

УДК 611.637-006.6-07

©Коллектив авторов

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.Е. Брызгунова, В.В. Власов, П.П. Лактионов*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,
Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8; тел.: (383)3304654, факс: (383)3333677,
эл. почта: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

В работе проанализированы аналитические возможности иммунохимических и молекулярно-генетических методов в неинвазивной диагностике рака предстательной железы и мониторинге эффективности противораковой терапии. Оценены перспективы использования этих методов в практической медицине.

Ключевые слова: рак предстательной железы, циркулирующие НК, неинвазивная диагностика рака.

ВВЕДЕНИЕ. По данным эпидемиологических исследований, рак предстательной железы (РПЖ) еще в 80-е г.г. XX столетия был довольно редким заболеванием. К середине 90-х годов в связи с увеличением продолжительности жизни и снижением смертности населения от других конкурирующих причин РПЖ во многих странах мира стал одним из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у мужчин. В последние годы прирост заболевших РПЖ в мире составляет в среднем 3% в год, что позволяет прогнозировать удвоение числа случаев заболевания РПЖ в 2030 г. [1]. По данным Б.П. Матвеева, в 2001 г. РПЖ в структуре онкоурологических заболеваний среди мужчин в РФ переместился с 7 на 4 место и составил 5,9% [2]. Из-за отсутствия ранних клинических симптомов злокачественные опухоли ПЖ распознаются, как правило, на стадии генерализации онкологического процесса, когда хирургическое вмешательство не может быть радикальным, а с помощью гормональных препаратов, цитостатиков и лучевой терапии не удастся добиться длительного лечебного эффекта [3, 4]. Это является причиной высоких показателей летальности больных РПЖ, который характеризуется непредсказуемостью клинического течения. Некоторые опухоли остаются латентными многие годы, другие быстро прогрессируют в некурабельные метастатические заболевания [5].

Современные методы локального стадирования включают пальцевое ректальное исследование, определение простатического специфического антигена (ПСА), трансректальное УЗИ, секстантную биопсию, компьютерное аксиальное сканирование и эндоректальное магнитно-резонансное исследование. Недостаточная чувствительность этих методов приводит к недооценке стадии почти в 50% случаев [5]. Таким образом, актуальной проблемой при онкологических заболеваниях ПЖ является разработка диагностических методов, обеспечивающих выявление предраковых заболеваний (облигатных и

*Адресат для переписки

факультативных) и ранних стадий развития злокачественной опухоли. Сегодня к таким методам можно отнести молекулярно-генетические и, в качестве дополнения к ним, иммунохимические.

1. Иммунохимические методы.

Генетические нарушения, имеющиеся в опухолевых клетках, приводят к изменению синтеза белков, в том числе синтезу мутантных форм, нарушениям экспрессии, появлению белков, характерных для эмбрионального периода развития. В классическом понимании онкомаркеры – это белки, которые могут быть выявлены в опухолевой ткани и крови онкологических больных. Онкомаркеры могут быть условно разделены на две группы: биохимические онкомаркеры – ферменты и субстраты, активность или содержание которых изменены при онкологических заболеваниях и иммунохимические онкомаркеры – белковые антигены, ассоциированные с развитием рака. Для выявления как биохимических, так и иммунохимических онкомаркеров могут быть использованы иммунохимические методы. Исследование концентрации онкомаркеров выполняется с помощью стандартных диагностических наборов и довольно точно характеризует нарушения функции того или иного гена. Однако чувствительность иммунохимических методов в тысячи раз меньше, чем у молекулярно-генетических методов (10^{-12} – 10^{-14} г) и, поэтому, диагностическое значение многие из них имеют уже при сформировавшейся опухоли. Как правило, онкомаркеры присутствуют в небольших количествах также в норме или при заболеваниях не онкологической природы (например, увеличение уровня ПСА при воспалительных заболеваниях ПЖ, а также при задержке мочи), что также затрудняет диагностику.

Поэтому, иммунохимическими и биохимическими маркерами можно дополнять раннюю диагностику, однако основным их применением является мониторинг заболевания, а также оценка эффективности хирургического лечения и/или радио-, химио- или гормонотерапии.

В последние годы для диагностики, прогнозирования и контроля течения РПЖ было предложено несколько онкомаркеров (определение уровня кислой и щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, креатининкиназы), однако, только определение уровня простатического специфического антигена (ПСА) нашло широкое использование в клинической практике. ПСА – фермент, который в норме продуцируется ПЖ и секретируется в семенную жидкость. ПСА обнаруживается только в тканях ПЖ и, следовательно, является тканеспецифическим маркером. В последние годы рядом фирм разработаны и внедрены в клиническую практику тест-системы для разных форм ПСА: свободной и связанной с различными ингибиторами протеаз. Содержание свободной формы составляет около 10-15% от общего количества ПСА. Уровень свободного ПСА меняется в зависимости от вида заболевания ПЖ. Выявлено, что содержание свободной фракции ПСА в сыворотке крови при РПЖ значительно ниже по сравнению с концентрацией свободного ПСА при доброкачественных заболеваниях ПЖ. Это используется для дифференциальной диагностики рака и гиперплазии ПЖ [4]. Значительное повышение уровня ПСА в сыворотке крови обнаруживают при карциноме простаты, а также при гипертрофии и при воспалительных заболеваниях простаты. Известно, что при низком значении свободной формы ПСА повышается риск заболевания РПЖ, но только у 30-50% мужчин с содержанием свободной формы ПСА менее 15% от общего ПСА этот диагноз подтвердился при проведении биопсии. Известно, что в составе свободного ПСА выявляют несколько изоформ: proПСА, benign ПСА и “инактивированная” форма ПСА [6]. Было показано, что в случае, когда уровень свободного ПСА составляет менее 15% от общего ПСА, для постановки диагноза имеет смысл определять соотношение proПСА и benign формы ПСА, поскольку уровень benign ПСА в сыворотке крови повышается при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и не изменяется при РПЖ, а концентрация proПСА достоверно возрастает при развитии злокачественных опухолей [7].

Иммунохимическое определение концентрации ПСА в плазме/сыворотке крови может быть рекомендовано для скрининговых обследований мужчин старше 50 лет. Если же исследователи хотят диагностировать РПЖ именно по данному маркеру, то для своевременной диагностики заболевания подходит молекулярно – генетический анализ с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) мРНК ПСА или ПСМА (простатический специфический мембранный антиген) клеток крови больного, среди которых уже на 1-2 -й стадии заболевания имеются единичные опухолевые клетки [8]. Другие авторы признают ПСА неидеальным маркером РПЖ из-за зависимости его экспрессии от влияния андрогенов [9, 10]. При целенаправленной андрогенной депривации диагностическая ценность ПСА сомнительна, поскольку его биосинтез значительно снижается. Отсюда понятен поиск других более специфичных белковых маркеров РПЖ, одним из которых может являться специфический мембранный белок ПЖ (ПСМА) [9]. ПСМА – это мембранный гликопротеин. При молекулярно-биологическом анализе были выявлены два варианта этого белка. Полный вариант белка, который содержит 750 аминокислотных остатков (а.о.), и укороченный (ПСМ), который полностью лишен внутриклеточного и трансмембранного доменов, а также той небольшой части внеклеточной последовательности, которая в первом варианте примыкает к плазмалемме. ПСМ не связан с клеточной мембраной и локализуется исключительно в цитоплазме. В нормальной ПЖ преимущественным вариантом является ПСМ (молекулярное отношение ПСМА/ПСМ составляет 0,075-0,45), тогда как при РПЖ преобладает ПСМА (то же отношение в образцах ткани карциномы простаты составляет 3-6). При доброкачественной гиперплазии ПЖ содержание этих форм примерно одинаково (0,75-1,6) [9]. В настоящее время эти различия пока не используются в клинико-лабораторной практике (вероятно, потому что они были обнаружены сравнительно недавно), но потенциальное их значение для дифференциальной диагностики не вызывает сомнений. Как описали Murphy с соавторами [11], содержание ПСМА в мембранной фракции простаты в десятки, а то и в тысячи раз выше, чем во всех других органах и тканях. Следует отметить, что в ткани доброкачественной гиперплазии ПЖ концентрация ПСМА в 1,5-2 раза ниже нормы, тогда как в ткани РПЖ она превышает норму в 3-7 раз, что может быть использовано для дифференциальной диагностики доброкачественной гиперплазии и рака ПЖ [9]. К сожалению, в настоящее время нет наборов для количественного ИФА анализа на ПСМА, хотя еще в 1990 году было описано получение специфичного иммуноконъюгата моноклональных антител 7E11-C5.3, меченного радиоактивным ¹¹¹In [12]. Этот препарат оказался эффективен для раннего радиоиммуноскинтиграфического выявления рецидивов и метастазов РПЖ размером от 5 мм. Его фармацевтическая форма под коммерческим названием ProstaScint в 1997 году была одобрена FDA. Было показано, что наиболее эффективно использование этого препарата для выявления метастазов в лимфоузлы, а при метастазах в костной ткани, печени и селезенке они менее информативны, чем обычное радионуклидное сканирование, компьютерная и/или магниторезонансная томография [13, 9].

Для определения концентрации ПСМА в сыворотке крови был предложен метод, основанный на использовании биочипов с иммобилизованными антителами против ПСМА, с последующей детекцией связанного с чипом ПСМА при помощи масс спектроскопии (SELDI ProteinChip immunoassay) [14, 15]. Авторы показали, что средняя концентрация сывороточного ПСМА у больных РПЖ (623,1 нг/мл) значительно отличается от таковой у больных гиперплазией (117,1 нг/мл) и здоровых доноров (50,3 нг/мл) и может быть использована для дифференциальной диагностики опухолей предстательной железы.

Как было отмечено, к опухолевым маркерам ПЖ, позволяющим осуществлять мониторинг и дополнять раннюю диагностику, относится простатическая кислая фосфатаза (ПКФ). Однако, клиническая значимость

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРОСТАТЫ

определения ПКФ невысока, поскольку на ранних стадиях антиген в сыворотке не выявляется и может быть использован только для мониторинга течения РПЖ. Поскольку концентрация ПКФ в крови здоровых доноров на 3 порядка меньше, чем концентрация ПСА, поэтому использовать этот фермент в качестве опухолевого маркера значительно сложнее [8].

Определение же других белков, например, белков острой фазы, при ранней диагностике не является показательным, т.к. их концентрация увеличивается не только при злокачественных и доброкачественных опухолях, но и при других заболеваниях (травмы, острые и хронические воспалительные процессы, ишемический инсульт, гепатит, ожоги и др.) [16].

Необходимо отметить, что после обнаружения заболевания для выбора стратегии лечения необходимо иметь маркеры, позволяющие прогнозировать течение РПЖ. К числу таких маркеров следовало бы отнести маркеры нейроэндокринной дифференцировки, которые могут помочь не только в прогнозе течения и выборе подходов к терапии РПЖ, но и в диагностике РПЖ. Вместе с базальными и секреторными клетками, нейроэндокринные клетки относятся к типу эпителиальных клеток в нормальных тканях простаты. Нейроэндокринные клетки являются клетками нейрогенного происхождения и образуются из перипростатного параганглия в раннем эмбриональном периоде развития простаты. Существует гипотеза, что нейроэндокринные клетки простаты могут принимать участие в регуляции роста и дифференциации при развитии предстательной железы, в регуляции процесса секреции в зрелом органе, а также при развитии опухоли при РПЖ [17]. Известно, что данные клетки наиболее часто продуцируют такие полипептиды как нейрон-специфическая енолаза и хромогранин А (СgА) [18]. Это свойство используется для иммуногистохимического выявления таких клеток и, кроме того, эти пептиды обнаруживаются в циркуляции. Нейроэндокринные клетки не имеют рецепторов андрогенов и, поэтому, повышение уровня этих факторов может свидетельствовать о развитии гормон-независимых опухолей. Повышенный уровень СgА в сыворотке крови указывает на дифференциацию нейроэндокринных клеток при раке простаты, поэтому определение уровня СgА используется при оценке роста и развития опухоли простаты. Коэкспрессия нейроэндокринных маркеров и маркеров простаты, таких как ПСА, была продемонстрирована на клетках карциномы простаты [19]. Также Wu с соавт. [20] показали, что приблизительно у 50% пациентов с метастазирующим раком простаты уровень СgА в сыворотке превышает ПСА; таким образом, можно говорить о том, что СgА является хорошим ранним маркером при развитии РПЖ. Что касается нейрон специфической енолазы, то известно, что ее уровень в сыворотке крови у пациентов без РПЖ значительно выше, чем у пациентов с РПЖ. Однако у пациентов с метастазирующим РПЖ ее уровень в сыворотке крови значительно выше, чем у пациентов без метастазов [18]. Можно предположить, что использование этих маркеров позволит не только ставить более точный диагноз, но и выбрать правильную тактику лечения больного.

Маркеры костного метаболизма также представляют интерес для прогнозирования течения и диагностики РПЖ, поскольку известно, что кости являются третьим преимущественным органом для формирования метастазов, следующим за легкими и печенью, а костные метастазы обнаруживаются у 60% больных РПЖ [21]. Так, Yoshida с соавт. показали, что концентрация С-концевого пропептида из проколлагена первого типа (в английской транскрипции PCP) в сыворотке крови значительно выше у пациентов с РПЖ с костными метастазами, чем у пациентов с доброкачественной гиперплазией ПЖ или пациентов с РПЖ без костных метастазов. Концентрация С-концевого пиридинолин связанного телопептида коллагена первого типа (в английской транскрипции ICTP) в сыворотке значительно выше у пациентов с РПЖ, чем у пациентов с доброкачественной гиперплазией ПЖ независимо от наличия костных метастазов [22, 23]. Говорить о

наличии костных метастазов можно и при измерении ИСТР в сочетании с щелочной фосфатазой в сыворотке крови [24]. Известно, что уровень щелочной фосфатазы повышается уже при ранних метастазах в костную ткань [24, 25]. Еще одним маркером костных метастазов при РПЖ может служить костный морфогенетический протеин 6, так как показана его экспрессия в раковых клетках простаты у пациентов, имеющих костные метастазы [26, 27]. К числу маркеров костного метаболизма относятся и остеопротегерин (в английской транскрипции OPG), рецептор активатора NFκB (в английской транскрипции RANK) и его лиганд (в английской транскрипции RANKL), которые принадлежат к белкам суперсемейства фактора некроза опухоли. Показано, что экспрессия RANKL/RANK/OPG коррелирует с развитием метастазов при РПЖ, что позволяет надеяться на использования данных маркеров в диагностике и прогнозе заболевания [28].

В настоящее время предпринимаются попытки разработать математические модели, которые позволяли бы напрямую использовать данные SELDI-TOF масс-спектропии для идентификации диагностически значимых маркеров РПЖ. Например, авторами работы [29] был разработан новый метод (Decision Forest, DF), который позволяет достоверно предсказывать РПЖ на основе SELDI-TOF MS данных, полученных после анализа образцов сывороток больных РПЖ и здоровых доноров.

Таким образом, в настоящее время описано значительное количество белковых маркеров, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики опухолей ПЖ, прогностических целей и выбора оптимальной стратегии терапии. По-видимому, бурно развивающиеся протеомные исследования позволят увеличить набор таких маркеров и выявить их комбинации, наиболее ценные с диагностической точки зрения. Однако, для широкого применения в клинике необходимы обширные рандомизованные исследования, которые действительно подтвердят диагностическую ценность новых белковых маркеров.

2. Молекулярно-генетические методы.

Определение мутантных генов и их РНК-продуктов составляет основу молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний. Молекулярно-генетические методы диагностики рака высокочувствительны (10^{15} – 10^{18} г). Известно, что биохимические симптомы опухолевого процесса начинают проявляться только после достижения опухолью массы в 1 г (10^8 - 10^9 клеток, в среднем содержание ДНК в этих клетках 0,5-5 мг соответственно) [30]. Поэтому большое значение имеет возможность выявления ракового процесса на наиболее ранней стадии, когда лечение дает наилучшие результаты. В настоящее время, только ПЦР мутантных генов в ДНК опухолевых клеток позволяют выявить опухоль в доклинической стадии. При помощи молекулярно-генетических методов можно анализировать как генетические, так и эпигенетические изменения генов. Активно ведутся поиски генов, вовлеченных в генез опухоли простаты. Кроме того, в последние десятилетия в онкологии наблюдался огромный прогресс в области изучения механизмов так называемых семейных раков. При молекулярно-генетическом анализе большого числа семей с явно наследственными вариантами заболевания было установлено сцепление РПЖ, по крайней мере, с шестью локусами разных хромосом [31]. Во многих семьях, однако, сцепления РПЖ с этими локусами обнаружено не было, что доказывает сложность генной сети рака простаты и его мультифакторный характер.

В настоящее время известно несколько генов предрасположенности к РПЖ (HPCX, PCAP, HPC20 и др.), однако наиболее перспективным для диагностики является ген HPC1, расположенный на хромосоме 1q24-25, повреждения в котором выявляются у трети семей при раннем раке простаты. Поскольку генез РПЖ зависит от уровня андрогенов, были предприняты попытки установить связь между состоянием гена рецептора андрогенов (AR) и раком простаты. Известно, что AR – ген рецептора андрогена, находящийся в X-хромосоме и характеризующийся выраженным полиморфизмом, благодаря наличию в кодирующей части гена, варьирующей по длине триплетной CAG-

последовательности. В норме число таких повторов варьирует от 8 до 31, в среднем составляя около 20. Их дальнейшее нарастание ведёт к нейродегенеративному заболеванию – болезни Кеннеди [32, 31]. Высказано предположение, что мужчины с низким числом САG-повторов в гене AR имеют потенциально более высокий риск заболеть РПЖ, чем мужчины со средним или высоким числом повторов. Анализ числа повторов с помощью ПЦР на каплях крови, высушенных на фильтровальной бумаге, открывает реальные возможности для широкомасштабного внедрения этого теста в медицинскую практику и формирования группы мужчин повышенного риска, требующей диспансерного наблюдения.

Однако при развитии РПЖ изменения происходят и в генах, не являющихся генами предрасположенности. Так Ни с соавторами показали, что на ранних стадиях развития РПЖ происходят изменения в гене, кодирующем рецептор к маннозо-6-фосфат/инсулин подобному фактору роста 2 (M6P/IGF2R). Данный ген локализован в хромосоме 6q26 и обычно при раке подвергается делеции. Продукт данного гена играет важную роль в подавлении образования опухолей. Рецептор M6P/IGF2R играет ключевую роль в регуляции накопления внеклеточных протеолитических ферментов и ростовых факторов, вовлекаемых в злокачественную трансформацию клеток. Мутации в гене M6P/IGF2R происходят на ранних стадиях развития рака. Однако необходимо отметить, что повреждение гена M6P/IGF2R происходит и при других видах онкозаболеваний, таких как рак печени, молочной железы и легкого [33]. Поэтому исследование данного гена на наличие мутаций в тканях ПЖ может быть использовано только в качестве дополнительного анализа на РПЖ.

При ранней диагностике РПЖ возможно исследование соматических изменений генов. Так потеря гетерозиготности, включающая определенные участки хромосомы 8p (8p12-21, 8p22), – это, возможно, более общий случай делеции при РПЖ. Потерям гетерозиготности некоторых генов придается большое значение при ранних случаях канцерогенеза, так как ее обнаруживают уже при интраэпителиальной неоплазии простаты, а также при ее воспалительной атрофии. Делеция участка супрессора опухоли в локусе 8p обнаруживается в 80% случаев метастазирующего РПЖ.

Ген гомеобокса NKX3.1, локализованный в участке хромосомы 8p12-22, является хорошим кандидатом на роль специфического супрессора опухолей простаты. NKX3.1 экспрессируется на всех стадиях дифференцировки простаты. При развитии интраэпителиальной гиперплазии и карциномы простаты происходит изменение экспрессии гена NKX3.1, которое коррелирует не только с развитием опухоли, но также с потерей аллеля и ограниченным метилированием промотора данного гена [34-36]. Кроме того, Abdulkadir с соавторами показали, что повреждение данного гена у мышей приводит не только к дефектам роста и секреторных функций простаты, но и влияет на развитие злокачественной трансформации на ранних стадиях заболевания [37]. Изменения в гене NKX3.1 происходят также при раке молочной железы и раке легкого [38, 39], поэтому исследование экспрессии только данного гена не может дать 100% результата о наличии онкологического заболевания именно ПЖ.

Одним из перспективных методов диагностики онкологических заболеваний ПЖ является анализ сайтов метилирования/деметилирования ДНК в опухолевых клетках, которое приводит к гипо/гиперэкспрессии генов. К преимуществам данного подхода можно отнести:

1. Большую стабильность ДНК по сравнению с РНК, используемой при анализе уровня экспрессии генов.
2. При исследовании гетерозиготности измененная ДНК выявляется в присутствии большого избытка нормальной ДНК, что требует от анализа высокой чувствительности и селективности, а выявление мутаций не обладает достаточной диагностической ценностью. Исследование сайтов метилирования промоторных областей генов позволяет преодолеть данную проблему.

На сегодняшний день известно более 30 генов, гиперметилированных при РПЖ. Эти гены могут нести ответственность за контроль клеточного цикла (APC [40], p14, p16, COX2 [41], RASSF1A [42], Cyclin D2 [43]), репарацию повреждений ДНК (MGMT [44], GSTP1 [41, 45, 46]), чувствительность клеток к гормонам (MDR1 [43]), а также за инвазию опухолевых клеток (E-cadherin [41]). При помощи количественной ПЦР, специфичной к метилированию, Woodson с соавт. исследовали метилирование генов GSTP1, RASSF1A, RAR β 2 и показали, что эти 3 гена метилированы более чем в 60% образцов опухолей ПЖ. При РПЖ метилирование промотора гена RASSF1A встречается в 54%-96% образцах опухолей [47]. По данным других авторов [48], гиперметилирование гена RAR β 2 (ген опухолевой супрессии) обнаруживается в тканях опухоли в 97,5% случаев при РПЖ. Более того, авторы утверждают, что уровень метилирования гена RAR β 2 коррелирует со стадией заболевания. Однако метилированные формы промоторов генов RASSF1A и RAR β 2 встречаются в тканях и при незлокачественных заболеваниях простаты, а также в 64% и 94,7% случаев при интраэпителиальной неоплазии соответственно [41, 47-51]. Было показано, что повышение статуса метилирования связано, также с ростом опухоли [41, 50].

Данные, полученные разными авторами, отличаются, по-видимому, в связи с использованием различных методов и протоколов.

Необходимо отметить, что у разных больных РПЖ профиль метилирования вышеописанных генов может отличаться. Это может объяснять низкую частоту выявляемости рака, так как поиск праймеров многими авторами ведется с использованием ДНК определенной клеточной культуры (например, клеточная линия LNCaP при РПЖ), а не ДНК, выделенной из тканей или биологических жидкостей больных. Известно также, что профиль метилирования гена RAR β 2 отличается и при различных видах рака, так при раке простаты и молочной железы метилирована промоторная область данного гена, а при раке легкого область первого экзона [52].

Одним из способов детекции РПЖ на ранних стадиях заболевания может быть анализ уровня транскриптов мРНК при помощи ДНК-чипов. Этот метод был использован для идентификации мРНК гена α -метилацил-КоА рацемазы (AMACR), который локализован на хромосоме 5p13. Белковый продукт гена AMACR катализирует переход R в S-стереоизомер разветвленной цепи жирных кислот, позволяющих идти метаболизму через β -окисление. Luo с соавторами показали, что в 88% случаев РПЖ происходит увеличение экспрессии мРНК AMACR по сравнению с нормальными тканями. Чувствительность анализа уровня транскриптов, с использованием ДНК-чипов составила 97%, а специфичность 100% [53].

Поскольку в моче может попадать секрет ПЖ, в котором содержатся клетки ПЖ, клетки мочи могут быть использованы в качестве материала для выявления РПЖ на ранних стадиях.

Hessels с соавторами предлагают в качестве одного из возможных молекулярно-генетических маркеров на РПЖ исследовать экспрессию гена DD3^{PCa3}. Продукты данного гена влияют на процессы опухолеобразования при РПЖ. Исследование экспрессии данного гена позволяет детектировать раковые клетки простаты среди большого числа не раковых клеток. Экспрессия DD3^{PCa3} раковыми эпителиальными клетками сильно повышается более чем у 95% первичных опухолей и в их метастазах. К тому же его экспрессия не наблюдается ни в нормальных тканях, ни в лейкоцитах, присутствующих в различных биологических жидкостях. Авторы предлагают при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени исследовать соотношение экспрессии DD3^{PCa3} к экспрессии ПСА в раковых клетках простаты в образцах мочи после массажа простаты, крови и семенной жидкости у пациентов подозрительных на РПЖ. Специфичность анализа экспрессии DD3^{PCa3} составляет 83% [54].

Botchkina с соавт. предлагает в качестве материала для диагностики РПЖ на ранних стадиях использовать раковые эпителиальные клетки ПЖ, попадающие

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРОСТАТЫ

в моче, количество которых при данном онкологическом заболевании увеличивается [55]. На первой стадии авторы предлагают отделить опухолевые клетки от общего пула эпителиальных отслаивающихся клеток путем иммуномагнитной сепарации. Затем при помощи ПЦР в реальном времени исследовать активность теломераз в опухолевых клетках мочи у больных после массажа простаты. Ведь известно, что активация теломераз происходит в 93% случаев опухолей простаты. Также известно, что теломеразная активность в нормальных тканях простаты не наблюдается. Анализ активности теломераз имеет 100% чувствительность при РПЖ, однако он дает 12% ложноположительных сигналов при доброкачественной гиперплазии простаты. Необходимо отметить, что количественный анализ теломеразной активности или экспрессии DD3^{PCAS} в моче исключает потенциальный риск, связанный с взятием образца и всегда может быть произведен повторно.

Необходимо также отметить, что различные изменения генов могут быть обнаружены не только в ДНК клеток, но также во внеклеточной ДНК крови, мочи или других биологических жидкостей. Рядом авторов было показано, что у больных с различными видами рака в составе ДНК мочи и ДНК/РНК, циркулирующей в крови, могут быть выявлены онкоспецифические последовательности [56-58]. Исходя из этих данных, можно предположить, что внеклеточная ДНК и/или РНК различных биологических жидкостей может быть использована в качестве материала для поиска онкоспецифических последовательностей и разработки методов ранней диагностики онкологических заболеваний, в том числе и рака простаты.

В качестве маркеров при анализе на наличие РПЖ в плазме крови многие исследователи анализируют гиперметилирование промоторных областей генов APC, HIC и т.д. Так, например Kang с соавт. показали, что при РПЖ с высокой частотой встречаются метилированные формы генов APC, MGMT и RASSF1A – 56,8%; 75,7% и 83,8% соответственно. Продукты гена APC участвуют в адгезии клеток, регуляции клеточного цикла. Инактивация гена APC часто является причиной мутаций ДНК, что приводит к нестабильности генома [40]. Продукт гена MGMT (O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза) является ферментом, принимающим участие в репарации ДНК [44]. RASSF1A (Ras ассоциированный домен 1-ого семейства, изоформа А) - ген опухолевой супрессии, который взаимодействует с Cdc20 [43]. Эти три гена и ген GSTP1 (кодирует фермент, играющий важную роль в детоксикации пестицидов, а также в процессах канцерогенеза) были метилированы более чем у 30% больных с интраэпителиальной неоплазией простаты. При этом в сыворотке крови наблюдался низкий уровень ПСА (≤ 8) [41].

В моче обнаруживаются те же онкоспецифические нуклеиновые кислоты, которые циркулируют в крови больных с опухолями молочной железы [59], локализованными вдали от мочевыводящих путей. В моче может попадать секрет ПЖ и клетки ПЖ; они могут служить источником свободных нуклеиновых кислот, которые могут быть использованы в качестве материала для выявления РПЖ на ранних стадиях.

Ноге с соавт. [56] показали, что в 87% образцах мочи у больных РПЖ хотя бы у одного из 4-х генов (p16, ARF, MGMT и GSTP1) промоторная область метилирована со 100% специфичностью. Белки p16, ARF – регуляторы клеточного цикла. Авторы отмечают, что наличие метилированной формы генов не зависит от возраста пациента или стадии заболевания. Однако была найдена корреляция между метилированием и степенью дифференцировки опухоли по шкале Глисона, уровнем дооперативного ПСА сыворотки и стадией заболевания [56, 50]. Необходимо отметить, что степень метилирования промоторных областей генов при онкологических заболеваниях в различных биологических жидкостях может отличаться. Так, например, анализируя метилирование промоторных областей гена GSTP1 при помощи количественного ПЦР, специфичного к метилированию,

гиперметилирование промотора наблюдалось в 31,9% образцов крови и 53,6% образцов мочи пациентов с РПЖ [60].

На сегодняшний день важнейшим молекулярно–генетическим маркером РПЖ можно считать появление гиперметилированной формы гена GSTP1, который присутствует в 91% случаев аденокарциномы, но не встречается в тканях простаты, ядерных клетках крови, плазме и сыворотке больных с доброкачественной гиперплазией, а также в норме [61, 62]. Разные исследователи обнаруживают гиперметилированную форму промоторной области гена GSTP1 не только в раковых тканях простаты, но и в различных биологических жидкостях при РПЖ. Так Gonzalgo с соавт. и Cairns с соавт. показали наличие метилированной формы гена GSTP1 в ДНК, выделенной из мочи больных РПЖ. В ряде работ было показано, что наличие гиперметилированной формы гена GSTP1 в плазме крови и/или в клеточном осадке мочи свидетельствует о том, что опухоль ПЖ является злокачественной [61, 63, 64]. Таким образом, выявление в плазме крови гиперметилированной формы GSTP1 позволяет говорить с надежностью, близкой к 100%, о присутствии злокачественной опухоли – аденокарциномы. Тем не менее, для тканеспецифической/органоспецифической онкодиагностики этот показатель, по-видимому, не может быть использован, так как гиперметилированная форма GSTP1 наблюдается в 85% случаев гепатоцеллюлярного рака и в 31% рака эндометрия [65].

Наряду с описанными методами, для исследования статуса метилирования различных генов описано использование MALDI-TOF масс-спектрометрии [66], позволяющее с высокой эффективностью и производительностью определять изменения профиля метилирования различных генов, в том числе и гена GSTP1 при РПЖ [67]. Для анализа метилирования конкретных цитозинов может быть использован метод микросеквенирования с MALDI-TOF масс-спектрометрическим определением продукта удлинения праймеров, что, в принципе, может позволить определять метилирование ключевых цитозинов в скрининговом режиме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В настоящее время необходимо отметить, что наиболее перспективным методом формирования групп риска, а также диагностики РПЖ на бессимптомной и ранних стадиях заболевания является анализ метилирования промоторных областей онкогенов в биологических жидкостях. Данный метод является неинвазивным и высокочувствительным, однако и он не идеален, поскольку существуют проблемы, связанные с выбором мишени (необходимо точно знать профиль метилирования онкогена при данном заболевании) и увеличением чувствительности и специфичности диагностических систем.

Работа поддержана Фондом содействия отечественной науке, интеграционным проектом СО РАН № 13 и следующими грантами: РФФИ 06-04-49732-а и РФФИ 06-04-49732-а, грант Российской академии наук “Фундаментальные науки – медицине”, грантом поддержки научных школ НШ-1384.2003.4 и Лаврентьевским грантом для молодых ученых СО РАН-2006 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чойнзонов Е.Л., Писарева Л.Ф., Бояркина А.П., Одинцова И.Н., Тахауов Р.М. (2004) Онкологическая заболеваемость населения Томской области, Т. 16.
2. Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В. (2003) Современная онкология, **5(3)**, 114-119
3. Русаков И.Г., Алексеев Б.Я. (2001) Современные возможности и новые направления в диагностике и лечении рака почек, мочевого пузыря и предстательной железы, Уфа, с. 91-99.
4. Чиссов В.И., Дарьялова С.Л. (2000) Избранные лекции по клинической онкологии.
5. Валиев Е.И., Петров С.Б. (2002) Вопросы онкологии, **48(4)**, 551-555.

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРОСТАТЫ

6. *Slawin K., Shariat S., Canto E.* (2005) *Rev. Urology*, **7**, 52-56.
7. *Khan M., Sokoll L., Chan D., Mangold L., Mohr P., Mikolajczyk S., Linton H., Evans C., Rittenhouse H., Partin A.* (2004) *Urology*, **64**, 1160-1164.
8. *Белохвостов А.С., Румянцев А.Г.* (2003) *Онкомаркеры*, М
9. *Чехонин В.П., Григорьев М.Э., Жирков Ю.А., Лебедев Д.В.* (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 31-43.
10. *Beckett M.L., Cazares L.H., Vlahou A., Schellhammer P., Wright G.* (1999) *Clin. Cancer Res.*, **5**, 4034-4040.
11. *Murphy G.P., Su S., Jarisch J., Kenny G.M.* (2000) *Prostate*, **42**, 318-319.
12. *Lopes A., Davis W., Rosenstraus M., Uvages A., Gilman S.* (1990) *Cancer Res.*, **50**, 6423-6429.
13. *Gregorakis A., Holmes E., Murphy G.* (1998) *Seminars Urol. Oncol.*, **16**, 2-12.
14. *Srinivas P., Verma M., Zhao Y., Srivastava S.* (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1160-1169.
15. *Xiao Z., Adam B., Cazares L., Clements M., Davis J., Schellhammer P., Dalmasso E., Wright G.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 6029-6033.
16. *Данилова Л.А.* (2003) *Справочник по лабораторным методам исследования*, П.
17. *Shariff A., Ather H.* (2006) *Urology*, **68**, 2-8.
18. *Kamiya N., Akakura K., Suzuki H., Isshiki S., Komiya A., Ueda T., Ito H.* (2003) *European Urology*, **44**, 309-314.
19. *Sciarra A., Cardi A., Dattilo C., Mariotti G., Monaco D.I., Di Silverio F.* (2005) *Int. J. Clin. Pract.*, **60**, 462-470.
20. *Wu J., Astill M., Liu G.* (1998) *J. Clin. Lab. Anal.*, **12**, 20-28.
21. *Yoneda T.* (1998) *Eur. J. Cancer*, **34**, 240-245.
22. *Yoshida K., Sumi S., Arai K., Koda F., Umeda H., Hosoya Y., Honda M., Yano M., Moriguchi H., Kitahara S.* (1997) *Cancer*, **80**, 1760-1767.
23. *Noguchi M., Yahara J., Noda S.* (2003) *Urology*, **61**, 993-998.
24. *Tamada T., Sone T., Tomomitsu T., Jo Y., Tanaka H., Fukunaga M.* (2001) *J. Bone Miner. Metab.*, **19**, 45-51.
25. *Brown M., Singh A.* (2006) *Clin. Genitourin. Cancer*, **4**, 293-295.
26. *Hamdy F., Autzen P., Robinson M., Horne C., Neal D., Robson C.* (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4427-4431.
27. *Thomas B., Hamdy F.* (2000) *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **3**, 283-285.
28. *Chen G., Sircar K., Aprikian A., Potti A., Goltzman D., Rabbani S.* (2006) *Cancer*, **107**, 289-298.
29. *Tong W., Xie Q., Hong H., Fang H., Shi L., Perkins R., Petrikoin E.* (2004) *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1622-1627.
30. *Лухтенштейн А.В., Потапова Г.И.* (2003) *Молекулярная биология*, №2, 181-193.
31. *Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* (2000) *Геном человека и гены "Предрасположенности"*, С-П.
32. *Ross R.K., Pike M.C., Coetzee G.A., Reichardt J., Yu M., Feigelson H., Stanczyk F., Kolonel N., Henderson B.* (1998) *Cancer Res.*, **58**, 4497-4504.
33. *Hu C.K., McCall S., Madden J., Huang H., Clough R., Jirtle R.L., Anscher M.S.* (2006) *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **9**, 62-67.
34. *Gonzalgo M.L., Isaacs W.B.* (2003) *J. Urol.*, **170**, 2444-2452.
35. *Asatiani E., Huang W., Wang A., Ortner E., Cavalli L., Haddad B., Gelmann E.* (2005) *Cancer Res.*, **65**, 1164-1173.
36. *Shand R.L., Gelmann E.D.* (2006) *Curr. Opin. Urol.*, **16**, 123-131.
37. *Abdulkadir S.A., Magee J.A., Peters T.J., Kaleem Z., Naughton C., Humphrey P., Milbrandt J.* (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1495-1503.
38. *Bott S.R.J., Arya M., Shergill I.S., Williamson M.* (2005) *Surg. Oncol.*, **14**, 91-104.
39. *Хансон К.П., Имянитов Е.Н.* (2001) *Практическая онкология*, **2**, 3-7.
40. *Deng G., Song G.A., Pong E., Slesinger M., Kim Y.S.* (2004) *Cancer Res.*, **64**, 2692-2698
41. *Kang G.H., Lee S., Lee H.J., Hwang K.S.* (2004) *J. Pathol.*, **202**, 233-240.

42. *Jeronimo C., Henrique R., Hoque M., Mambo E., Ribeiro F., Varzim G., Oliveira J., Teixeira M., Lopes C., Sidransky D.* (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8472-8478.
43. *Bastian P.J., Ellinger J., Wellmann A., Wernert N., Heukamp L., Muller S., Ruecker A.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 4097-4106.
44. *Esteller M., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., Capella G., Peinado M.A., Watkins D.N., Issa J.P., Sidransky D., Baylin S.B., Herman J.G.* (2000) *Cancer Res.*, **60**, 2368-2371.
45. *Esteller M., Herman J.G.* (2004) *Oncogene*, **23**, 1-8.
46. *Montironi R., Mazzucchelli R., Stramazzotti D., Pomante R., Thompson D., Bartels P.H.* (2000) *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, **53**, 122-128.
47. *Woodson K., Hanson J., Tangrea J.* (2004) *Cancer Lett.*, **205**, 181-188.
48. *Jeronimo C., Henrique R., Hoque M.O., Ribeiro F., Oliveira J., Fonseca D., Teixeira M., Lopes C., Sidransky D.* (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 4010-4014.
49. *Li L.Ch., Carroll P.R., Dahiya R.* (2005) *J. Natl. Cancer Inst.*, **97**(2), 103-115.
50. *Maruyama R., Toyooka S., Toyooka K.O., Virmani A.K., Zochbauer-Muller S., Farinas A.J., Minna J.D., McConnell J., Frenkel E.P., Gazdar A.F.* (2002) *Clin. Cancer Res.*, **8**, 514-519.
51. *Yegnasubramanian S., Kowalski J., Gonzalgo M.L., Zahurak M., Piantadosi S., Walsh P.C., Bova G.S., De Marzo A.M., Isaacs W.B., Nelson W.G.* (2004) *Cancer Res.*, **64**, 1975-1986.
52. *Virmani A.K., Rathi A., Zochbauer-Muller S., Sacchi N., Fukuyama Y., Bryant D., Maitra A., Heda S., Fong K.M., Thunnissen F., Minna J.D., Gazdar A.F.* (2000) *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 1303-1307.
53. *Luo J., Zha S., Gage W., Dunn T., Hicks J., Bennett C., Ewing C., Platz E., Ferdinandusse S., Wanders R., Trent J., Isaacs W., Marzo A.* (2002) *Cancer Res.*, **62**, 2220-2226.
54. *Hessels D., Klein Gunnewiek J.M.T., van Oort I., Karthaus H.F., van Leenders G.J., van Balken B., Kiemeny L.A., Witjes J.A., Schalken J.A.* (2003) *Eur. Urol.*, **44**, 8-16.
55. *Botchkina G.I., Kim R.H., Botchkina I.L., Kirshenbaum A., Frischer Z., Adler H.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3243-3249.
56. *Hoque M., Topaloglu O., Begum S., Henrique R., Rosenbaum E., Van Criekinge W., Westra W.H., Sidransky D.* (2005) *J. Clin. Oncol.*, **23**, 6569-6575.
57. *Esteller M., Sanchez-Cespedes M., Rosell R., Sidransky D., Baylin S.B., Herman J.G.* (1999) *Cancer Res.*, **59**, 67-70.
58. *Menke T.B., Warnecke J.M.* (2004) *Ann. NY Acad. Sci.*, **1022**, 185-189.
59. *Bryzgunova O., Skvortsova T., Kolesnikova E., Starikov A., Rykova E., Vlassov V., Laktionov P.* (2006) *Ann. NY Acad. Sci.*, **1075**, 334-340.
60. *Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., Silva C., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D.* (2002) *Urology*, **60**, 1131-1135.
61. *Белохвостов А., Бартновский А., Вдовиченко К., Лухин Ф., Абрамов А., Маркова С.* (2002) *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*, **1**, 78-79.
62. *Goessl C., Muller M., Miller K.* (2000) *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **3**, S17.
63. *Gonzalgo M.L., Pavlovich Ch.P., Lee S.M., Nelson W.G.* (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 2673-2677.
64. *Cairns P., Esteller M., Herman J.G., Schoenberg M., Jeronimo C., Sanchez-Cespedes M., Chow N., Grasso M., Wu L., Westra W., Sidransky D.* (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2727-2730.
65. *Chan Q., Khoo U., Chan K., Ngan H., Li S., Chiu P., Man L., Ip P., Xue W., Cheung A.* (2005) *J. Mol. Diagn.*, **7**, 8-16.
66. *Ragoussis J., Elvidge G., Kaur K., Colella S.* (2006) *PLoS Genetics*, **2**, 0920-0929.
67. *Tost J., Schatz P., Schuster M., Berlin K., Gut I.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, e50.

Поступила: 25. 09. 2006.

MODERN METHODS OF PROSTATE CANCER DIAGNOSTICS

O.E. Bryzgunova, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Lavrentiev prosp., 8, Novosibirsk, 630090 Russia, tel.: (383)3304654, fax: (383)3333677; e-mail: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

The review highlights analytics capacities of immunochemical and molecular-genetic methods used in the non-invasive test for prostate cancer and monitoring of efficacy of anticancer therapy. The perspectives of their applications in clinical practice also have been evaluated.

Key words: prostate cancer, circulating NA, non-invasive cancer diagnostics.