclin D2	hMLH1	HIN1	RASSF1A	p16	E-Cadherin	BRCA1
1	Pt61	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
2	Pt62	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
3	Pt63	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
4	Pt64	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
5	Pt66	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
6	Pt126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Pt69	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
8	Pt127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Pt72	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
10	Pt74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Pt78	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
12	Pt84	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Окончание таблицы 4

№ п/п	ID	RARβ	DAPK	GSTP1	APC	Cyclin D2	hMLH1	HIN1	RASSF1A	p16	E-Cadherin	BRCA1
13	Pt85	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
14	Pt87	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
15	Pt88	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
16	Pt89	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
17	Pt129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Pt91	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
19	Pt94	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
20	Pt95	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
21	Pt97	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
22	Pt99	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
23	Pt101	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
24	Pt104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Pt106	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
26	Pt107	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
27	Pt131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Pt109	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
29	Pt110	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
30	Pt112	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
31	Pt134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Pt114	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
33	Pt116	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
34	Pt119	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
35	Pt120	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
36	Pt121	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
37	Pt136	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
38	Pt128	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
39	Pt137	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
40	Pt138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	Pt140	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
42	Pt139	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
43	Pt132	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
44	Pt68	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
45	Pt70	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
46	Pt90	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
47	Pt108	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
48	Pt113	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
49	Pt122	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
50	Pt105	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	+	41	0	37	36	31	1	35	41	1	0	2
	Всего	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	%	82,0	0,0	74,0	72,0	62,0	2,0	70,0	82,0	2,0	0,0	4,0

По остальным 6 генам (RARβ, GSTP1, APC, Cyclin D2, HIN1, RASSF1A) в группе РПЖ метилирование выявлено у подавляющего большинства пациентов. Наиболее метилированными оказались гены RARβ и RASSF1A. По каждому из этих генов гиперметилирование промоторной области выявлено в 82,0 ± 5,4 % случаев.

Также частым было метилирование генов GSTP1, APC, CyclinD2 и HIN1. Частота выявленного гиперметилирования промоторов данных генов составила 74,0 ± 6,2 %, 72,0 ± 6,3 %, 62,0 ± 6,9 % и 70,0 ± 6,5 % соответственно (таблица 4).

Метилирование хотя бы по 1 гену в группе пациентов с РПЖ присутствовало в 84,0 ± 5,2 % случаев. Только в 8 случаях РПЖ из 50 метилирование в пределах анализируемых генов отсутствовало полностью.

На основании проведенного исследования можно сделать заключение, что среди 11 проанализированных генов-супрессоров наиболее информативными являются 6 генов: RARβ, GSTP1, APC, CyclinD2, HIN1 и RASSF1A, которые могут быть отнесены к генам-кандидатам для формирования в будущем диагностической панели генетических маркеров злокачественного

процесса предстательной железы. В то же время обращает на себя внимание относительно высокий процент случаев гиперметилирования гена RASSF1A в группе пациентов с ДГПЖ/ПИН. Использование данного гена в панели генетических маркеров может снизить специфичность метода дифференциальной диагностики РПЖ на основе тестирования гиперметилирования. Полученные в нашем исследовании данные в отношении статуса метилирования RASSF1A в целом соответствуют результатам других исследований. Из данных литературных источников следует, что гиперметилирование RASSF1A в группе пациентов с ПИН является частым событием и может встречаться также в нормальной ткани предстательной железы [9]. Учитывая это, для повышения чувствительности метода следует исключить ген RASSF1A из панели маркеров для дифференциальной диагностики патологии предстательной железы.

Таким образом, с учетом специфичности проявления и частоты встречаемости метилирования промоторных областей 11 генов-супрессоров в 3-х группах исследования для формирования диагностической панели маркеров могут быть использованы 5 генов: RAR β , GSTP1, APC, CyclinD2 и HIN1. Тем не менее, принимая во внимание относительно небольшой объем выборки в группе ДГПЖ/ПИН, полученные данные позволяют рассматривать выбранные гены пока лишь в качестве кандидатов для формирования панели маркеров дифференциальной диагностики патологии предстательной железы. Для более точного анализа требуется продолжение исследования с увеличением количества анализируемых случаев, особенно в группе ДГПЖ/ПИН.

Заключение

С использованием метилспецифической полимеразной цепной реакции проведен сравнительный анализ статуса метилирования промоторных областей 11 различных генов-супрессоров в группах пациентов с доброкачественной гиперплазией, раком предстательной железы и лиц без патологии. Установлено, что

в группе лиц без патологии предстательной железы метилирование практически отсутствовало. В группе ДГПЖ/ПИН в большинстве случаев метилирование отсутствовало либо встречалось только в 1 из 11 генов. В пяти случаях выявлено метилирование 2 и более генов, по которым при дополнительном гистологическом исследовании отмечаются признаки карциномы *in situ*. Проведенный сравнительный анализ позволил определить 5 генов-кандидатов для формирования панели генетических маркеров дифференциальной диагностики патологии предстательной железы.

Данная работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация», подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина», раздел 2 «Изучение патогенетических основ социально-значимых заболеваний человека для разработки методов их диагностики, лечения и профилактики» (договор № 1.2.27 от 28.02.2011 г.).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia / I. V. Baylin [et al.] // *Adv. Cancer Res.* — 1998. — Vol. 72. — P. 141–196.
2. Herman, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer / J. G. Herman // *Sem. Cancer Biol.* — 1999. — Vol. 9. — P. 359–367.
3. Метилирование ДНК и канцерогенез / Б. А. Лихтенштейн [и др.] // *Биохимия.* — 2001. — № 66. — С. 235–255.
4. Detection of Aberrant p16 Methylation in the Plasma and Serum of Liver Cancer Patients / D. E. Wong [et al.] // *Cancer Research.* — 1999. — Vol. 59. — P. 71–73.
5. Detection of Aberrant Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients / J. K. Esteller [et al.] // *Cancer Research.* — 1999. — Vol. 59. — P. 67–70.
6. Detection of Bladder Cancer in Urine by a Tumor Suppressor Gene Hypermethylation Panel / M. R. Dulaimi [et al.] // *Clinical Cancer Research.* — 2004. — Vol. 10. — P. 1887–1893.
7. Xing, M. Minireview: Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis / M. Xing // *Endocrinology.* — 2007. — Vol. 148, № 3. — P. 948–953.
8. Epigenetics in Prostate Cancer: Biologic and Clinical Relevance / F. S. Jeronimo [et al.] // *European Urology.* — 2011. — Vol. 60. — P. 753–766.
9. Molecular Biomarker in Prostate Cancer: The Role of CpG Island Hypermethylation / F. A. Bastian [et al.] // *European Urology.* — 2004. — Vol. 46. — P. 698–708.

Поступила 09.11.2012

УДК 616.155.34:616.345/.351-006.6

ФЕКАЛЬНЫЙ ЛАКТОФЕРРИН В ВЫЯВЛЕНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЕГО РАЗВИТИЯ

Е. И. Михайлова, Н. В. Филипенко

Гомельский государственный медицинский университет

Цель исследования: оценка эффективности выявления колоректального рака на разных стадиях его развития на основе фекального лактоферрина.

Материал исследования. В группу исследования вошли 48 пациентов с колоректальным раком, 46 — с синдромом раздраженного кишечника и 25 здоровых добровольцев.

Результаты исследования. Установлено, что в неинвазивной диагностике ранних и поздних стадий колоректального рака фекальный лактоферрин обладал отличной диагностической значимостью с площадью под кривой (ППК) на уровне $0,940 \pm 0,0327$ и ППК: $0,956 \pm 0,032$ соответственно и не уступал по этому