

**Г.Д. Телегєєв¹, Л.О. Поліщук¹, Т.Ю. Лисецька¹, Л.П. Швачко¹,
М.В. Дибков¹, О.Е. Стаховський², Ю.В. Вітрук², Е.О. Стаховський²**

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Національний інститут раку, Київ

РОЗРОБКА І ТЕСТУВАННЯ КОМПЛЕКСНОЇ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ НОВОУТВОРЕНЬ СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ



Розроблена і протестована система комплексної неінвазивної діагностики новоутворень сечостатевої системи на основі використання молекулярно-генетичних показників – визначення наявності *tmprss2/erg* перебудови методом зворотньо-транскриптазної ланцюгової реакції (ПЛР), рівня експресії генів *pca3/psa* та *sxcr4* за допомогою кількісної ПЛР, статусу метилювання промоторної ділянки гена *gstp1* за допомогою метил-специфічної ПЛР.

Ключові слова: діагностика, злякисні новоутворення сечостатевої системи, гени *tmprss2*, *erg*, *pca3*, *psa*, *gstp1*, *sxcr4*.

Злякисні новоутворення сечостатевої системи займають одне з перших місць серед інших онкологічних захворювань. Рак передміхурової залози стоїть на другому місці після захворювань на рак легень. В Україні щорічно спостерігається тенденція до зростання захворювань на рак сечостатевої системи. Ця проблема вкрай важлива не тільки з медичної, але і з соціальної точки зору. За останні роки в онкоурології досягнуто значних успіхів: суттєво збільшився арсенал діагностичних можливостей при використанні променевих, морфологічних, генетичних та молекулярно-біологічних методик, широко використовуються ендоскопічні, лапароскопічні, променеві та інші сучасні технології для оптимізації та розробки нових методів комплексного лікування онкоурологічних захворювань, ефективність яких прямо залежить від часу встановлення діагнозу.

В останні роки відкрито нові, високочутливі діагностичні маркери, що дозволяють діагностувати онкозахворювання на доклінічній стадії, оцінювати ступінь злякисності пухлини, давати більш точний прогноз, призначати ефективні методи терапії. У числі перспективних і тих, що активно впроваджуються, є молекулярно-генетичні методи. Значною мірою на даному етапі досліджень найбільш точними вважаються методи визначення експресії гена *pca3*, промоторного метилювання гена *gstp1*, злиття *tmprss2/erg* та встановлення гіперекспресії рецептора хемокінів *sxcr4* [1, 2].

Результати наших досліджень можуть бути використані і з терапевтичною метою. Наприклад, в попередній роботі [3] ми виявили, що інгібування *sxcr4* малими молекулами антагоніста AMD3100 або блокування *sxcr4/cxcl12* взаємодії нейтралізуючими анти-*sxcr4* антитілами можуть специфічно інгібувати проліферацію клітин попередників популяції РСЗ та DU145 клітинних ліній передміхурової залози *in vitro* і *in vivo* і перешкоджати зростанню

пухлин на тваринних моделях, крім того, при ксенотрансплантації пухлин простати в дослідженнях з монотерапією.

Таким чином, створення ефективної тест-системи визначення молекулярно-генетичних маркерів, характерних для різних форм неоплазм є вкрай необхідним як для молекулярної діагностики і прогнозу, так і для вибору тактики лікування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Виділення РНК проводили за допомогою комерційних наборів, які забезпечують отримання 0,5–5 мкг тотальної РНК, або загальноприйнятим методом [4]. У роботі використані спеціально розроблені нуклеотидні праймери для вивчення генів *tmprss2*, *erg*, *pca 3*, *gstp 1*, *cxcr 4* та химерного гена *tmprss2/erg*. Підбір всіх праймерів проводили за допомогою програм Primer-BLAST, OligoAnalyzer 3.1 (див. табл. 1).

Підбір праймерів для проведення зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) аналізу проводили згідно з послідовностями NM_005656 Homo sapiens transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2) mRNA та NM_004449 Homo sapiens v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG)

mRNA. Схему утворення злитого гена та ділянки можливих розривів показано на рис. 1.

Для підтвердження нормального синтезу кДНК були використані як комерційні набори праймерів (зазвичай використовують тести для визначення бета-актину, 18S рРНК тощо), так і праймери для виявлення нормального гена *abl*. Візуалізацію продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлення наявності химерного гена *tmprss2/erg* та експресії *cxcr 4* у хворих на злоякісні новоутворення сечостатевої системи

Виходячи з літературних даних, можна констатувати, що у 87 % випадків *tmprss2* екзон 1 зливається з екзонами 4–6 *erg* (див. рис. 1). Однак існує і багато інших варіантів перебудов [5]. Химерний ген *tmprss2/erg* виявляють у 60,3 % пацієнтів з первинним раком передміхурової залози та в 42,9 % з гормон-нечутливими метастазами у лімфатичних вузлах. Припускається, що продукт гібридного гена *tmprss2/erg* призводить до дерегуляції андрогензалежного фактора *erg* та до гіперактивації рецептора хемокинів *cxcr4*, який бере участь в адгезії, міграції, інвазії та метастазуванні [6],

Таблиця 1

Олігонуклеотидні праймери, що були використані в роботі

Мета створення	Послідовність нуклеотидів		Довжина фрагменту
Детекція <i>tmprss2/erg</i>	етап 1	t/erg-2F AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG t/erg-1R TCTGGAAGGCCATATCTTTTCAC	1021 п.н. 936 п.н.
	етап 2	t/erg-2F AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG t/erg-2R TAACTCTGCGCTCGTTCGTG	
Детекція <i>cxcr4</i>	CXCR4F- GGCCCTCAAGACCACAGTCA CXCR4R -TTAGCTGGAGTGAAAACCTTGAAG		352 п.н.
Позитивний контроль	Ia bcr f- AAATGTTGGAGATCTGCCTGAAG		314 п.н.
	Ib bcr f- TTATCAAAGGAGCAGGGAAGAAG		305 п.н.
Детекція <i>gstp1</i>	P190-R- TTGACTGGCGTGATGTAGTTGC		
	F -GATTTGGGAAAG AGGGAAGG R-CTAAAAACTCTAAACCCCATCC		310 п.н.

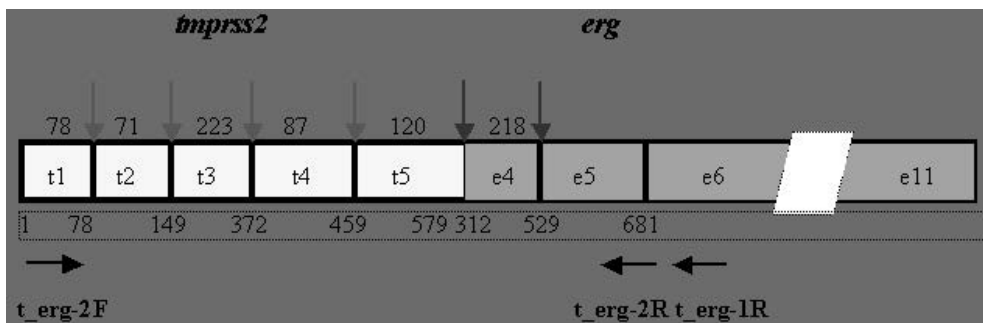


Рис. 1. Схематичне зображення злитого гена *tmprss2/erg*, тип перебудови t5/e4; t1-t5 – 1–5 екзони гена *tmprss2*; e4,e5,e6,e11 – 4,5,6 та 11 екзони гена *erg*

що, зокрема, призводить до радіорезистентності стовбурових клітин пухлини під час променевої терапії. Тому наявність злитого гена *tmprss2/erg* пов'язують з більш агресивним ростом, метастазуванням та підвищеною радіорезистентністю пухлин. Виявлення химерного гена *tmprss2/erg* є перспективним генетичним маркером для малоінвазивної діагностики у пацієнтів з раком предміхурової залози.

На рис.1 наведена схема можливих перебудов при утворенні химерного гена *tmprss2/erg*. Як видно з рисунку, до складу химерного гена можуть входити екзони 1–5 (t1-t5) гена *tmprss2* та 4–11 або екзони 5–10 гена *erg*. Максимальна довжина фрагментів після проведення ПЛР – 1021 п.н. (для випадку перебудови t5/e4 див рис. 1 та табл. 2.)

Вертикальними стрілками вказано місця можливих розривів при утворенні злитого гена. Нумерація дана згідно з послідовністю NM_005656 Homo sapiens transmembrane protease, serine 2 (*tmprss2*) mRNA та NM_004449 Homo sapiens v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (*ERG*) mRNA. Горизонтальними стрілками вказані місця відпалювання олігонуклеотидних праймерів, які запропоновано для виявлення перебудови генів.

Для виявлення химерного гена *tmprss2/erg* за допомогою ПЛР було проведено оптимізацію умов її проведення для отримання високо специфічного продукту ампліфікації кДНК у кількості, достатній для подальшого виявлен-

ня фрагментів ДНК за допомогою електрофорузу в агарозному гелі. З метою створення таких умов нами проводився аналіз послідовностей кДНК та ДНК-матриць для ПЛР та підібраних специфічних олігонуклеотидних праймерів. Визначені найбільш важливі параметри реакційної суміші: концентрація іонів магнію, кількість ферменту – термостабільної Таq-полімерази та концентрація праймерів. Критичними вимогами до температурних режимів були температура відпалювання праймерів на ДНК-матриці та температура денатурації. Варіації часових режимів включали співвідношення періоду денатурації до періоду відпалювання праймерів та оптимальний час фази синтезу, а також загальну кількість повних циклів реакції. У результаті дослідження цих параметрів нами запропоновані такі температурно-часові режими для виявлення химерного гена *tmprss2/erg* та виявлення гена *abl* як позитивного контролю.

Для першого етапу ПЛР було підібрано праймери (див.табл.1) $T_{opt} = 59,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $T_{m-Diff} =$

Таблиця 2

Основні можливі розміри ампліфікатів після першого етапу ПЛР при виявленні химерного гена *tmprss2/erg*, п.н.

Екзони генів <i>erg\ tmprss2</i>	t1	t2	t3	t4	t5
e4	520	591	814	901	1021
e5	302	373	596	683	803

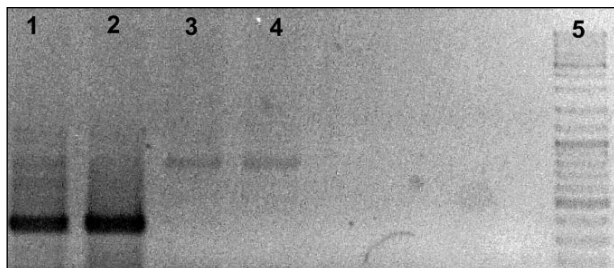


Рис. 2. Електрофореграма фрагментів ПЛР аналізу пацієнта А, хворого на рак простати: 1 – ампліфікат *sscr4* 352 п.н. (РНК виділено з пухлини хворого); 2 – ампліфікат *sscr4* 352 п.н. (РНК виділено з периферичної крові хворого); 3 – ампліфікат злитого гена *tmprss2/erg* 816 п.н., тип злиття t4/e4 згідно з даними табл. 3. (РНК виділено з сечі після масажу передміхурової залози); 4 – ампліфікат злитого гена *tmprss2/erg* 816 п.н., тип злиття t4/e4 (РНК виділено з периферичної крові); 5 – маркер молекулярної маси ДНК DNA Ruler 100bp

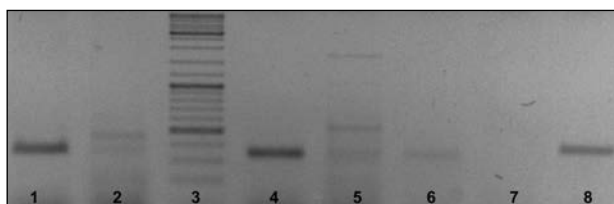


Рис. 3. Електрофореграма фрагментів ПЛР аналізу пацієнтів Б і В, прооперованих з приводу раку передміхурової залози: 1 – ампліфікат *sscr4* 352 п.н. (РНК виділено з периферичної крові хворого Б); 2 – ампліфікат злитого гена *tmprss2/erg* (РНК виділено з периферичної крові хворого Б); 3 – маркер молекулярної маси ДНК DNA Ruler 100bp; 4 – ампліфікат *sscr4* 352 п.н. (РНК виділено з нічної сечі хворого Б); 5 – ампліфікат злитого гена *tmprss2/erg* (РНК виділено з нічної сечі хворого В); 6 – ампліфікат *sscr4* 352 п.н. (РНК виділено з нічної сечі хворого В); 7 – негативний контроль *sscr4* (РНК виділено з нічної сечі здорового донора); 8 – позитивний контроль, перевірка ПЛР реакції

Таблиця 3

Основні можливі розміри ампліфікатів після другого етапу ПЛР при виявленні химерного гена *tmprss2/erg*, п.н.

Екзони генів <i>erg</i> \ <i>tmprss2</i>	t1	t2	t3	t4	t5
e4	435	506	729	816	936
e5	217	288	511	598	718

= 0,2 °С. Імовірна довжина фрагментів після проведення вказана на рис. 1 та табл. 2.

Для другого етапу ПЛР було підібрано праймери $T_{opt} = 59,3$ °С та $T_{m-Diff} = 0,2$ °С. Імовірна довжина фрагментів після проведення ПЛР вказана на рис. 1 та табл. 3.

Першим етапом розробки була перевірка роботи праймерів на зразках крові і сечі здорових донорів. Дані не наведені.

Тестування молекулярно-діагностичних протоколів проведено на зразках клітин сечі після масажу простати, нічної сечі та периферійної крові хворих (хворий А, № 7272 (див. рис. 2) та хворий Б., № 7943 (див. рис. 3)).

Молекулярно-генетичне виявлення транскриптів генів *psa3* і *psa* та їх застосування для діагностики раку простати

Одним з перспективних маркерів для діагностування раку простати є ген *psa3* (prostate cancer antigen-3, раніше відомий як dd3). Вперше про гіперекспресію мРНК цього гена було повідомлено в 1999 р. [7]. Зокрема було показано, що рівень експресії у клітинах пухлин зростає в 70–100 разів у порівнянні з нормальними клітинами простати. У подальшому ці результати було підтверджено [8–10]. Ген *psa3* локалізовано на 9-й хромосомі людини в ділянці 9q 21–22. Після сплайсингу в мРНК представлений переважно трьома формами, які містять ділянки різної протяжності трьох екзонів – 1, 3 та 4 [11]. Описано також транскрипти, які включають і 2-й екзон, але вони не виявляються у зразках із гіпертрофією тканин [12]. Дотепер немає достовірних даних щодо можливої кореляції рівня експресії мРНК *psa3* тканин простати і стадії пухлини чи характеру агресивності протікання захворювання.

У 2003 р. було показано [9], що аналізувати рівень експресії *psa3* можна також в клітинах, які отримують із сечі пацієнтів після масажу простати. Тобто можливе проведення молекулярної діагностики без біопсії простати. У поєднанні з широким впровадженням у клінічну практику кількісної полімеразної ланцюгової

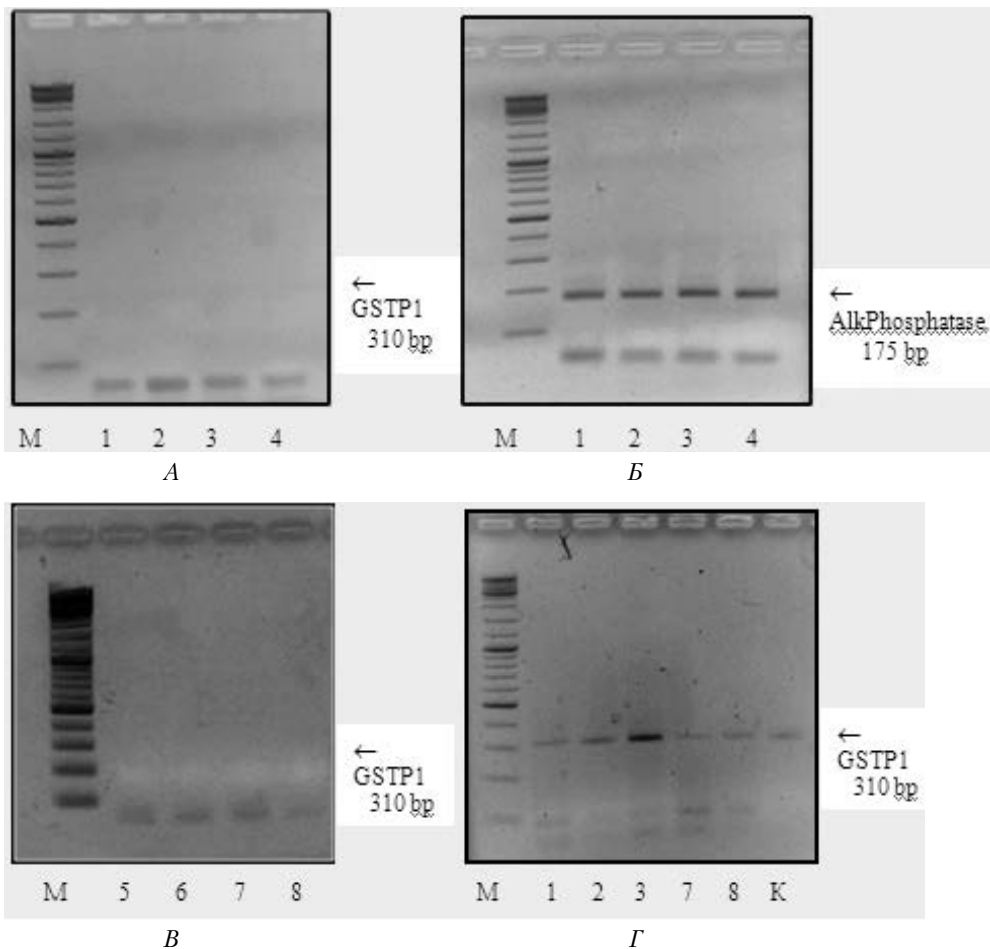


Рис. 4. Визначення промоторного метилювання гена GSTP1 у хворих на неоплазми сечостатевої системи: А – МС-ПЛР після бісульфітної обробки зразків ДНК сечі хворих на злоякісні новоутворення нирок; М – маркер молекулярної маси M-Ladder100bp (Праймер для *gstp1*); Б – МС-ПЛР після бісульфітної обробки зразків ДНК сечі хворих на злоякісні новоутворення нирок; М – маркер молекулярної маси M-Ladder100bp (праймер для лужної фосфатази); В – МС-ПЛР після бісульфітної обробки зразків ДНК сечі хворих на злоякісні новоутворення. 5 [№ 7110], 6 [№ 164] – злоякісні новоутворення нирок, 7 – злоякісне новоутворення сечового міхура [№ 6352], 8 – рак передміхурової залози (РНК виділено з нічної сечі хворого А [№ 7272]); М – маркер молекулярної маси M-Ladder100bp (праймер для *gstp1*); Г – МС-ПЛР після бісульфітної обробки зразків ДНК крові хворих на злоякісні новоутворення. 1, 2, 3 – злоякісні новоутворення нирок, 7 – злоякісне новоутворення сечового міхура, 8 – рак передміхурової залози (РНК виділено з крові хворого А); К – контроль (кров здорового донора); М – маркер молекулярної маси M-Ladder100bp (праймер для *gstp1*)

реакції це створило передумови для використання даних показників у системі діагностики. Оскільки на відміну від рівня експресії мРНК *psa3* рівень мРНК *psa* не має істотної різниці як для нормальних, так і для пухлинних клітин простати, це дозволяє проводити за його допомогою нормалізацію кількості мРНК *psa3*

при проведенні молекулярно-генетичних тестів. Ген *psa*, більш відомий як ген *klik3* (kallikrein-related peptidase 3), локалізовано на 19-й хромосомі людини (19q13.33). Описано 3 мажорних та кілька міnorних форм транскриптів даного гена, однак ділянка, яка відповідає екзонам 1–2 є консервативною для більшості

мРНК *psa*. Як зазначено вище, після сплайсингу в мРНК *pca3* представлено у послідовності 3-х екзонів (1, 3 та 4) різної протяжності. Оскільки для проведення кількісної ПЛР продукт ПЛР не повинен перевищувати 200 п.н., то було створено кілька пар праймерів для виявлення всіх можливих варіантів мРНК — дві пари оліонуклеотидних праймерів на ділянку злиття екзонів 1–3 та пару праймерів на ділянку злиття екзонів 3–4. Праймери підбирали згідно з послідовністю *Homo sapiens prostate cancer antigen 3 (non-protein coding) (PCA3) NR_015342*. Для виявлення мРНК гена *psa* було підбрано специфічні праймери до консервативної ділянки екзонів 1–2 даного гена згідно з послідовністю *Homo sapiens kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) transcript variant 1 mRNA NM_001648.2*. Основною характеристикою, якою оперують при аналізі експресії, є *pca3* score, що визначається як співвідношення рівня експресії *pca3* до *psa* в мРНК. Дотепер немає однозначної відповіді, яке значення цього показника треба обирати як порогове. У більшості випадків на сьогодні таким вважають 35, за якого ймовірність підтвердження раку поростати при біопсії складає приблизно 40 % за загальної чутливості теста в 53 % та 74 % специфічності. Зниження порогу до 20 хоча і призводить до зменшення специфічності до 72 % при ймовірності підтвердження при біопсії 35 % дозволяє знизити кількість хибно-негативних результатів. Однак при обох порогових значеннях використання *pca3* score є більш інформативним та прогностично значущим у порівнянні з аналізом рівня *psa* або відсотку вільного *psa*, які використовуються в клінічній практиці [13].

Визначення статусу метилювання промоторної ділянки гена *gstp1* хворих на злоякісні новоутворення сечостатевої системи методом метил-специфічної ПЛР

Пригнічення рівня глутатіону та антиоксидантних ферментів є одним з головних факторів розвитку раку [14]. Багатофункціональний

фермент глутатіон-S-трансфераза (*gstp1*) виконує ключову роль в процесі блокування розвитку оксидативного стресу шляхом глутатіон-SH-залежної кон'югації ксенобіотиків, мутагенів, канцерогенів та захищає клітину від дії генотоксичних чинників і апоптозу [15–17].

Зниження глутатіону є одним з ключових факторів розвитку канцерогенезу за пригнічення експресії глутатіон-S-трансфераза (*gstp1*) [18, 19]. Рак нирки — одна з найпоширеніших на сьогоднішній день онкопатологій сечостатевої системи людини разом з раком простати, при якій *gstp1* має статус характерного біомаркери [20, 21]. Ген *gstp1* є основною ізоформою глутатіон-трансферази майже у всіх типах клітин людини, за винятком гепатоцитів [17]. Проте зміни в експресії гена *gstp1* характерні для багатьох типів пухлин, причому залежно від типу пухлини спостерігається як пригнічення, так і посилення його експресії у порівнянні з нормальними клітинами [16]. Оскільки пригнічення експресії *gstp1* пов'язують з ініціацією та прогресією канцерогенезу, регуляція експресії *gstp1* є важливою для діагностики захворювання.

Ген *gstp1* має розмір близько 2,8 kb, містить 7 екзонів, розділених 6-ма інтронами. Кінцева ділянка гена *gstp1* характеризується високим вмістом нуклеотидів С+G. Так, ділянка на проміжку -100 — +300 bp відносно старту ініціації містить 72 % нуклеотидів С+G, при цьому вміст CpG-динуклеотидів досягає 9,2 %, що значно перевищує середні значення для геному людини в цілому [16]. Це вказує на наявність так званого острівця CpG у промоторній ділянці гена *gstp1*, який характеризується конститутивним гіпометилюванням CpG-динуклеотидів за фізіологічних умов.

Серед епігенетичних порушень, що супроводжують прогресію сечостатевої онкопатології (в тому числі раку нирки), аберанте ДНК-метилювання промотору гена *gstp1* займає особливе місце [18–21]. З використанням бісульфитної обробки ДНК та чутливої метил-специфічної ПЛР (MS-PCR [22], що лежить в основі аналізу промоторного метилювання ге-

нів, було проведено тестування стану аберантного метилювання промотору гена *gstp1* у хворих на рак сечостатевої системи. Для аналізу промоторного метилювання були підібрані та синтезовані метил-специфічні праймери до неметилюваної ділянки промотору гена *gstp1*, що відповідають нормальній експресії гена *gstp1*, шляхом метил-специфічної ПЛР (5'-GATTTGGGAAAG AGGGAAAGG-3' (прямий) і 5'-СТАААААСТСТАААССССАТСС-3' (зворотній) у реальному часі.

Методом метил-специфічної ПЛР у реальному часі показано (див. рис. 4) аберантне ДНК-метилювання промотору гена *gstp1* в патогенезі хворих на зразках сечі за відсутності продукту ампліфікації 310 п.н., тоді як у периферійній крові мав місце фізіологічно неметилюваний стан промотору *gstp1* гена за наявності продукту ампліфікації 310 п.н. Контролем слугував ген лужної фосфатази, що не виявляв аномального метилювання промотору, за відповідними праймерами до неметилюваного стану його промотору та наявності відповідного продукту ампліфікації 175 п.н.

Отримані нами результати мають значення насамперед для встановлення діагнозу в динаміці лікування раку нирки та простати на зразках сечі досліджуваних хворих (див. рис. 4).

ВИСНОВКИ

Сучасна діагностика непластичних захворювань сечостатевої системи має включати також і ефективні молекулярно-діагностичні протоколи, що виявляють характерні для різних нозологічних форм генетичні зміни. Дослідження та впровадження в діагностичну практику молекулярно-генетичних маркерів уrogenітальних раків та оцінка раннього метастазування істотно доповнюють діагностичний арсенал, дозволяють виявляти захворювання на доклінічній та ранній стадії, оптимізувати вибір тактики лікування та значно поліпшують якість і тривалість їхнього життя.

Протестовані нами молекулярно-біологічні підходи — визначення наявності *tmprss2/erg* пе-

ребудови методом ЗТ-ПЛР, рівня експресії генів *pca3/psa* та *sxcr4* за допомогою кількісної ПЛР, статусу метилювання промоторної ділянки гена *gstp1* за допомогою метилспецифічної ПЛР — дають можливість (особливо при їхньому поєднанні) збільшити чутливість та підвищити специфічність діагностики. Вони є неінвазивними і можуть бути використані для ранньої діагностики і моніторингу під час лікування. Наразі проводиться певна робота для оптимізації цих методик відносно неоплазм передміхурової залози, раку сечового міхура і раку нирки та впровадження в діагностичну практику в Україні.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Полищук Л.А., Стаховский А.Е., Телегеев Г.Д., Стаховский Е.А.* Современные молекулярно-генетические подходы к диагностике онко-заболеваний мочеполовой системы // Урология. — 2010. — Т. 14, № 3. — С. 68–76.
2. *Полищук Л.А., Телегеева П.Г., Стаховский А.Э. и др.* Новые специфичные молекулярные диагностические маркеры при онкоурологических заболеваниях // Лабораторная диагностика. — 2010. — № 4(54). — С. 46–51.
3. *Dubrovskaya A., Teleguev G. et al.* CXCR4 Expression in Prostate Cancer Progenitor Cells // Plos One. — 2012. — V.7(2). — e 31226.
4. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem. — 1987. — 162. — P. 156–159.
5. *Hessels D., Smit F.P., Verhaegh G.W. et al.* Detection of TMPRSS2-ERG Fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer // Clin. Cancer Res. — 2007. — V. 13. — P. 17.
6. *Cojoc M., Peitzsch C., Trautmann F. et al.* Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis // Onco Targets and Therapy. — 2013. — N 6. — P. 1347–1361.
7. *Bussemakers M.J., van Bokhoven A., Verhaegh G.W. et al.* DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer // Cancer Res. — 1999. — Dec 1. V. 59(23). — P. 5975–79.
8. *Kok J.B., de Verhaegh G.W., Roelofs R.W. et al.* DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors // Cancer Res. — 2002. — V. 62. — P. 2695–98.
9. *Hessels D., Gunnewiek J.M., van Oort I. et al.* DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer // Eur. Urol. — 2003. — V. 44(1). — P. 8–15; discussion 15–6.

10. Ploussard G.I., Haese A., van Poppel H. et al. The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU Int.* 2010 Oct; 106(8): 1143-7.
11. Day J.R., Jost M., Reynolds M.A. et al. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab // *Cancer Lett.* 2011 Feb 1;301(1):1-6.
12. Clarke R.A., Zhao Z., Guo A.Y. et al. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One.* 2009;4(3):e4995. doi: 10.1371/journal.pone.0004995. Epub 2009 Mar 25.
13. Auprich M.I., Bjartell A., Chun F.K. et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer // *Eur. Urol.* — 2011. V. 60(5). — P. 1045-54.
14. Gyoyao Wu. Glutathione metabolism and its implication for health // *J. of Nutrition.* — 2004. — V. 134(3). — P. 489-492.
15. Cao D.L., Yao X.D. Advances in biomarkers for early diagnosis of prostate cancer // *Chin. J. Cancer.* — 2010. V. 29(2). — P. 220-233.
16. Eaton D.L. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology // *Toxicological sciences.* — 2007. — V. 49. — P. 156-164.
17. Солончак А.М., Оболенська М.Ю. Структура і функції глутатіон-S-трансферази P1 // *Укр. біолог. журнал.* — 2009. — № 1. — С. 5-17.
18. Bernardini S. et al. Hypermethylation of the CpG in the promotor region of the GSTP1 gene in prostata cancer: a useful diagnostic and prognostic marker // *Clin. Chim. Acta.* — 2004. — V. 350. — P. 1-2.
19. Bastian P.J., Ellinger G., Schmidt D. et al. GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostate cancer: is there correlation with clinical stage // *Eur. J. Med. Res.* — 2004. — № 9(11). — P. 523-527.
20. Dulaimi E. et al. Promoter Hypermethylation Profile of Kidney Cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2004. № 10. — P. 3972-3979.
21. Battagli C., Uzzo R.G., Dulaimi E. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients // *Cancer Res.* — 2003. — V. 63. — P. 8695-8699.
22. Clark S. et al. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis // *Nature Protocols.* — 2006. — N 1. — P. 2353-2364.
2. Polyschuk L.A., Teleheeva P.H., Stakhovskiy A.E. y dr. Nove spetsyfychnye molekuliarnye dyahnostycheskiye markery pry onkourolohycheskykh zabolevaniyakh. *Laboratornaia dyahnostyka*, 2010, N 4(54), pp. 46-51 [in Russian].
3. Dubrovskaya A., Telegeev G. et al. CXCR4 Expression in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Plos One*, 2012, 7(2), e 31226 [in English].
4. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem*, 1987, 162, pp. 156-159 [in English].
5. Hessels D., Smit F.P., Verhaegh G.W. et al. Detection of TM PRSS2-ERGFusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin. Cancer Res*, 2007, 13, pp. 17 [in English].
6. Cojoc M., Peitzsch C., Trautmann F. et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets and Therapy*, 2013, N 6, pp. 1347-1361 [in English].
7. Bussemakers M.J., van Bokhoven A., Verhaegh G.W. et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*, 1999, Dec 1, 59(23), pp. 5975-79 [in English].
8. Kok J.B., de Verhaegh G.W., Roelofs R.W. et al. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*, 2002, 62, pp. 2695-98 [in English].
9. Hessels D., Gunnewiek J.M., van Oort I. et al. DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.*, 2003, 44(1), pp. 8-15, discussion 15-6 [in English].
10. Ploussard G.I., Haese A., van Poppel H. et al. The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU Int.*, 2010 Oct, 106(8): 1143-7 [in English].
11. Day J.R., Jost M., Reynolds M.A. et al. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Lett.*, 2011 Feb 1, 301(1): 1-6 [in English].
12. Clarke R.A., Zhao Z., Guo A.Y. et al. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One*, 2009, 4(3), e4995. doi: 10.1371/journal.pone.0004995, Epub 2009 Mar 25 [in English].
13. Auprich M.I., Bjartell A., Chun F.K. et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur. Urol.*, 2011, 60(5), pp. 1045-54 [in English].
14. Gyoyao Wu. Glutathione metabolism and its implication for health. *J. of Nutrition*, 2004, 134(3), pp. 489-492 [in English].
15. Cao D.L., Yao X.D. Advances in biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Chin. J. Cancer*, 2010, 29(2), pp. 220-233 [in English].

REFERENCES

1. Polyschuk L.A., Stakhovskiy A.E., Teleheev H.D., Stakhovskiy E.A. Sovremennye molekuliarno-henetycheskiye podkhody k dyahnostyke onko-zabolevanyj moche-polo-voj systemy. *Urolohiia*, 2010, 14, N 3, pp. 68-76 [in Russian].

16. Eaton D.L. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological sciences*, 2007, 49, pp. 156–164 [in English].
17. Solonchak A.M., Obolens'ka M.Yu. Struktura i funktsii hltutacion-S-transferazy R1. *Ukr. bioloh. Zhurnal.*, 2009, N 1, pp. 5–17 [in Ukrainian].
18. Bernardini S. et al. Hypermethylation of the CpG in the promotor region of the GSTP gene in prostata cancer: a useful diagnostic and prognostic marker. *Clin. Chim. Acta.*, 2004, 350, pp. 1–2 [in English].
19. Bastian P.J., Ellinger G., Schmidt D. et al. GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostate cancer: is there correlation with clinical stage. *Eur. J. Med. Res.*, 2004, N 9(11), pp. 523–527 [in English].
20. Dulaimi E. et al. Promoter Hypermethylation Profile of Kidney Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004, N 10, pp. 3972–3979 [in English].
21. Battagli C., Uzzo R.G., Dulaimi E. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Res.*, 2003, 63, pp. 8695–8699 [in English].
22. Clark S. et al. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nature Protocols*, 2006, N 1, pp. 2353–2364 [in English].

Г.Д. Телегеев¹, Л.А. Полищук¹,
Т.Ю. Лисецкая¹, Л.П. Швачко¹, М.В. Дыбков¹,
А.Е. Стаховский², Ю.В. Витрук², Е.А. Стаховский²

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Национальный институт рака, Киев

РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ
КОМПЛЕКСНОЙ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ НОВООБРАЗОВАНИЙ
МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

Разработана и протестирована система комплексной
неинвазивной диагностики новообразований мочепо-

лой системы на основе использования молекулярно-генетических показателей — определение наличия *tmprss2/erg* перестройки методом обратнo-транскриптазной цепной реакции (ПЦР), уровня экспрессии генов *pca3/psa* и *cxcr4* с помощью количественной ПЦР, статуса метилирования промоторной участка гена *gstp1* с помощью метил-специфической ПЦР.

Ключевые слова: диагностика, злокачественные новообразования мочеполовой системы, гены *tmprss2*, *erg*, *pca3*, *psa*, *gstp1*, *cxcr4*.

Н. Телегеев¹, Л. Полищук¹,
Т. Лисецкая¹, Л. Швачко¹, М. Дыбков¹,
О. Стаховский², И. Витрук², Е. Стаховский²

¹Institute of Molecular Biology
and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

²National Cancer Institute, Kyiv

DEVELOPMENT
AND TESTING OF COMPLEX MOLECULAR
GENETIC DIAGNOSIS
OF NEOPLASMS OF THE GENITOURINARY
SYSTEM

The comprehensive non-invasive diagnostic protocols for neoplasms of urogenital system based on the use of molecular genetic parameters such as determination of *tprss2/erg* rearrangement using reverse transcriptase chain reaction (PCR), the level of *psa3/psa* and *cxcr4* gene expression using quantitative PCR, promoter methylation status of *gstp1* gene using methyl-specific PCR was designed and tested.

Key words: diagnosis, malignant neop.

Стаття надійшла до редакції 18.08.14