

УДК 616.65-006.6

DOI 10.34014/2227-1848-2022-3-73-85

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ APC, GSTP1 И RASSF1A КАК МАРКЕРА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.А. Абоян¹, Е.Н. Федотова¹, А.Ю. Максимов², Е.Ф. Комарова²

¹ МБУЗ «Клинико-диагностический центр «Здоровье» г. Ростова-на-Дону»,
г. Ростов-на-Дону, Россия;

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Рак предстательной железы (РПЖ) представляет собой одно из наиболее распространенных онкозаболеваний, занимающее четвертое место в мировой структуре смертности. В связи с отсутствием клинических проявлений на ранних стадиях, а также низкой специфичностью существующих методов дифференциальной лабораторной диагностики актуальным остается поиск чувствительных малоинвазивных маркеров рака предстательной железы.

Целью настоящего исследования стал анализ уровней метилирования генов APC, GSTP1 и RASSF1A в биологическом материале при патологиях предстательной железы и эффективности их применения для выявления РПЖ.

Материалы и методы. Для молекулярно-генетического исследования уровня метилирования APC, GSTP1 и RASSF1A методом МС-ПЦР использовали геномную ДНК, выделенную из образцов постмассажной мочи, плазмы крови и биопсийного материала пациентов с РПЖ (n=34) и доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) (n=27). Контрольную группу составили 20 мужчин без выявленной патологии. Анализ продуктов МС-ПЦР осуществляли путем проведения электрофореза в 2 % агарозном геле.

Результаты. Наиболее часто во всех изученных типах биологического материала отмечается средняя степень метилирования APC, GSTP1 и RASSF1A. Имеются статистически значимые различия между группами с патологиями ПЖ с учетом биологического материала. Оценка отношения шансов выявления РПЖ показала, что наличие гиперметилированного APC в постмассажной моче, гена GSTP1 в плазме крови и гена RASSF1A в биопсийном материале увеличивает вероятность обнаружения РПЖ в 2,5, 12,1 и 4,1 раза соответственно. Показана низкая чувствительность (55,3 %) и высокая специфичность (87 %) диагностики РПЖ по уровню метилирования гена APC в образцах постмассажной мочи, гена GSTP1 в плазме крови, а также гена RASSF1A в биопсийном материале. При сочетанном использовании статуса метилирования изученных генов чувствительность составила 65,2 %, а специфичность – 82,4 %, а при добавлении в панель значения общего простатспецифического антигена (ПСА) – 79,1 и 82,9 % соответственно.

Выводы. Уровни метилирования APC в образцах постмассажной мочи, GSTP1 в плазме крови и RASSF1A в биопсийном материале могут быть рассмотрены в качестве высокоспецифичных диагностических маркеров РПЖ. Совместное применение данных показателей увеличивает специфичность диагностики в сравнении с определением уровня инициального ПСА, а при включении в панель последнего увеличивает также чувствительность панели для выявления РПЖ.

Ключевые слова: рак предстательной железы, APC, GSTP1, RASSF1A, метилирование, постмассажная моча.

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто диагностируемых злокачественных образований, занимающим четвертое место в мировой структуре смертности мужского населения [1]. Использование простатспецифического антигена (ПСА) в качестве диагностического маркера позволило увеличить частоту обнару-

жения РПЖ на ранних стадиях, что привело к увеличению прижизненной постановки диагноза до 16 % [2]. Однако данный метод обладает низкими специфичностью и чувствительностью, что нередко приводит к гипертерапии ложноположительных пациентов и проведению необязательной биопсии [3]. До 30 % случаев РПЖ могут быть диагностированы в диа-

пазоне значений ПСА менее 4 нг/мл, причем до 10 % случаев представляют собой агрессивные формы [4, 5]. В связи с этим по-прежнему актуальным остается поиск дополнительных методов диагностики РПЖ, в частности молекулярно-генетических маркеров, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью в отношении ранних форм РПЖ.

Особого внимания заслуживает статус метилирования ДНК промоторных областей генов-супрессоров как наиболее изученной и распространенной эпигенетической модификации в клетках РПЖ [6]. При развитии онкопатологии предстательной железы (ПЖ) аберрантные профили метилирования обычно наблюдаются уже на ранних стадиях, во время перехода от доброкачественного процесса к пролиферативной воспалительной атрофии и предраковым состояниям [7]. В исследованиях показано, что метилирование промотора гена *GSTP1* ингибирует цитопротекторные свойства гена и становится одной из причин неопластической трансформации клеток, в т.ч. и ткани предстательной железы [8]. Метилирование промотора гена *APC* связывают с высокой степенью злокачественности и агрес-

сивностью клеток РПЖ [9, 10]. *RASSF1* также представляет собой клинически значимый ген-супрессор опухолей, кодирующий белки *RASSF1A* и *RASSF1C*, и метилирование промотора *RASSF1* приводит к потере его супрессорных свойств [11]. Целесообразным представляется проведение дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными образованиями ПЖ на основании оценки метилирования промоторов данных генов как отдельно, так и в сочетании друг с другом, особенно для пациентов с уровнем инициального ПСА от 2,5 до 10 нг/мл.

Цель исследования. Анализ уровней метилирования генов *APC*, *GSTP1* и *RASSF1A* в биологическом материале при патологиях ПЖ и эффективности их сочетанного применения для выявления РПЖ.

Материалы и методы. Молекулярно-генетическое исследование было проведено 61 пациенту в возрасте от 51 до 75 лет (медиана – 66 лет), поступившему в МБУЗ КДЦ «Здоровье» г. Ростова-на-Дону с жалобами на нарушение функции нижних мочевых путей. Критерии включения и исключения пациентов приведены в табл. 1.

Таблица 1
Table 1

Критерии включения и исключения пациентов
Inclusion and exclusion criteria

Критерии включения Inclusion criteria	возраст <75 лет age <75
	первично обратившиеся пациенты, отсутствие лечения newly-admitted patients, no treatment
	ПСА 2,5–10 нг/мл PSA 2,5–10 ng/ml
Критерии исключения Exclusion criteria	ПСА >10 нг/мл; PSA >10 ng/ml
	декомпенсированная сопутствующая соматическая патология decompensated concomitant somatic pathology
	признаки острого или обостренного хронического простатита на момент обследования signs of acute or exacerbate chronic prostatitis at the moment of examination
	лабораторные или клинические признаки острого воспаления мочевых путей laboratory and clinical signs of acute inflammation of the urinary tract
	наличие хронической болезни почек chronic kidney disease

По результатам проведенного комплексного обследования, а также с учетом полученных данных морфологической диагностики пациенты были разделены на две исследуемые группы: больные с верифицированной аденокарциномой ПЖ (n=34); больные с верифицированной доброкачественной гиперплазией (ДГПЖ) с простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН) разной степени (n=27). Контрольную группу составили 20 мужчин в возрасте от 30 до 71 года (медиана – 56,5 года) без выявленной при проведенном обследовании патологии ПЖ. Каждым из пациентов было подписано добровольное согласие на участие в проведении настоящего исследования.

Молекулярно-генетическое исследование было проведено методом метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР). МС-ПЦР подвергали образцы бисульфит-конвертированной ДНК, выделенной из плазмы, постмассажной мочи и биопсийного материала. В качестве контроля использовали ДНК, выделенную из мононуклеарной фракции крови условно здоровых мужчин. После завершения программы амплификации образцы визуализировали при помощи гель-электрофореза в 2 % агарозном геле при 160 В в течение 1 ч с использованием интеркалирующего красителя – бромистого этидия. Визуализацию продуктов МС-ПЦР производили в ультрафиолетовом спектре излучения с использованием системы GelDoc XR PLUS (BioRad, США). Степень метилирования оценивали по интенсивности уровня свечения продуктов амплификации, условно подразделяя на высокую, среднюю и низкую.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc, США). Анализ достоверности различий уровней метилирования между пациентами с РПЖ, доброкачественной гиперплазией и условно здоровой ПЖ, а также между тремя видами биоматериала оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона с непараметрической поправкой Йетса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. При анализе степени и частоты метилирования гена *APC* для каждого типа биологического материала обнаружено, что в 100 % образцов биопсийного материала и плазмы крови больных с верифицированным РПЖ промоторная область была метилирована в низкой степени (табл. 2). При этом в образцах постмассажной мочи пациентов с РПЖ отмечалась высокая степень метилирования данного гена. В группе пациентов с ДГПЖ низкая степень метилирования *APC* выявлялась в 100 % образцов биопсийного материала и плазмы крови, в то время как в некоторых образцах постмассажной мочи была обнаружена средняя степень метилирования. В образцах плазмы крови и постмассажной мочи условно здоровых мужчин также отмечалось преобладание низкой степени метилирования гена *APC* – 100 % и 96 % соответственно (табл. 2). Сравнительный межгрупповой анализ степени метилирования гена *APC* в постмассажной моче выявил статистически значимые различия как по сравнению с контрольной группой, так и в группах с патологией ПЖ ($\chi^2=16,532$ ($p=0,001$)) (табл. 2).

Таблица 2
Table 2

Степень и частота метилирования гена *APC* в исследуемых группах

APC methylation level and frequency in the studied groups

Степень метилирования <i>APC</i> APC methylation level	Вид биологического материала Type of biological material			χ^2 (p)
	Биоптат Biopsy	Моча Urine	Плазма Plasma	
Больные РПЖ (n=34) Patients with prostate cancer (PC) (n=34)				
Высокая High	0	4 (11,8 %)	0	9,818 (0,049)

Степень метилирования APC APC methylation level	Вид биологического материала Type of biological material			χ^2 (p)
	Биоптат Biopsy	Моча Urine	Плазма Plasma	
Средняя Medium	0	1 (2,9 %)	0	
Низкая Low	34 (100 %)	29 (85,3 %)	34 (100 %)	
Отсутствие No methylation	0	0	0	
		χ^2 (p) РПЖ/контроль – 6,154 (0,047) χ^2 (p) PC/control – 6,154 (0,047)		
Пациенты с ДГПЖ (n=27) Patients with benign prostatic hyperplasia (BPH)				
Высокая High	0	0	0	4,308 (0,366)
Средняя Medium	0	3 (11,1 %)	0	
Низкая Low	27 (100 %)	24 (88,9 %)	27 (100 %)	
Отсутствие No methylation	0	0	0	
		χ^2 (p) ДГПЖ/контроль – 5,231 (0,039) χ^2 (p) BPH/control – 5,231 (0,039)		
		χ^2 РПЖ/ДГПЖ – 16,532 (p=0,001) χ^2 PC/BPH – 16,532 (p=0,001)		
Контрольная группа (n=20) Control group (n=20)				
Высокая High	-	0	0	5,154 (0,421)
Средняя Medium	-	0	1 (4 %)	
Низкая Low	-	20 (100 %)	19 (96 %)	
Отсутствие No methylation	-	0	0	

Примечание. Здесь и далее приведены только статистически значимые межгрупповые различия, определенные с помощью критерия χ^2 Пирсона.

Note. Here and below, only statistically significant intergroup differences are given. Pearson's χ^2 test is used.

При изучении метилирования гена *GSTP1* в группе пациентов с РПЖ с наибольшей частотой средняя степень метилирования наблюдалась в образцах постмассажной мочи, а

наибольшая частота низкой степени метилирования была зарегистрирована в образцах плазмы крови (табл. 3).

Таблица 3
Table 3

Степень и частота метилирования гена *GSTP1* в исследуемых группах
GSTP1 methylation level and frequency in the studied groups

Степень метилирования <i>GSTP1</i> <i>GSTP1</i> methylation level	Вид биологического материала Type of biological material			χ^2 (p)
	Биоптат Biopsy	Моча Urine	Плазма Plasma	
Больные РПЖ (n=34) Patients with PC (n=34)				
Высокая High	5 (14,7 %)	0	3 (8,8 %)	15,872 (<0,01)
Средняя Medium	21 (61,7 %)	28 (82,4 %)	18 (52,9 %)	
Низкая Low	8 (23,6 %)	6 (17,6 %)	13 (38,2 %)	
Отсутствие No methylation	0	0	0	
		χ^2 (p) РПЖ/контроль – 23,442 (p<0,01) χ^2 (p) PC/control – 23,442 (p<0,01)	χ^2 (p) РПЖ/контроль – 15,524 (p=0,002) χ^2 (p) PC/control – 15,524 (p=0,002)	
Пациенты с ДГПЖ (n=27) Patients with BPH (n=27)				
Высокая High	0	0	3 (11,1 %)	5,461 (0,244)
Средняя Medium	16 (59,2 %)	15 (55,6 %)	16 (59,3 %)	
Низкая Low	11 (40,7 %)	12 (44,4 %)	8 (29,6 %)	
Отсутствие No methylation	0	0	0	
		χ^2 (p) ДГПЖ/контроль – 13,863 (p<0,001) χ^2 (p) BPH/control – 13,863 (p<0,001)	χ^2 (p) ДГПЖ/контроль – 17,910 (p<0,001) χ^2 (p) BPH/control – 17,910 (p<0,001)	
		χ^2 (p) РПЖ/ДГПЖ – 3,987 (p=0,046) χ^2 (p) PC/BPH – 3,987 (p=0,046)		
Контрольная группа (n=20) Control group (n=20)				
Высокая High	-	0	0	4,257 (0,538)
Средняя Medium	-	0	0	
Низкая Low	-	16 (80 %)	14 (70 %)	
Отсутствие No methylation		4 (20 %)	6 (30 %)	

В группе пациентов с ДГПЖ высокая степень метилирования промотора гена *GSTP1* наблюдалась только в образцах плазмы крови (табл. 3). В образцах плазмы крови и постмассажной мочи условно здоровых мужчин наблюдалась низкая степень метилирования гена *GSTP1* в 70 % и 80 % случаев соответственно, а в остальных случаях зафиксировано отсутствие метилирования (табл. 3).

При сравнении степени метилирования гена *GSTP1* при различных состояниях ПЖ в образцах постмассажной мочи были выявлены статистически значимые различия как между пациентами с патологией предстательной железы и условно здоровыми, так и между больными РПЖ и пациентами с ДГПЖ (табл. 3). В образцах плазмы крови также обнаружены

различия между группой обследуемых с патологией ПЖ и группой контроля, однако в группах пациентов с РПЖ и ДГПЖ статистически значимые различия по степени метилирования данного гена отсутствовали (табл. 3).

При оценке метилирования гена *RASFF1A* обнаружено, что в группе больных РПЖ высокая степень метилирования наблюдалась только в одном образце постмассажной мочи, в биопсийном материале преобладала средняя степень метилирования (82,3 %), а в моче и плазме – низкая (55,9 % и 61,8 % соответственно) (табл. 4). В группе пациентов с ДГПЖ в образцах биоптатов и постмассажной мочи преобладала низкая степень метилирования, в то время как в образцах плазмы крови – средняя (табл. 4).

Таблица 4
Table 4

Степень и частота метилирования гена *RASFF1A* в исследуемых группах
RASFF1A methylation level and frequency in the studied groups

Степень метилирования <i>RASFF1A</i> <i>RASFF1A</i> methylation level	Вид биологического материала Type of biological material			χ^2 (p)
	Биоптат Biopsy	Моча Urine	Плазма Plasma	
Больные РПЖ (n=34) Patients with PC (n=34)				
Высокая High	0	1 (2,9 %)	0	13,326 (0,012)
Средняя Medium	27 (82,3 %)	14 (41,2 %)	13 (38,2 %)	
Низкая Low	7 (18,6 %)	19 (55,9 %)	21 (61,8 %)	
Отсутствие No methylation	0	0	0	
Пациенты с ДГПЖ (n=27) Patients with BPH (n=27)				
Высокая High	0	0	0	3,762 (0,315)
Средняя Medium	6 (21 %)	11 (41 %)	16 (59 %)	
Низкая Low	21 (79 %)	16 (59 %)	11 (41 %)	
Отсутствие No methylation	0	0	0	
	χ^2 (p) РПЖ/ДГПЖ – 4,259 (p=0,004) χ^2 (p) PC/BPH – 4,259 (p=0,004)			

Степень метилирования <i>RASFF1A</i> <i>RASFF1A</i> methylation level	Вид биологического материала Type of biological material			χ^2 (p)
	Биоптат Biopsy	Моча Urine	Плазма Plasma	
Контрольная группа (n=20) Control group (n=20)				
Высокая High	-	0	0	5,154 (0,421)
Средняя Medium	-	0	0	
Низкая Low	-	14 (70 %)	15 (75 %)	
Отсутствие No methylation	-	6 (30 %)	5 (25 %)	

При сравнении статуса метилирования гена *RASFF1A* в биопсийном материале мужчин из групп с верифицированным РПЖ и ДППЖ было обнаружено статистически значимое увеличение частоты встречаемости средней степени метилирования при РПЖ ($p=0,004$).

Проведенный анализ величин отношения шансов по показателям метилирования изу-

ченных генов в группах с патологиями ПЖ представлен в табл. 5.

Оценка отношения шансов выявления РПЖ показала, что наличие гиперметилированного *APC* в постмассажной моче, гена *GSTP1* в плазме крови и гена *RASFF1A* в биопсийном материале увеличивает вероятность обнаружения РПЖ в 2,5, 12,1 и 4,1 раза соответственно (табл. 5).

Таблица 5
Table 5

Расчет величин отношения шансов выявления РПЖ с 95 % доверительным интервалом по показателям метилирования генов *APC*, *GSTP1*, *RASFF1A* в группах с патологиями предстательной железы
Odd ratio of prostate cancer detection with a 95 % confidence interval according to *APC*, *GSTP1*, *RASFF1A* methylation in patients with prostate pathologies

	<i>APC</i> , моча <i>APC</i> , urine	<i>GSTP1</i> , плазма <i>GSTP1</i> , plasma	<i>RASFF1A</i> , биоптат <i>RASFF1A</i> , biopsy
Отношение шансов (OR) Odd ratio (OR)	2,529	12,115	4,137
Стандартная ошибка отношения шансов (S) Root-mean-square error of odd ratio	0,768	0,789	0,692
Нижняя граница 95 % ДИ (CI) Lower limit 95 % CI	0,561	2,580	1,468
Верхняя граница 95 % ДИ (CI) Upper limit 95 % CI	11,403	56,88	9,034

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI – confidence interval.

Таблица 6
Table 6**Чувствительность и специфичность методики выявления РПЖ по показателям метилирования генов *APC*, *GSTP1*, *RASFF1A* и ПСА****Sensitivity and specificity of prostate cancer detection according to *APC*, *GSTP1*, *RASFF1A* methylation and PSA**

Параметр Parameter	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
ПСА, сыворотка PSA, serum	93,0	43,4
<i>APC</i> , моча <i>APC</i> , urine	14,7	93,6
<i>GSTP1</i> , плазма <i>GSTP1</i> , plasma	47,1	90,0
<i>RASFF1A</i> , биоптат <i>RASFF1A</i> , biopsy	55,3	87
<i>APC</i> в моче, <i>GSTP1</i> в плазме, <i>RASFF1A</i> в биоптате <i>APC</i> in urine, <i>GSTP1</i> in plasma, <i>RASFF1A</i> in biopsy	65,2	82,4
ПСА, <i>APC</i> в моче, <i>GSTP1</i> в плазме, <i>RASFF1A</i> в биоптате PSA, <i>APC</i> in urine, <i>GSTP1</i> in plasma, <i>RASFF1A</i> in biopsy	79,1	82,9

Была проведена оценка чувствительности и специфичности изученных ДНК-маркеров для того типа биологического материала, в котором были показаны статистически значимые различия между РПЖ и ДГПЖ, для каждого маркера отдельно и в комбинации (табл. 6). Анализ продемонстрировал низкую чувствительность и высокую специфичность неинвазивной диагностики РПЖ по уровню метилирования гена *APC* в образцах постмассажной мочи и гена *GSTP1* в плазме крови. При этом определение степени метилирования гена *RASFF1A* в биопсийном материале может использоваться для отличия злокачественных и доброкачественных дисплазий ПЖ с 55,3 % чувствительностью и 87 % специфичностью. При сочетанном использовании статуса метилирования изученных генов чувствительность составила 65,2 %, специфичность – 82,4 %, а при добавлении в панель значения ПСА – 79,1 и 82,9 % соответственно (табл. 6).

Обсуждение. Анализ статуса метилирования промоторов генов *APC*, *GSTP1* и *RASFF1A* показал, что наиболее часто во всех изученных типах биологического материала отмечается

средняя степень метилирования. По результатам проведенного исследования по статусу метилирования генов обнаружены статистически значимые групповые различия как между группами с патологиями ПЖ, так и в сравнении с контрольной группой практически здоровых людей. Причем для каждого из изученных генов-супрессоров был выявлен тот тип биологического материала, определение метилирования в котором повышает вероятность обнаружения РПЖ. Так, для гена *APC* таким биологическим материалом служит постмассажная моча, для гена *GSTP1* – плазма крови, для гена *RASFF1A* – биоптаты опухоли ПЖ. Эти результаты имеют практическую значимость, поскольку обширная внутриопухолевая клonalная гетерогенность локализованного и метастатического РПЖ создает проблему отбора образцов в процессе биопсии. Поэтому актуальным является поиск доступных неинвазивных источников материала для проведения молекулярно-генетических исследований при РПЖ. В исследовании Y. Nakai et al. (2014) было продемонстрировано содержание разрушающихся клеток и внеклеточной ДНК из разных участ-

ков ПЖ в образцах постмассажной мочи [12]. В настоящем исследовании были получены результаты, согласующиеся с данными, представленными в зарубежной и отечественной литературе. Наблюдаемая тенденция к низкой степени метилирования *APC* в образцах постмассажной мочи и *GSTP1* в плазме крови, а также высокая специфичность изучаемых показателей согласовались с рядом ранее опубликованных результатов [13–16].

В результате проведенного исследования показана наибольшая чувствительность и специфичность определения гена *RASSF1A* в образцах биоптатов, что подтверждает выводы А.В. Сивкова и соавт. [17]. При этом авторами была продемонстрирована целесообразность сочетанного использования молекулярно-генетических маркеров и ПСА в связи с гетерогенностью РПЖ. При использовании нами комбинации изученных генов с учетом типа биоматериала также обнаружена высокая чувствительность и специфичность, что свидетельствует о больших предикторных возможностях панели генов для выявления РПЖ в сравнении с определением статуса метилирования отдельных генов. Сочетанное использование степени метилирования генов и показателя

общего ПСА повысило обе диагностические характеристики панели относительно оценки статуса метилирования каждого гена отдельно, а также их комбинации. Такие же закономерности были обнаружены в исследовании А. Vakavicius et al. (2019), где было показано увеличение чувствительности и специфичности диагностики РПЖ в образцах постмассажной мочи при сочетанном использовании уровня метилирования генов *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1* и показателя ПСА [18].

Заключение. Выявленные в проведенном исследовании закономерности позволяют рассматривать повышение уровней метилирования гена *APC* в образцах постмассажной мочи, *GSTP1* в плазме крови и *RASSF1A* в биопсийном материале в качестве высокоспецифичных диагностических маркеров для выявления рака ПЖ. Совместное применение данных показателей увеличивает специфичность в сравнении с определением уровня инициального ПСА, а при включении в панель последнего увеличивает также чувствительность панели для выявления РПЖ в сравнении с оценкой метилирования генов в отдельности, что позволит оптимизировать диагностику РПЖ и сократить число биопсий.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Jain M.A., Sapra A. Cancer Prostate Screening. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
2. Strand S.H., Orntoft T.F., Sorensen K.D. Prognostic DNA methylation markers for prostate cancer. Int. J. Mol. Sci. 2014; 15 (9): 16544–16576. DOI: 10.3390/ijms150916544.
3. Tkac J., Gajdosova V., Hroncekova S., Bertok T., Hires M., Jane E., Lorencova L., Kasak P. Prostate-specific antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer. Interface Focus. 2019; 9 (2): 20180077. DOI: 10.1098/rsfs.2018.0077.
4. Hoogland A.M., Kweldam C.F., van Leenders G.J. Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: a review. Biomed. Res. Int. 2014; 2014: 341324. DOI: 10.1155/2014/341324.
5. Miyake H., Muramaki M., Kurahashi T., Takenaka A., Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. Urol. Oncol. 2010; 28 (2): 145–151. DOI: 10.1016/j.urolonc.2008.08.001.
6. Fiano V., Zugna D., Grasso C., Trevisan M., Delsedime L., Molinaro L., Gillio-Tos A., Merletti F., Richiardi L. LINE-1 methylation status in prostate cancer and non-neoplastic tissue adjacent to tumor in association with mortality. Epigenetics. 2017; 12 (1): 11–18. DOI: 10.1080/15592294.2016.1261786.
7. Skorodumova L.O., Babalyan K.A., Sultanov R., Vasiliev A.O., Govorov A.V., Pushkar D.Y., Sharova E.I. The methylation status of *GSTP1*, *APC*, and *RASSF1* genes in human prostate cancer samples: Comparative analysis of diagnostic informativeness of MS-HRM and hybridization on the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2017; 11 (2): 194–201.

8. Cui J., Li G., Yin J., Li L., Tan Y., Wei H., Liu B., Deng L., Tang J., Chen Y., Yi L. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). *Int. J. Oncol.* 2020; 56 (4): 867–878. DOI: 10.3892/ijo.2020.4979.
9. Patel P.G., Wessel T., Kawashima A., Okello J.B.A., Jamaspishvili T., Guérard K.P., Lee L., Lee A.Y., How N.E., Dion D., Scarlata E., Jackson C.L., Boursalie S., Sack T., Dunn R., Moussa M. A three-gene DNA methylation biomarker accurately classifies early stage prostate cancer. *Prostate.* 2019; 79 (14): 1705–1714. DOI: 10.1002/pros.23895.
10. Kamińska K., Białkowska A., Kowalewski J., Huang S., Lewandowska M.A. Differential gene methylation patterns in cancerous and non-cancerous cells. *Oncol. Rep.* 2019; 42 (1): 43–54. DOI: 10.3892/or.2019.7159.
11. Григорьева М.В., Михайленко Д.С., Ефремов Г.Д., Сивков А.В. Диагностическая значимость РСА3 в моче, в зависимости от уровня сывороточного ПСА у обследуемых пациентов. *Вестник современных исследований.* 2017; 12-1: 25–26.
12. Nakai Y., Anai S., Kuwada M., Miyake M., Chihara Y., Tanaka N., Hirayama A., Yoshida K., Hirao Y., Fujimoto K. Photodynamic diagnosis of shed prostate cancer cells in voided urine treated with 5-aminolevulinic acid. *BMC Urol.* 2014; 14: 59. DOI: 10.1186/1471-2490-14-59.
13. Malpeli G., Innamorati G., Decimo I., Bencivenga M., Nwabo Kamdje A.H., Perris R., Bassi C. Methylation Dynamics of RASSF1A and Its Impact on Cancer. *Cancers (Basel).* 2019; 11 (7): 959. DOI: 10.3390/cancers11070959.
14. Li M., Wang C., Yu B., Zhang X., Shi F., Liu X. Diagnostic value of RASSF1A methylation for breast cancer: a meta-analysis. *Biosci Rep.* 2019; 39 (6): BSR20190923. DOI: 10.1042/BSR20190923.
15. Litovkin K., Van Eynde A., Joniau S., Lerut E., Laenen A., Gevaert T., Gevaert O., Spahn M., Kneitz B., Gramme P., Helleputte T., Isebaert S., Haustermans K., Bollen M. DNA Methylation-Guided Prediction of Clinical Failure in High-Risk Prostate Cancer. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0130651. DOI: 10.1371/journal.pone.0130651.
16. Li D., Xu Z., Liu J., Pu X., Luo Y., Zheng X. Restriction landmark genomic scanning for screening aberrant CpG methylations in prostate cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2016; 36 (1): 103–108.
17. Сивков А.В., Кешишев Н.Г., Меринова О.В., Северин С.Е., Савватеева М.В., Кузнецова Е.М., Каприн А.Д., Сивков А.В. Маркеры GSTn1, RARβ2 и RASSF1A в диагностике рака предстательной железы: результаты исследования. *Экспериментальная и клиническая урология.* 2016; 4: 38–43.
18. Bakavicius A., Daniunaite K., Zukauskaite K., Barisiene M., Jarmalaite S., Jankevicius F. Urinary DNA methylation biomarkers for prediction of prostate cancer upgrading and upstaging. *Clinical Epigenetics.* 2019; 11 (1): 1–10. DOI: 10.1186/s13148-019-0716-z.

Поступила в редакцию 06.04.2022; принята 14.08.2022.

Авторский коллектив

Абян Игорь Артемович – доктор медицинских наук, профессор, главный врач, МБУЗ «Клинико-диагностический центр «Здоровье» г. Ростова-на-Дону». 344011, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Доломановский, 70/3; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2798-368X>.

Федотова Екатерина Николаевна – биолог клинической лабораторной диагностики, МБУЗ «Клинико-диагностический центр «Здоровье» г. Ростова-на-Дону». 344011, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Доломановский, 70/3; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0891-4806>.

Максимов Алексей Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по перспективным научным разработкам, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России. 344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1397-837X>.

Комарова Екатерина Федоровна – доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России. 344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7553-6550>.

Образец цитирования

Абоян И.А., Федотова Е.Н., Максимов А.Ю., Комарова Е.Ф. Эффективность оценки степени метилирования генов *APC*, *GSTP1* и *RASSF1A* как маркера рака предстательной железы. Ульяновский медико-биологический журнал. 2022; 3: 73–85. DOI: 10.34014/2227-1848-2022-3-73-85.

EFFECTIVENESS OF EVALUATION OF APC, GSTP1 AND RASSF1A METHYLATION LEVEL AS A PROSTATE CANCER MARKER

I.A. Aboyan¹, E.N. Fedotova¹, A.Yu. Maksimov², E.F. Komarova²

¹Clinical and Diagnostic Center “Health (Zdorov'e)”, Rostov-on-Don, Russia;

²National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Prostate cancer (PC) is one of the most common oncological diseases, ranking fourth in the global mortality structure. Due to the absence of clinical manifestations in the early stages, and poor methods of differential laboratory diagnostics, the search for sensitive minimally invasive prostate cancer (PC) markers remains relevant.

The aim of the study was to analyze APC, GSTP1 and RASSF1A methylation levels in biological material in prostate pathologies and their effectiveness in PC detection.

Materials and Methods. For molecular genetic study of APC, GSTP1 and RASSF1A methylation levels by molecular-specific PCR test, the authors used genomic DNA isolated from samples of post-massage urine, blood plasma and biopsy material from patients with PC (n=34) and benign prostatic hyperplasia (BPH) (n=27). The control group consisted of 20 men without any identified pathology. Analysis of molecular-specific PCR products was carried out by 2 % agarose gel electrophoresis.

Results. The average APC, GSTP1, and RASSF1A methylation level was mainly noted in all types of biological material. There were statistically significant differences between groups with pancreatic pathologies, taking into account biological material. The evaluation of the odds ratio of PC detection showed that the hypermethylated APC in post-massage urine, GSTP1 in blood plasma, and RASSF1A in biopsy material increased the probability of PC detection by 2.5, 12.1, and 4.1 times, respectively. Low sensitivity (55.3 %) and high specificity (87 %) of PC diagnostics in terms of APC methylation in post-massage urine, GSTP1 in blood plasma, and RASSF1A in biopsy material were shown. With the combined use of the methylation gene status, the sensitivity was 65.2 %, and the specificity was 82.4 %. When the total prostate-specific antigen (PSA) value was added to the panel, the indices were 79.1 % and 82.9 %, respectively. Conclusion. APC methylation levels in post-massage urine, GSTP1 in blood plasma, and RASSF1A in biopsy can be considered as highly specific diagnostic PC markers. The combined use of these indicators increases the specificity of diagnosis in comparison with the initial PSA level. When included in the panel, the latter also increases the panel sensitivity for PC detection.

Key words: prostate cancer, APC, GSTP1, RASSF1A, methylation, post-massage urine.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jain M.A., Sapra A. Cancer Prostate Screening. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
2. Strand S.H., Orntoft T.F., Sorensen K.D. Prognostic DNA methylation markers for prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15 (9): 16544–16576. DOI: 10.3390/ijms150916544.
3. Tkac J., Gajdosova V., Hroncekova S., Bertok T., Hires M., Jane E., Lorencova L., Kasak P. Prostate-specific antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer. *Interface Focus*. 2019; 9 (2): 20180077. DOI: 10.1098/rsfs.2018.0077.
4. Hoogland A.M., Kweldam C.F., van Leenders G.J. Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: a review. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 341324. DOI: 10.1155/2014/341324.

5. Miyake H., Muramaki M., Kurahashi T., Takenaka A., Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol. Oncol.* 2010; 28 (2): 145–151. DOI: 10.1016/j.urolonc.2008.08.001.
6. Fiano V., Zugna D., Grasso C., Trevisan M., Delsedime L., Molinaro L., Gillio-Tos A., Merletti F., Richiardi L. LINE-1 methylation status in prostate cancer and non-neoplastic tissue adjacent to tumor in association with mortality. *Epigenetics.* 2017; 12 (1): 11–18. DOI: 10.1080/15592294.2016.1261786.
7. Skorodumova L.O., Babalyan K.A., Sultanov R., Vasiliev A.O., Govorov A.V., Pushkar D.Y., Sharova E.I. The methylation status of GSTP1, APC, and RASSF1 genes in human prostate cancer samples: Comparative analysis of diagnostic informativeness of MS-HRM and hybridization on the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2017; 11 (2): 194–201.
8. Cui J., Li G., Yin J., Li L., Tan Y., Wei H., Liu B., Deng L., Tang J., Chen Y., Yi L. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). *Int. J. Oncol.* 2020; 56 (4): 867–878. DOI: 10.3892/ijo.2020.4979.
9. Patel P.G., Wessel T., Kawashima A., Okello J.B.A., Jamaspishvili T., Guérard K.P., Lee L., Lee A.Y., How N.E., Dion D., Scarlata E., Jackson C.L., Boursalie S., Sack T., Dunn R., Moussa M. A three-gene DNA methylation biomarker accurately classifies early stage prostate cancer. *Prostate.* 2019; 79 (14): 1705–1714. DOI: 10.1002/pros.23895.
10. Kamińska K., Białkowska A., Kowalewski J., Huang S., Lewandowska M.A. Differential gene methylation patterns in cancerous and non-cancerous cells. *Oncol. Rep.* 2019; 42 (1): 43–54. DOI: 10.3892/or.2019.7159.
11. Grigor'eva M.V., Mikhaylenko D.S., Efremov G.D., Sivkov A.V. Diagnosticheskaya znachimost' PCA3 v moche, v zavisimosti ot urovnya syvorotochnogo PSA u obsleduemykh patsientov [Diagnostic significance of PCA3 in urine, depending on PSA serum level in patients]. *Vestnik sovremennykh issledovaniy.* 2017; 12-1: 25–26 (in Russian).
12. Nakai Y., Anai S., Kuwada M., Miyake M., Chihara Y., Tanaka N., Hirayama A., Yoshida K., Hirao Y., Fujimoto K. Photodynamic diagnosis of shed prostate cancer cells in voided urine treated with 5-aminolevulinic acid. *BMC Urol.* 2014; 14: 59. DOI: 10.1186/1471-2490-14-59.
13. Malpeli G., Innamorati G., Decimo I., Bencivenga M., Nwabo Kamdje A.H., Perris R., Bassi C. Methylation Dynamics of RASSF1A and Its Impact on Cancer. *Cancers (Basel).* 2019; 11 (7): 959. DOI: 10.3390/cancers11070959.
14. Li M., Wang C., Yu B., Zhang X., Shi F., Liu X. Diagnostic value of RASSF1A methylation for breast cancer: a meta-analysis. *Biosci Rep.* 2019; 39 (6): BSR20190923. DOI: 10.1042/BSR20190923.
15. Litovkin K., Van Eynde A., Joniau S., Lerut E., Laenen A., Gevaert T., Gevaert O., Spahn M., Kneitz B., Gramme P., Helleputte T., Isebaert S., Haustermans K., Bollen M. DNA Methylation-Guided Prediction of Clinical Failure in High-Risk Prostate Cancer. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0130651. DOI: 10.1371/journal.pone.0130651.
16. Li D., Xu Z., Liu J., Pu X., Luo Y., Zheng X. Restriction landmark genomic scanning for screening aberrant CpG methylations in prostate cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2016; 36 (1): 103–108.
17. Sivkov A.V., Keshishev N.G., Merinova O.V., Severin S.E., Savvateeva M.V., Kuznetsova E.M., Kaprin A.D., Sivkov A.V. Markery GSTn1, RARβ2 i RASSF1A v diagnostike raka predstatel'noy zhelezy: rezul'taty issledovaniya [Markers for prostate cancer diagnostics: GSTn1, RARβ2 and RASSF1A. Results of the study]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya.* 2016; 4: 38–43 (in Russian).
18. Bakavicius A., Daniunaite K., Zukauskaite K., Barisiene M., Jarmalaite S., Jankevicius F. Urinary DNA methylation biomarkers for prediction of prostate cancer upgrading and upstaging. *Clinical Epigenetics.* 2019; 11 (1): 1–10. DOI: 10.1186/s13148-019-0716-z.

Received 6 April 2022; accepted 14 August 2022.

Information about the authors

Aboyan Igor' Artemovich, Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Chief Physician, Clinical and Diagnostic Center “Health (Zdorov’e)”, Rostov-on-Don. 344011, Russia, Rostov-on-Don, Dolomanovskiy LN, 70/3; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2798-368X>.

Fedotova Ekaterina Nikolaevna, Biologist of Clinical Laboratory Diagnostics, Clinical and Diagnostic Center “Health (Zdorov’e)”, Rostov-on-Don. 344011, Russia, Rostov-on-Don, Dolomanovskiy LN, 70/3; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0891-4806>.

Maksimov Aleksey Yur'evich, Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Deputy General Director for Advanced Scientific Developments, National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation. 344037, Russia, Rostov-on-Don, 14-ya liniya St., 63; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1397-837X>.

Komarova Ekaterina Fedorovna, Doctor of Sciences (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Leading Researcher, National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation. 344037, Russia, Rostov-on-Don, 14-ya liniya St., 63; e-mail: eka140184@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7553-6550>.

For citation

Aboyan I.A., Fedotova E.N., Maksimov A.Yu., Komarova E.F. Effektivnost' otsenki stepeni metilirovaniya genov *APC*, *GSTP1* i *RASSF1A* kak markera raka predstatel'noy zhelezy [Effectiveness of evaluation of APC, GSTP1 and RASSF1A methylation level as a prostate cancer marker]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal*. 2022; 3: 73–85. DOI: 10.34014/2227-1848-2022-3-73-85 (in Russian).