

## Диагностические возможности сочетанной детекции амидолитической активности хепсина и метилирования гена *GSTP1* при раке и других заболеваниях предстательной железы

Е.Б. Васильева<sup>1</sup>, А.А. Ляшенко<sup>1,4</sup>, М.В. Савватеева<sup>2</sup>, Е.М. Кузнецова<sup>2</sup>, С.Е. Северин<sup>1,2</sup>, Е.С. Северин<sup>1,3</sup>, Д.Н. Фиев<sup>1</sup>, Ю.Г. Аляев<sup>1</sup>, А.З. Винаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ММА им. И.М. Сеченова; <sup>2</sup>МНИИМЭ; <sup>3</sup>Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения; <sup>4</sup>Центр Медицинских Биотехнологий, Москва

### DETECTION OF AMYDOLITIC ACTIVITY OF HEP SIN AND GENE *GSTP1* METHYLATION IN THE DIAGNOSIS OF CANCER AND OTHER DISEASES OF PROSTATE

Ye. B. Vassileva<sup>1</sup>, A. A. Lyashenko<sup>1,4</sup>, M. V. Savvateeva<sup>2</sup>, Ye. M. Kuznetsova<sup>2</sup>, S. Ye. Severin<sup>1,2</sup>, Ye. S. Severin<sup>1,3</sup>, D. N. Fiyev<sup>1</sup>, Yu. G. Aljaev<sup>1</sup>, A. Z. Vinarov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, RUSSIAN FEDERATION, <sup>2</sup>Moscow Institute of Medical Ecology, Moscow, <sup>3</sup>Research Center for Molecular Diagnostics & Therapy, Moscow, <sup>4</sup>Center of Medical biotechnologies, Moscow

*We have assessed the implication of analysis of amydolitic activity of hepsin, which is a trans-membrane serine protease of II type, in the detection of prostate cancer diagnosis. According to literature review over-expression of hepsin is characteristic for prostate cancer whereas prostatic cells do not express this protease in normal states and benign tumors of prostate. Our results have demonstrated the value of screening for hepsin activity in the diagnosis of prostatic pathologies which possibly is an adequate substitution for widely used test of prostate specific antigen determination.*

#### Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — одно из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у мужчин пожилого возраста. В настоящее время РПЖ занимает 2-е место в мире после рака легкого среди причин смерти мужчин от злокачественных новообразований. Летальность в первый год жизни после верификации диагноза составляет около 30%, что свидетельствует о крайне низкой выявляемости заболевания на начальных его стадиях и поздней обращаемости пациентов [1].

Традиционный метод диагностики РПЖ, основанный на измерении уровня простатического специфического антигена (ПСА), на данном этапе характеризуется заметным снижением своей диагностической ценности [2]. В связи с этим во всем мире ведется поиск и внедрение в клиническую практику новых маркеров, позволяющих дифференцировать РПЖ от других заболеваний предстательной железы.

На сегодняшний день, помимо ПСА, открыто множество маркеров РПЖ, с определением которых связаны надежды на разработку новых диагностических систем для ранней верификации диагноза. Одни из наиболее перспективных — определение протеазной активности белка хепсина и метилирование гена глутатион-S-трансферазы класса P1 (*GSTP1*).

Трансмембранный белок хепсин является сериновой протеазой II типа. В норме он экспрессируется на гепатоцитах, клетках щитовидной железы

и некоторых других тканях [3]. Экспрессия гена хепсина увеличивается при РПЖ в 90% случаев, тогда как в норме и при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) его экспрессия ничтожно мала [3]. При исследовании биоптатов предстательной железы было также показано, что степень экспрессии данного белка опухолевыми клетками коррелирует с динамикой опухолевого роста [4]. Таким образом, повышение экспрессии хепсина можно рассматривать в качестве важного диагностического критерия при РПЖ.

Глутатион-S-трансферазы (GSTs) составляют суперсемейство ферментов, отвечающих за детоксикацию, что предотвращает образование опасных метаболитов внутри клетки. Биохимическая функция GSTs — образование конъюгатов с электрофильными компонентами, а также со свободными радикалами, что нейтрализует их активность. В ряде случаев, особенно на фоне патологического метаболизма, экспрессия генов *GST* в клетке отсутствует (так называемый феномен молчания генов). Молекулярной основой этого феномена является метилирование промоторной области этих генов. Показано, что при РПЖ наблюдается снижение антиоксидантной активности за счет вышеуказанного механизма [5].

Поскольку изменения метаболизма при патологии предстательной железы, в частности при РПЖ, наблюдаются для обоих маркеров, мы полагаем, что совместная детекция активности хепсина

и метилирования гена *GSTP1* может увеличить вероятность постановки правильного диагноза.

**Материалы и методы**

Исследуемым материалом послужили клетки, полученные из мочи больных хроническим простатитом (ХП), пациентов с подозрением на РПЖ, а также здоровых добровольцев (отрицательный контроль). Мочу собирали после пальцевого ректального исследования. Для положительного контроля использовали клетки РПЖ человека — LnCaP.

Определение хепсина проводили амидолитическим (хромогенным) методом [6]. В качестве хромогенного субстрата применяли паранитроанилин с максимумом поглощения при 405 нм.

Для обнаружения метилирования промоторной области гена *GSTP1* был использован модифицированный нами метод метабисульфитной обработки геномной ДНК и анализ met-ПЦР (полимеразная цепная реакция) [7].

Морфологически диагноз подтверждался результатами биопсии. Пациентам с ХП биопсию не проводили.

Статистический анализ выполняли с помощью непараметрического  $\chi$ -критерия (с поправкой Йетса). Анализировали частоты бинарных признаков с применением таблиц сопряженности  $2 \times 2$ . Уровень для отсека нулевой гипотезы принимался как  $p < 0,05$  [8].

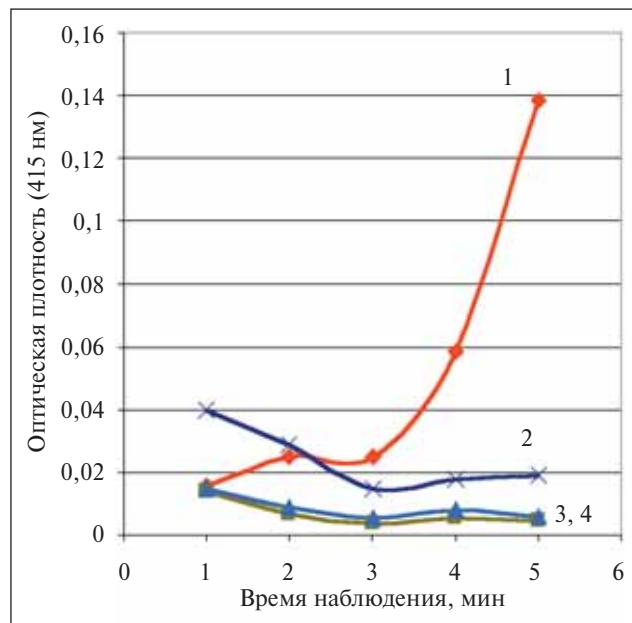
**Результаты и обсуждение**

Проанализировав амидолитическую активность хепсина на разных линиях опухолевых клеток (рис. 1), мы пришли к выводу, что хепсин синтезируется опухолевыми клетками предстательной железы в больших количествах (кривая 1), в то время как клетками других опухолевых линий данный белок синтезируется значительно меньше (кривые 2–4). В ходе исследования нами были установлены высокая специфичность используемого хромогенного субстрата к хепсину и возможность с его помощью количественно определять активность хепсина.

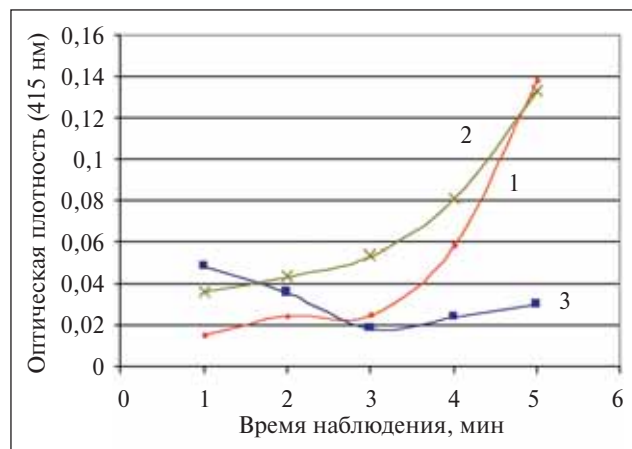
Мы также провели измерение амидолитической активности хепсина в образцах мочи здорового донора и пациента с РПЖ (рис. 2), после чего сравнили полученные результаты с данными по активности хепсина, выявленными на клетках LnCaP. Результаты измерений позволили нам сделать вывод, что активность хепсина на опухолевых клетках больных РПЖ (кривая 2) имеет общую тенденцию с таковой у клеток LnCaP (кривая 1). Как видно из рис. 2, у добровольцев активность хепсина представлена минимальными значениями (кривая 3). Следовательно, можно использовать данный метод определения хепсина для диагностики РПЖ, а клетки линии LnCaP — в качестве положительного контроля.

В ходе статистической обработки данных в качестве уровня "отсечения" для отнесения пациента к группе РПЖ был принят уровень протеолитической активности хепсина, составляющий не менее 39% и выше от активности, детектированной на клетках LnCaP.

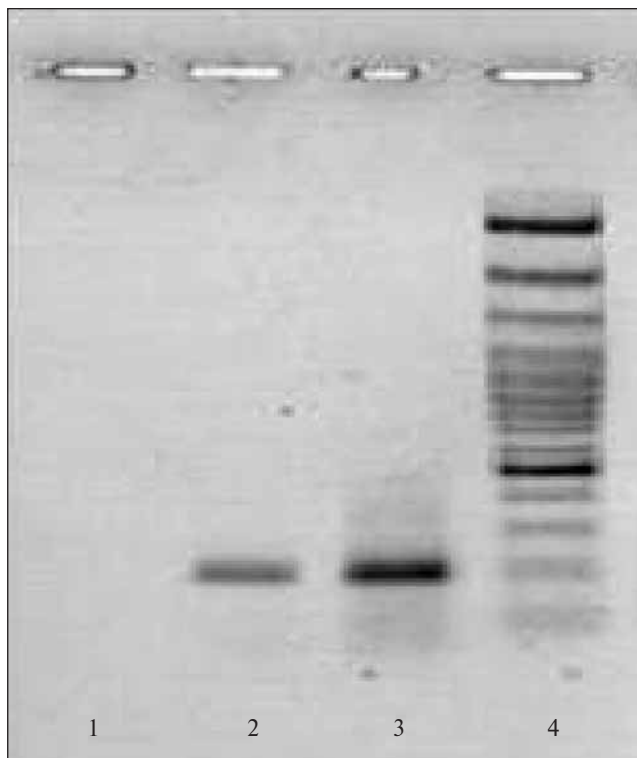
Нами было проанализировано 40 образцов мочи: 20 — от больных гистологически верифицированным РПЖ, 15 — от пациентов с гистологически верифицированной простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН) и ДГПЖ и 5 — от боль-



**Рис. 1.** Кинетика амидолитической активности хепсина: 1 — LnCaP (положительный контроль); 2 — HT 1080 — фибросаркома соединительной ткани; 3 — HeLa — аденокарцинома шейки матки; 4 — HEK-293 — первичный рак почки



**Рис. 2.** Кинетика амидолитической активности хепсина в моче больного РПЖ: 1 — LnCaP (положительный контроль); 2 — образец мочи больного РПЖ; 3 — образец мочи здорового добровольца (отрицательный контроль)



**Рис. 3. Метилирование гена *GSTP1* при РПЖ:**  
 1 — отсутствие метилирования (отрицательный контроль — здоровый доброволец); 2 — метилирование (пациент Б. с РПЖ); 3 — метилирование (положительный контроль — линия клеток *LnCaP*); 4 — маркер молекулярной массы

ных ХП. Контрольная группа состояла из 7 человек — здоровых добровольцев. Положительная прогностическая ценность (доля истинно положительных ответов среди всех положительных) [9] определения активности хепсина на образцах мочи больных РПЖ составляла величину порядка 0,71 ( $p=0,020$ ), тогда как у пациентов с ПИН I—II степени и ДГПЖ — 0,25 и 0,14 соответственно.

В группе контроля и у больных ХП активность хепсина, с учетом чувствительности тест-системы и специфичности хромогенного субстрата, детектируется в количестве менее 7% относительно положительного контроля, что существенно ниже установ-

ленного нами уровня отсечения в 39%. Мы полагаем, что данный тест обладает возможностью детекции некоторых фоновых значений, что свидетельствует о вероятном присутствии небольшого количества других сериновых протеиназ на исследуемых клетках здоровых добровольцев. Издержки этого определения не вносят существенных изменений в анализ получаемых данных и не влияют на общие выводы по прогнозу. Обучающая выборка с известными диагнозами позволяет контролировать правильность отнесения к той или иной группе по данному маркеру.

Параллельно анализировали уровень ПСА и установили, что его повышение и выход за пределы серой шкалы (4—10 нг/мл) при РПЖ наблюдали лишь в 57% случаев, что по диагностической ценности существенно уступало предсказанию в отношении определения активности хепсина.

Таким образом, измерение активности хепсина позволило с большой долей вероятности отличить РПЖ от других заболеваний предстательной железы.

Метилирование гена *GSTP1* при РПЖ, согласно полученным данным, наблюдали лишь в 43% случаев. При этом при ХП, ДГПЖ и ПИН различных стадий ген *GSTP1* метилируется в 38% случаев. Полученные данные не позволили достоверно различить заболевания «опухоловой» и «неопухоловой» природы ( $p=0,81$ ). Это говорит о том, что применение данного маркера не позволяет дифференцировать рак от других заболеваний предстательной железы. С другой стороны, установлено, что у здоровых мужчин метилирование гена *GSTP1* не наблюдается (рис. 3). Можно полагать, что определение метилирования гена *GSTP1* будет использоваться в качестве молекулярного маркера патологических процессов, имеющих место в предстательной железе, т.е. данный подход может применяться для мониторинга состояния предстательной железы.

Необходимо отметить, что диагностическая ценность предсказаний при помощи только 1 маркера значительно уступает таковой при сочетанном предсказании с использованием 2 маркеров. Совместное определение метилирования гена *GSTP1* и амидоли-

*Положительная прогностическая ценность маркеров в диагностике РПЖ*

Маркер	Положительная прогностическая ценность	
	данные литературы	данные эксперимента
ПСА общий (при концентрации в крови 4 нг/мл)	0,421 [10]	0,405
met-GSTP1	0,958 [11]	0,5
Хепсин	0,663 [12]	0,71
met-GSTP1 + хепсин	—	0,845

тической активности хепсина у одних и тех же пациентов позволяет диагностировать РПЖ у пациентов с более высокой, чем по одному маркеру, вероятностью. Нами проведена оценка положительной прогностической ценности наших маркеров и ПСА среди отобранных для эксперимента пациентов (см. таблицу). Установлено, что положительная прогностическая ценность совместного определения обоих маркеров составляет 0,845.

Приводим типичное клиническое наблюдение. Пациент Б., 70 лет, 26.06.2007 поступил в урологическую клинику ММА им. И.М. Сеченова с подозрением на РПЖ. По данным проведенных обследований: ПСА общий — 6,1 нг/мл, ТРУЗИ (трансректальное ультразвуковое исследование) — объем предстательной железы 52 см<sup>3</sup>, метилирование промоторной области гена *GSTP1* — положительно, определение активности хепсина — положительное. Для уточнения диагноза пациенту Б. 29.06.2007 была выполнена полифокальная биопсия предстательной железы под ультразвуковым (УЗ) контролем. Гистологическое заключение: железисто-фиброзная гиперплазия предстательной железы с участками ПИН I—II степени. Диагноз: гиперплазия предстательной железы, VI. prostate. Рекомендовано проведение повторной биопсии через 3 мес. 30.10.2007 пациенту Б. была выполнена повторная

биопсия под УЗ-контролем. Гистологическое заключение: аденокарцинома, железисто-фиброзная гиперплазия предстательной железы с участками ПИН I—II степени. Перед выполнением повторной биопсии также проводились исследования по определению активности хепсина и уровня метилирования, результаты которых вновь оказались положительными. Таким образом, на основании данных клинических наблюдений продемонстрирована значительная прогностическая ценность комбинации обоих маркеров.

#### Заключение

Результаты наших исследований показали, что использование скринингового теста, основанного на совместном определении активности хепсина и метилирования гена *GSTP1*, способно дополнить, а возможно, и заменить существующий на сегодняшний день в клинике тест на определение ПСА.

#### Литература

1. Клинические рекомендации. Онкология. Под ред. В.И. Чисова и С.Л. Дарьковой. М., GEOTAR-Медиа; 2006.
2. Скрининг рака предстательной железы. Методические рекомендации № 543-ПД/623. Сивков А.В. и др.; 2006.
3. Stephan C. et al. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J Urol* 2004;171:187—91.
4. Wu Q., Parry G. Hepsin and prostate cancer. *Frontiers in Bioscience* 2007;12:5052—9.
5. Cairns P. et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by *GSTP1* hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2001;7:2727—30.
6. Лабинская Т.А. Принципы лабораторной диагностики тромбофилий. Лаборатория 1997;(8).
7. Jerónimo C. et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8472—8.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., МедиаСфера; 2006.
9. Ригельман Р.К. Как избежать врачебных ошибок. Пер. с англ. М., Практика; 1994.
10. Велиев Е.И. Ранняя диагностика локализованных форм рака предстательной железы. *Моск здравоохран* 2004;(2):20—3.
11. Enokida H. et al. Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:6582—8.
12. Rhodes D.R. et al. Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2003;95(9):661—8.

## Анализ результатов биопсий предстательной железы, выполненных с 10-летним интервалом

И. Ромич<sup>1</sup>, Г. Банфи<sup>1</sup>, Т. Гласз<sup>2</sup>, Э. Жекели<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Отделение урологии, <sup>2</sup>2-е отделение патологии Медицинского университета Семмельвейса, Будапешт

### THE ANALYSIS OF THE RESULTS OF PROSTATE CANCER BIOPSIES PERFORMED AFTER A 10-YEAR INTERVAL

I. Romics<sup>1</sup>, G. Banfi<sup>1</sup>, T. Glasz<sup>2</sup>, E. Szekely<sup>2</sup>

Semmelweis University, <sup>1</sup>Department of Urology, <sup>2</sup>2nd Department of Pathology, Budapest

**Introduction and objective:** the authors compared the results of biopsies performed in 1994 and 2004, respectively.

The analysis of the results of prostate biopsy obtained in 1994 and 2004 was carried out. Prostate cancer is the most common malignant tumor in males; its diagnostic algorithm and therapy were analyzed. The aim of the study was to compare data from the prostate biopsies performed in 1994 with those of 2004. During this decade, 4.5 fold increase of the number of prostate biopsies has been observed. In 1994, 36.2%, while in 2004, 47.5% of the biopsies proved to be a cancer. The mean age of the patients undergoing biopsy decreased from 69.7 to 62.3 years; however, the mean age of patients who were suffering from prostate cancer remained constant (70.8 vs. 71.3 years). Conclusions: Whereas in 1994 only the total level of PSA was estimated, in 2004 the diagnostic algorithm included additional measurements of free-PSA and PSA-density. Prostate biopsy was performed by a trans-rectal ultrasound guided technique unlike the blind or trans-perineal methods which were only available previously. Although the effectiveness of the prostate biopsy is improved, the diagnosis and identification of prostate cancer at a younger age remains to be a challenge. The Gleason score marking the aggressiveness of the prostate cancers was lower; therefore, more patients were found suitable for curative surgery. However, the increased mean value of PSA level indicated that patients were still rather of a more advanced stage in majority, which could only be treated by palliative therapy.

**Keywords:** prostate cancer, biopsy, PSA