

Экспрессия генетических локусов в мононуклеарной фракции периферической крови больных раком предстательной железы

М.И. Коган¹, М.Б. Чибичян¹, Д.И. Водолажский², Н.Н. Тимошкина², Д.Г. Матишов²

¹Ростовский ГМУ;

²Институт аридных зон Южного научного центра РАН, Ростов-на-Дону

Контакты: Михаил Иосифович Коган dept_kogan@mail.ru

Ранняя диагностика и радикальное лечение агрессивных форм рака предстательной железы (РПЖ) — эффективный путь увеличения продолжительности и качества жизни пациентов. Разработка минимально инвазивных тестов — один из путей к решению проблемы. Клетки мононуклеарной фракции периферической крови в паттернах экспрессии своих генетических локусов отражают наличие или отсутствие онкозаболеваний, в том числе информацию об эффективности терапии.

Методом RT-PCR 78 мужчинам с различной патологией простаты проведено исследование относительной экспрессии 15 генетических локусов хромосомной локализации и 1 локуса митохондриальной ДНК в клетках мононуклеарной фракции периферической крови пациентов с РПЖ, доброкачественной гиперплазией предстательной железы и у здоровых мужчин. Выявлены паттерны генетических локусов, изменение которых может быть информативно для дифференциальной диагностики больных с различными стадиями РПЖ. Изучена взаимосвязь и показана прогностическая роль и независимость изменения транскрипционной активности генетических локусов TP53, GSTP1 и IL10 при РПЖ от изменений уровня простатспецифического антигена со специфичностью 90% и чувствительностью 93%.

Ключевые слова: рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, простатспецифический антиген, VEGFA, VEGFB, BCL2, BAX, TP53, GSTP1, HTERT, TNF- α , CASP8, CFLAR, C-Мyc, HIF1A, IL10, NFKB1A, NANOG, HV2, ACTB, экспрессия генов, мононуклеарная фракция периферической крови

Expression of genetic loci in the peripheral blood mononuclear fraction from patients with prostate cancer

M.I. Kogan¹, M.B. Chibichyan¹, D.I. Vodolazhsky², N.N. Timoshkina², D.G. Matishov²

¹Rostov State Medical University;

²Institute of Arid Zones, Southern Scientific of the Center, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don

The early diagnosis and radical treatment of aggressive prostate cancers (PC) is an effective way of improving survival and quality of life in patients. To develop mini-invasive tests is one of the ways of solving the problem. The cells of a peripheral blood mononuclear fraction in the expression patterns of their genetic loci reflect the presence or absence of cancers, including information on therapeutic effectiveness.

RT-PCR was used to study the relative expression of 15 genetic loci in a chromosome and one locus of mitochondrial DNA in the cells of the peripheral blood mononuclear fraction in patients with PC or benign prostate hyperplasia and in healthy men. The genetic locus patterns whose change may be of informative value for differential diagnosis in patients with different stages of PC were revealed. The authors studied the relationship and showed the prognostic role and non-relationship of the altered transcriptional activity of loci in the TP53, GSTP1, and IL10 genes in PC to the changes in prostate-specific antigen the level with 90% specificity and 93% specificity.

Key words: prostate cancer, benign prostate hyperplasia, prostate-specific antigen, VEGFA, VEGFB, BCL2, BAX, TP53, GSTP1, HTERT, TNF- α , CASP8, CFLAR, C-Myc, HIF1A, IL10, NFKB1A, NANOG, HV2, ACTB, gene expression, Peripheral blood mononuclear cell

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) относится к одному из наиболее распространенных онкологических заболеваний мужчин среднего и пожилого возраста в развитых странах. По количеству летальных исходов среди онкологических заболеваний РПЖ уступает лишь раку легких [1]. До настоящего времени не обнаружены маркеры, дифференцирующие «малый» РПЖ от доброкачественной гиперплазии простаты (ДГПЖ). Такие диагностические возможности чрезвычайно актуальны: согласно статистике, в течение 5 лет после диагностирования и своевременного лечения локального РПЖ,

выживает 88% пациентов, тогда как доля выживших пациентов с болезнью, диагностированной в метастатическую фазу, составляет только 29%. Количественный тест на простатспецифический антиген (ПСА) в сыворотке крови для диагностики РПЖ до сих пор является «золотым стандартом» диагностики. Однако высокий уровень ложноотрицательных и ложноположительных результатов при его использовании, широкое разнообразие изоформ ПСА остаются проблемой диагностики РПЖ, требующей решения [2].

В качестве объекта исследования для диагностики онкологических заболеваний в последнее время все

чаще используется моноклеарная фракция (МНФ) клеток периферической крови. МНФ клеток периферической крови предоставляет для анализа легкодоступный субстрат иммунной системы для поиска новых биомаркеров. Пионером в использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления предполагаемых онкомаркеров предстательной железы в периферической крови был J. Moreno [3].

В настоящее время наблюдается рост числа работ с использованием подхода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в этом направлении. Так, в частности, M. Showe и соавт. [4] удалось установить достоверные изменения транскрипционной активности в генах МНФ клеток периферической крови у 137 больных немелкоклеточным раком легкого и у 91 пациента с доброкачественными опухолями легких (контрольная группа).

Исследование паттерна экспрессии генетических локусов МНФ клеток периферической крови успешно используется в отдельных центрах для постановки диагноза и оценки эффективности лечебных мероприятий у больных РПЖ. В частности, в работе N. Komatsu и соавт. [5] были проанализированы 2 группы больных РПЖ с разными сроками выживаемости: до 300 дней (1-я группа) и более 900 дней (2-я группа). Авторы отметили отсутствие статистически значимых различий между этими группами при использовании рутинных клинических или патологических анализов. Однако анализ экспрессии генетических локусов в МНФ периферической крови позволил эффективно (с точностью 92 %) разделить эти группы между собой.

В работе G. Novelli и соавт. [6] был разработан олиго-чип низкой плотности (AndroChip 2) для анализа 190 генетических локусов, отобранных на основе их доказанной или возможной роли в канцерогенезе ПЖ по механизму андрогенной сигнализации. AndroChip 2, по мнению авторов, обладает хорошим прогностическим эффектом для мониторинга экспрессии генов в андрогензависимых и андрогеннезависимых клетках ПЖ. Авторы статьи уделяют особенное внимание тому факту, что все гены, фиксированные на AndroChip 2, эффективно регистрируют изменение уровней экспрессии генетических локусов в МНФ клеток периферической крови пациентов с хорошим эффектом в прогнозе развития этой патологии. Изменения в статусе паттерна экспрессии генетических локусов в клетках МНФ при развитии РПЖ также подтверждаются в работе S. Perambakam и соавт. [7], показавших существование отличных от контрольной группы паттернов экспрессии цитокинов МНФ клеток периферической крови в бессывороточной среде в условиях культуры, взятых у пациентов с РПЖ.

Таким образом, изменение паттерна экспрессии генетических локусов МНФ периферической крови могут быть эффективно использованы для диагностики рако-

вых заболеваний, в том числе и РПЖ, а также для оценки эффективности курса проводимой терапии. В случае начальных стадий развития РПЖ такой экспериментальный подход может позволить с высокой чувствительностью и специфичностью выявить таких пациентов и своевременно начать адекватное лечение.

Цель нашего исследования — поиск специфических для РПЖ биомаркеров, проявляющихся в изменении транскрипционной активности генетических локусов в МНФ клеток периферической крови. В качестве целевых кандидатных локусов были выбраны гены, играющие критическую роль в регулировании клеточного цикла, апоптоза, ангиогенеза и окислительного фосфорилирования митохондриальной локализации [8].

Материалы и методы

В исследовании участвовало 78 мужчин. Количественный состав и характеристики групп, вошедших в исследование, приведены в табл. 1.

Во всех случаях рак верифицировался путем выполнения биопсии ПЖ и гистологически представлял аденокарциному. Объем поражения опухолью биоптатов достигал 70–100 %. Сумма баллов по шкале Глисона (индекс Глисона) варьировала от 6 до 10 баллов.

Материалом для исследований служила венозная кровь, забор которой осуществляли с использованием вакутайнеров, содержащих стабилизатор EDTA KE (Sarstedt, Германия). Венозную кровь после взятия визуально тестировали на отсутствие гемолиза и в течение 1 ч доставляли для анализа в лабораторию в охлажденном виде.

Препаративное выделение МНФ клеток из цельной периферической крови проводили методом дифференциального гемолиза с использованием хлористого аммония [9]. Экстракцию суммарной рибонуклеиновой кислоты (РНК) из МНФ клеток периферической крови проводили по Хомчинскому [10].

ПЦР-РВ использовали для определения транскрипционной активности 15 ядерных генетических

Таблица 1. Количественный состав и характеристики групп, вошедших в исследование

Группа	Диагноз	n	Средний возраст, лет	ПСА, нг/мл
1-я	ДГПЖ	39	65,3 ± 1,6	4,1 ± 0,8
2-я	РПЖ T1–2	15	62,7 ± 2,7	13,7 ± 2,2
3-я	РПЖ T3–4	14	64,7 ± 2,4	21,8 ± 14,2
Контрольная	Здоровые	10	49,1 ± 2,7	2,7 ± 1,2
Итого		78		

локусов: ген, кодирующий сосудистый эндотелиальный фактор роста А – *VEGFA* (RTPrimer DB ID 2803); ген, кодирующий сосудистый эндотелиальный фактор роста В – *VEGFB* (RTPrimer DB ID 2804); ген антиапоптозного *BCL2*-протеина – *BCL2* (RTPrimer DB ID 1545); ген проапоптозного *Bcl-2*-ассоциированного X-протеина – *BAX* (RTPrimer DB ID 1541); ген опухолевого супрессора *TP53* – *TP53* [11]; ген глутатион S-трансферазы p11 – *GSTP1* (RTPrimer DB ID 2950); ген каталитической субъединицы теломеразы – *hTERT* (RTPrimer DB ID 7015); ген фактора некроза опухолей α – *TNF- α* (RTPrimer DB ID 7124); ген, кодирующий каспазный протеин-8 – *CASP8* (RTPrimer DB ID 4438); ген, кодирующий белок CFLAR, регулятор апоптоза – *CFLAR* (RTPrimer DB ID 1716); ген, кодирующий транскрипционный фактор с-Мус – *C-Мус* (RTPrimer DB ID 3235); ген, кодирующий α -субъединицу гипоксия-индуцибельного фактора 1 – *HIF1A* (RTPrimer DB ID 4048); ген, кодирующий белок интерлейкин 10 – *IL10* (RTPrimer DB ID 157); ген, кодирующий белковую субъединицу ядерного фактора каппа-В – *NF-KB1A* (RTPrimer DB ID 64); ген, кодирующий транскрипционный гомеобокс протеин NANOG – *NANOG* (RTPrimer DB ID 3578) и одного не кодирующего локуса *HV2* митохондриальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [12]. В качестве референтного гена использовали ген, кодирующий белок β -актин – *ACTB* (RTPrimer DB ID 1). Подбор праймеров для каждого локуса осуществляли с помощью международной базы данных RTPrimer DB (<http://www.rtpimerdb.org/>) и на основании данных литературы.

ПЦР-РВ проводили в присутствии флуоресцентного интеркалирующего красителя Eva Green с использованием набора реактивов R-441 (ЗАО «Синтол», Россия) на приборе iCycler CFX96 (Bio-Rad, США). Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл и содержал 2,5 мМ $MgCl_2$, 5 пкМ каждого праймера, 0,25 мМ dNTP, 1x ПЦР-буфер и 1 ед. акт. HotTaq полимеразы. Матрица комплементарной ДНК была нормализована до 2–3 нг на реакцию. Амплификацию проводили с использованием следующей программы: первичная денатурация 95 °С – 4 мин; 40 циклов: 95 °С – 30 с, 58 °С – 20 с, 72 °С – 20 с.

Первичную обработку данных ПЦР-РВ-анализа проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX-Manager, ver. 2.1. Оценку уровня экспрессии генов относительно аналогичных показателей контроля рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Livak [13]. Для представления средних значений показателей транскрипционной активности генетических локусов мы использовали такой показатель, как медиана. Для статистического анализа использовали непараметрические описательные статистики и критерии оценки достоверности различий несвязанных выборок. Для оценки достоверности отличий и корреляционного

анализа полученных рядов применяли непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни и коэффициент корреляции Спирмена соответственно с использованием программного пакета Statistica 6.1.

Результаты и обсуждение

Для определения чувствительности выбранных биомаркеров для выявления РПЖ и их способности отражать стадийность развития этого заболевания мы провели сопоставление изменений транскрипционного паттерна изучаемых генетических локусов МНФ клеток периферической крови при РПЖ с аналогичными показателями контрольной группы.

Для демонстрации изменений экспрессии генетических локусов при развитии патологии ПЖ значения медиан ΔCt для каждого локуса в группах пациентов с ДГПЖ, РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4 были отнесены к аналогичному показателю в группе контроля. Транскрипционная активность изученных локусов в исследованных группах с различной патологией ПЖ (ДГПЖ, РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4) достоверно отличалась от аналогичных показателей контрольной группы в 7 из 16 изученных генетических локусов: *VEGFA*, *TP53*, *TNF- α* , *CASP8*, *HIF1A*, *NF-KB1A* и *HV2*. Транскрипционная активность локусов *VEGFA*, *CASP8*, *HIF1A* и *NF-KB1A* во 2-й группе статистически достоверно ($p < 0,05$) превышала аналогичные показатели контрольной группы (рис. 1, табл. 2).

Увеличение транскрипционной активности этих локусов может свидетельствовать об активизации процессов ангиогенеза (*VEGFA*), увеличении активности генов-регуляторов апоптоза (*CASP8*), тенденции перехода клеточного обмена веществ к анаэробному типу (*HIF1A*), более свойственному большинству онкотрансформированных тканей. Он играет важную роль в клеточном и системном ответе на гипоксию [14].

Существенное увеличение транскрипционной активности генетического локуса *NF-KB1A* в МНФ клеток может объясняться усилением транскрипционных процессов в ядрах МНФ в ответ на изменение цитокинового фона или активацией проапоптозных процессов в ответ на действие потенциальных повреждающих факторов [15].

Транскрипционная активность локуса хромосомной локализации *TNF- α* и локуса митохондриальной локализации *HV2* в группах пациентов с РПЖ статистически достоверно понижались по сравнению с контрольной группой. Понижение транскрипционной активности локуса хромосомной локализации *TNF- α* (в 2,0–2,5 раза) может свидетельствовать об отсутствии острых воспалительных процессов у пациентов, понижении их иммунного статуса и усилении антиапоптозного статуса организма. Комплекс этих изменений может допускать увеличение вероятности образования и развития опухолей в организме [16]. Понижение от-

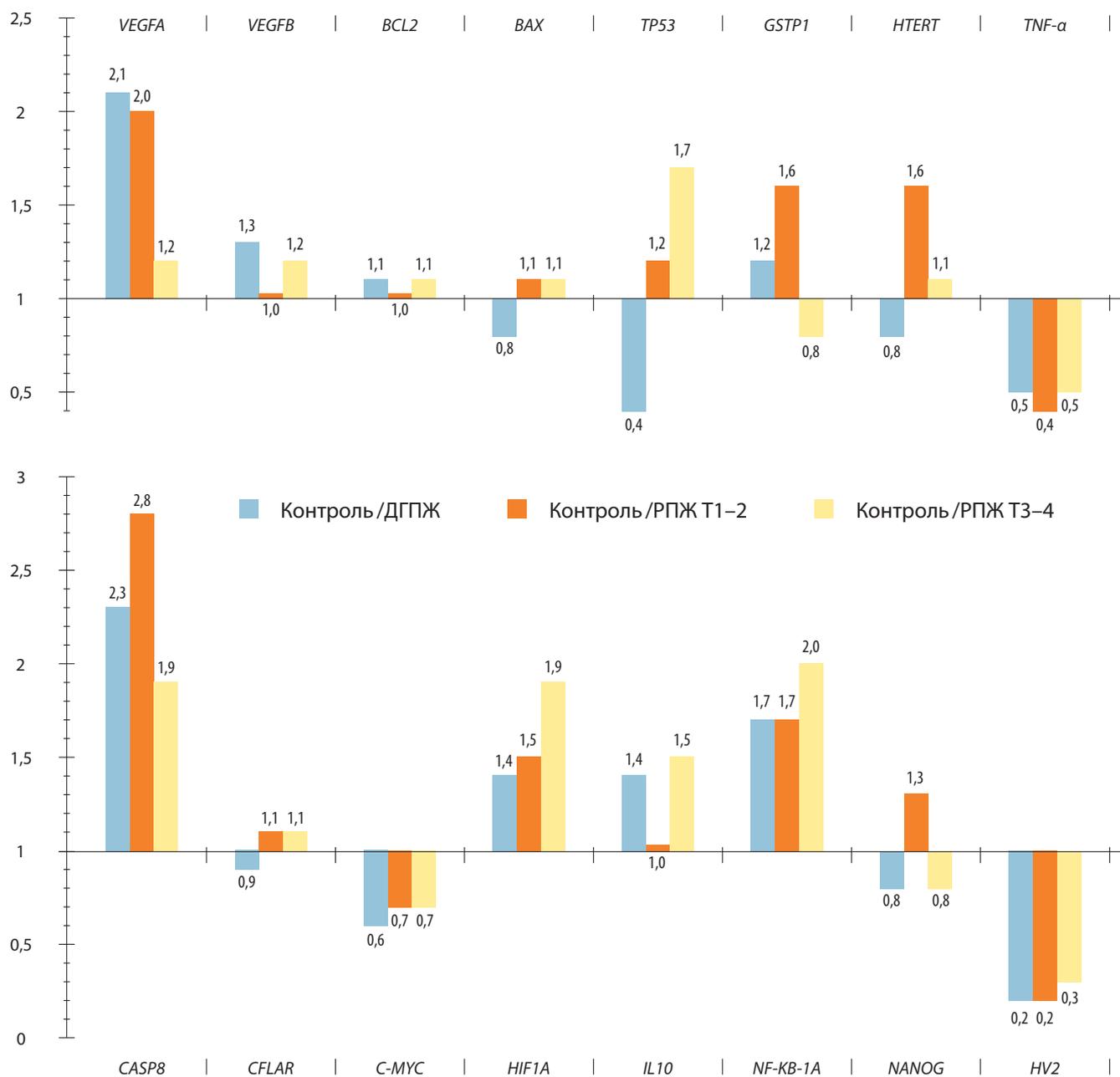


Рис. 1. Изменение уровней экспрессии 16 исследованных локусов в 3 экспериментальных группах по отношению к соответствующим показателям контрольной группы (кратность увеличения или уменьшения экспрессии гена по отношению к показателю контроля).

носительной экспрессии локуса митохондриальной локализации *HV2* является индикатором угнетения процессов окислительного фосфорилирования митохондриальной локализации и усиления гликолитических процессов, характерных для большинства раковых опухолей [17]. Ингибирование процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях МНФ периферической крови в нашем исследовании хорошо согласуется с активизацией транскрипционной активности локуса *HIF1A* (рис. 1).

Изменение транскрипционной активности локуса *TP53* в МНФ клеток периферической крови при развитии РПЖ испытывала разнонаправленные изменения. В частности, в 1-й группе транскрипционная активность этого локуса значительно снижалась (на 60%) относительно аналогичных показателей контрольной группы. И, наоборот, в группах пациентов с РПЖ активность этого генетического локуса превышала показатели контрольной группы (соответственно на 20 и 70%), возрастая в прямой зависимости

Таблица 2. Значения вероятностей различий (p) при попарном сравнении по экспериментальным группам с использованием U-критерия Манна-Уитни

Маркер	Контроль/ ДГПЖ	Контроль/ РПЖ Т1–2	Контроль/ РПЖ Т3–4	ДГПЖ/ РПЖ Т1–2	ДГПЖ/ РПЖ Т3–4	РПЖ Т1-2/ РПЖ Т3–4
VEGFA	0,0498	0,0104	нд	нд	нд	нд
VEGFB	нд	нд	нд	нд	нд	нд
BCL2	нд	нд	нд	нд	нд	нд
BAX	нд	нд	нд	нд	нд	нд
TP53	0,0142	нд	0,0250	0,0025	0,0002	нд
GSTP1	нд	нд	нд	0,0077	нд	0,0003
TERT	нд	нд	нд	нд	нд	нд
TNF-α	0,0001	0,00003	0,0008	нд	нд	нд
CASP8	0,0017	0,0090	нд	нд	нд	нд
CFLAR	нд	нд	нд	нд	нд	нд
C-MYC	нд	нд	нд	нд	нд	нд
HIF1A	0,0130	0,0003	0,0031	нд	нд	нд
IL10	нд	нд	нд	0,0379	нд	0,0267
NF-KB1A	0,00004	0,0003	0,0017	нд	нд	нд
NANOG	нд	нд	нд	нд	нд	нд
HV2	0,0005	0,0002	0,0022	нд	нд	нд

Примечание: нд – различия недостоверны.

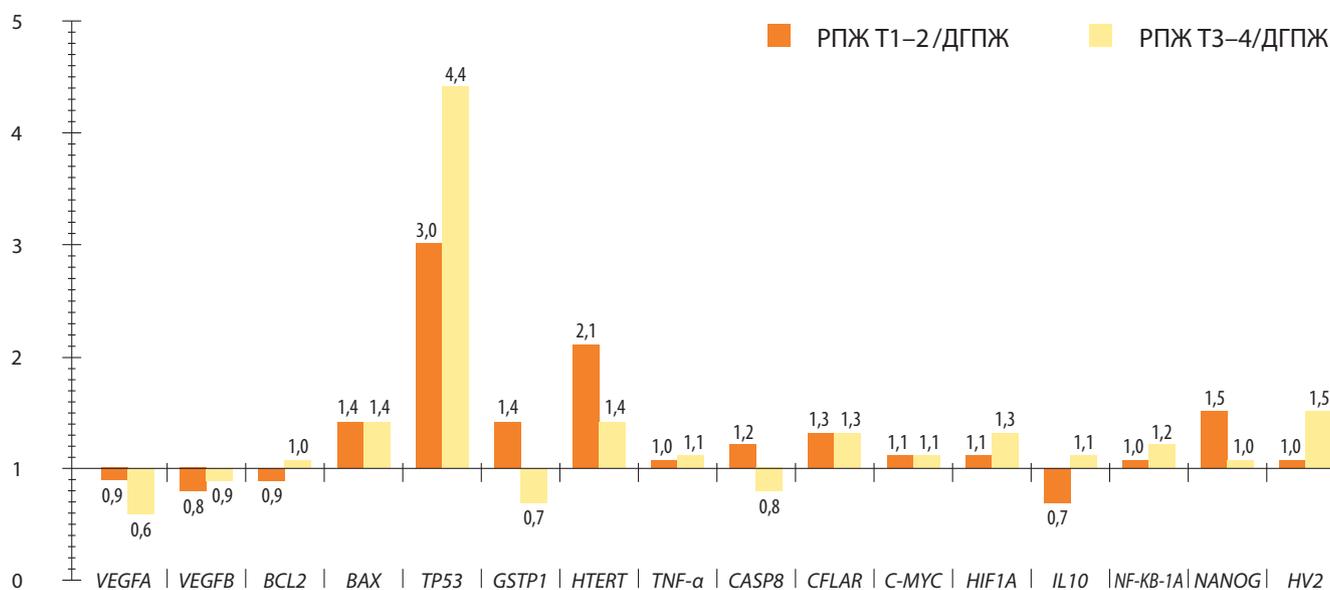


Рис. 2. Изменение транскрипционной активности генетических локусов в группах пациентов с РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4 по отношению к показателям группы ДГПЖ (медианы значений).

от стадии РПЖ (см. рис. 1). Наличие подобного эффекта в изменении экспрессии генетического локуса *TP53* может позволить эффективно дифференцировать ДГПЖ от начальных и более поздних стадий РПЖ. Клинический смысл подавления транскрипционной активности локуса *TP53* в МНФ крови пациентов с ДГПЖ может заключаться в ослаблении контроля со стороны организма над процессами тканевого роста, в данном случае гиперплазии ПЖ [18].

Статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами РПЖ Т1–2 и ДГПЖ наблюдались для транскрипционной активности 3 генетических локусов: *TP53*, *GSTP1* и *IL10*. При этом наиболее выраженные количественные отличия наблюдались в отношении увеличения транскрипционной активности генетического локуса *TP53* в ряду РПЖ Т1–2 (увеличение относительной экспрессии в 3 раза) и РПЖ Т3–4 (увеличение относительной экспрессии в 4 раза). Повышенная экспрессия гена *TP53* на фоне развития ракового заболевания нередко имеет компенсаторный характер: экспрессируется aberrантная функционально неполноценная форма данного белка, неспособного выполнять свои функции опухолевого супрессора [19].

Суммарное изменение экспрессии локуса *GSTP1* между группами больных РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4 в наших экспериментах достигало 110%. Аналогичный показатель для генетического локуса *IL10* уменьшался на 30% по сравнению с группой ДГПЖ, в то время как в группе РПЖ Т3–4 увеличивался на 10% (рис. 2).

Таким образом, изменение экспрессии локусов *IL10* и *GSTP1* между группами больных РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4 позволяет дифференцировать эти стадии развития патологического процесса с высоким уровнем достоверности (табл. 2).

Баланс про- и антиапоптозных белков в малигнизированных тканях нарушается. Поэтому прогностической ценностью могут обладать не только относительные и абсолютные значения транскрипционной активности генов, кодирующих эти белки, но и соотношения между транскрипционной активностью соответствующих про- и антиапоптозных генетических локусов (их баланс) [20]. Мы исследовали изменение транскрипционной активности про- и антиапоптозных локусов (*BAH* и *BCL2* соответственно) в МНФ клеток периферической крови во всех исследуемых группах. Статистически значимых отличий в изменении транскрипционной активности этих генетических локусов при РПЖ, как показано выше, не обнаружено. Однако при сопоставлении транскрипционной активности про- и антиапоптозных локусов *BAH* и *BCL2* установлено, что различные стадии РПЖ по этому показателю статистически достоверно отличаются друг от друга (рис. 3).

В частности, в контрольной группе в соотношении транскрипционной активности этих двух локусов пре-

обладала активность проапоптозного локуса *BAH*, превосходящая на 17% аналогичный показатель локуса *BCL2*. Это показывает, что в МНФ периферической крови здоровых мужчин транскрипционная активность генетических локусов, регулирующих апоптотический баланс, смещена в сторону преобладания проапоптозных генов. Однако уже при ДГПЖ баланс между транскрипционной активностью этих генетических локусов существенно изменяется. ДГПЖ характеризуется преобладанием транскрипционной активности антиапоптозного генетического локуса *BCL2* по сравнению с локусом *BAH*. Различия в соотношении активности этих локусов между группами контроля и ДГПЖ носят статистически достоверный характер для ДГПЖ ($p < 0,05$, U-критерий Манна–Уитни). Суммарное изменение в активности этих локусов между группами контроля и ДГПЖ составило 40%. При сравнении 2-й и 3-й групп рассматриваемый показатель статистически достоверно снижался для 3-й группы ($p < 0,05$, U-критерий Манна–Уитни). Статистически значимых различий с использованием данных критериев между 1-й и 2-й группами не выявлено.

Использование показателей соотношения транскрипционной активности генетического локуса *BCL2* по сравнению с локусом *BAH* в МНФ клеток периферической крови позволяет эффективно дифференцировать группы контроля и ДГПЖ, а также группы с РПЖ с уровнем достоверности $p < 0,05$. Различение 1-й и 2-й групп с использованием данного критерия не представляется возможным. Это позволяет предположить, что наиболее существенное изменение в балансе про- и антиапоптозных генов в МНФ клеток периферической крови происходит уже при ДГПЖ.

При использовании показателей относительной экспрессии генетических локусов МНФ крови нам

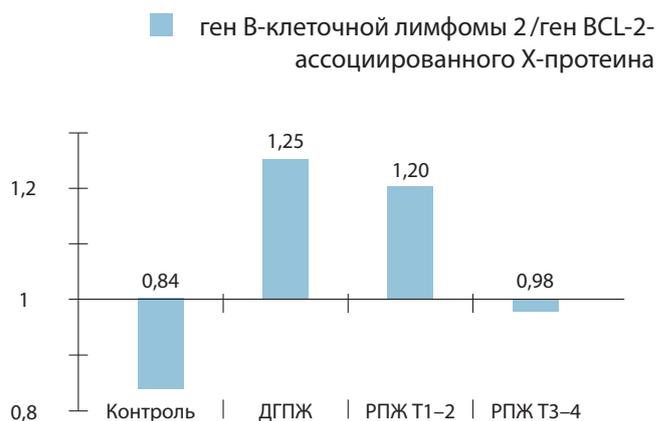


Рис. 3. Отношение транскрипционной активности антиапоптозного локуса *BCL2* к транскрипционной активности проапоптозного локуса *BAH* в контрольной группе и в группах пациентов с ДГПЖ, РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4 (медианы значений относительной транскрипционной активности).

удалось достоверно дискриминировать следующие группы:

- 1-я группа против контрольной группы по 7 генетическим локусам: *VEGFA*, *TP53*, *TNF- α* , *CASP8*, *HIF1A*, *NF-KB1A* и *HV2* и по изменению соотношения *BAX/BCL2*.

- 2-я группа против контрольной группы по 6 генетическим локусам: *VEGFA*, *TNF- α* , *CASP8*, *HIF1 α* , *NF- κ B1A* и *HV2*.

- 3-я группа против контрольной группы по 5 генетическим локусам: *TP53*, *TNF- α* , *HIF1A*, *NF-KB1A* и *HV2*.

- 1-я группа против 2-й группы по 3 генетическим локусам *TP53*, *GSTP1* и *IL10*.

- 1-я группа против 3-й группы — по генетическому локусу *TP53*.

- 3-я группа против 2-й группы — по генетическим локусам *GSTP1* и *IL10* и по изменению соотношения *BAX/BCL2*.

Изменения относительной экспрессии таких генетических локусов, как *VEGFA*, *TNF- α* , *GSTP1*, *IL10*, *HIF1A* и *NF-KB1A*, подтверждают факт участия лейкоцитов периферической крови в процессах онкогенеза на системном уровне и отражают паракринный характер регуляции процесса малигнизации со стороны МНФ клеток периферической крови. Основные и наиболее значимые различия в изменении транскрипционной активности большинства исследованных нами локусов отмечены при ДГПЖ, особенно относительно аналогичных показателей контрольной группы.

Развитие РПЖ по сравнению с ДГП затрагивает изменение транскрипционного статуса меньшего количества генетических локусов. Это затрудняет поиск биомаркеров для детекции РПЖ. Подавление экспрессии транскриптов митохондриальной-ДНК (*HV2*) в МНФ периферической крови подтверждает проявление эффекта Варбурга [17]. Этот факт также подтверждается усилением транскрипционной активности генетического локуса *HIF1A*, что характерно для

клеток в условиях гипоксии. Однако использование этих 2 биомаркеров (*HIF1A* и *HV2*) для определения стадии опухолевого процесса невозможно из-за того, что они не позволяют дифференцировать ДГПЖ и РПЖ Т1–2 (см. рис. 2 и табл. 2). Это связано с тем, что транскрипционная активность подавляющего большинства исследованных нами локусов статистически достоверно изменяется при ДГПЖ и продолжает оставаться без существенных изменений своего статуса в группах пациентов с РПЖ Т1–2 и РПЖ Т3–4. Это свидетельствует о том, что простатическая гиперплазия и малигнизация характеризуются гликолитическим типом обмена веществ и стимуляцией ангиогенеза, что имеет место как при ДГПЖ так и при РПЖ.

Показатели величин экспрессии изученных в настоящем исследовании маркеров не выявили достоверной корреляции с уровнем ПСА, и поэтому они могут быть эффективно использованы в качестве независимых маркеров для повышения достоверности диагностики РПЖ. При комплексном использовании изменения величины транскрипционной активности генетических локусов *TP53*, *GSTP1* и *IL10* при дискриминации групп ДГПЖ и РПЖ Т1–2 специфичность составляет 90%, чувствительность — 93% [21].

Выводы

Обнаружено значимое изменение экспрессии генетических локусов *TP53*, *GSTP1* и *IL10* МНФ крови при РПЖ в сравнении с ДГПЖ. Экспрессия генетического локуса *TP53* может явиться эффективным критерием дифференцировки ДГПЖ и начальных стадий РПЖ. Увеличение экспрессии генетического локуса *GSTP1* и уменьшение экспрессии *IL10* может служить дифференцирующим критерием ДГПЖ и ранних стадий РПЖ. Изменение отношения транскрипционной активности антиапоптозного локуса *BCL2* к транскрипционной активности проапоптозного локуса *BAX* может стать маркером детекции локальной и местно-распространенной стадии РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jemal A., Siegel R., Xu J. et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5):277–300.
2. Stamey T., Johnstone I., McNeal J. et al. Preoperative serum prostate specific antigen levels between 2 and 22 ng/ml correlate poorly with post-radical prostatectomy cancer morphology: prostate specific antigen cure rates appear constant between 2 and 9 ng/ml. *J Urol* 2002;167:103–11.
3. Moreno J., Croce C., Fischer R. et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52(21):6110–2.

4. Showe M., Vachani A., Kossenkov A.V. et al. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells can distinguish patients with non-small cell lung cancer from patients with nonmalignant lung disease. *Cancer Res* 2009;69(24):9202–10.
5. Komatsu N., Matsueda S., Tashiro K. et al. Gene expression profiles in peripheral blood as a biomarker in cancer patients receiving peptide vaccination. *Cancer* 2012; 118(12): 3208–21.
6. Novelli G., Ciccacci C., Borgiani P. et al. Genetic tests and genomic biomarkers:

- regulation, qualification and validation. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008;5(2):149–54.
7. Perambakam S., Srivastava R., Peace D.J. et al. Distinct cytokine patterns exist in peripheral blood mononuclear cell cultures of patients with prostate cancer. *Clin Immunol* 2005; 117(1):94–9.
8. Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н. Молекулярно-генетические маркеры рака предстательной железы. *Вестник Южного научного центра* 2009;5 (1):36–52.
9. Berteau P., Dumas F., Gala J.-L. et al. Molecular detection of circulating prostate

- cells in cancer II: comparison of prostate epithelial cells isolation procedures. Clin Chemistry 1998;44(8):1750–3.
10. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156–9.
11. Le Corre L., Fustier P., Chalabi N. et al. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. Clin Chim Acta 2004;344(1–2):115–21.
12. Armed Forces Institute of Pathology. Amplification of mitochondrial DNA 2005. Version 6.0.
13. Livak K., Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25(4):402–8.
14. Ratcliffe P. From erythropoietin to oxygen: hypoxia-inducible factor hydroxylases and the hypoxia signal pathway. Blood Purif 2002;20(5):445–50.
15. Gilmore T. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. Oncogene 2006;25(51):6680–804.
16. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 2001; 104(4):487–501.
17. Kim J., Dang C. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. Cancer Res 2006;66(18):8927–30.
18. Read A., Strachan T. Human molecular genetics 2. New York: Wiley; 1999. ISBN 0-471-33061-2. Chapter 18: Cancer Genetics.
19. Новик А.А., Камилова Т.А., Цыган В.Н. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза. М.: ГЭОТАР-МЕД 2000:222 с.
20. Pollack A., Cowen D., Troncoso P. et al. Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x. Cancer 2003;97(7):1630–8.
21. Алексеева М.Л., Щедрина Р.Н., Фанченко Н.Д. и др. Онкомаркеры, их характеристика и некоторые аспекты клинико-диагностического использования (обзор литературы). Проблемы репродукции 2005;3:65–78.