

ОБЗОР

УДК 616.577.08

© Коллектив авторов

ПРОСТАТИЧЕСКИЙ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ МЕМБРАННЫЙ АНТИГЕН И ЕГО РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

В.П. Чехонин¹, М.Э. Григорьев², Ю.А. Жирков¹, Д.В. Лебедев².

¹Лаборатория иммунохимии ГНЦССП им. В.П. Сербского.

²Кафедра урологии РГМУ

Статья посвящена роли простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) в ранней диагностике рака простаты. Несмотря на постоянно расширяющуюся практику применения ПСМА в диагностике рака простаты, большинство клиницистов рассматривают его как вспомогательное средство.

Метод использования ПСМА является весьма перспективным, но не достаточно утвердившимся из-за недостатков, таких как качественный характер получаемых данных и большое число ложно положительных результатов (вследствие очень высокой чувствительности). Дальнейшее изучение и применение ПСМА может способствовать в ранней диагностике рака предстательной железы.

Ключевые слова: рак предстательной железы, диагностика, простатический специфический антиген, простатический специфический мембранный антиген.

Рак предстательной железы (РПЖ) - одно из наиболее частых онкологических заболеваний у мужчин. В США он занимает второе место по частоте летальных исходов среди онкологических заболеваний и занимает общее четвертое место среди всех причин смерти мужчин [1 - 6]. Считают, что при локализованном РПЖ 88% больных могут прожить более пяти лет, но метастазирование снижает эту величину втрое (до 29% [7]). Частота рецидивов после радикальной простатэктомии составляет около 12% [5]. В то же время, при ранней диагностике и адекватной терапии прогноз обычно бывает весьма благоприятным [8]. Этим определяется то повышенное внимание к использованию современных специфических маркеров заболевания, которое характерно для последнего десятилетия.

Эффективность такого подхода может быть проиллюстрирована тем фактом, что после 1988 года, когда в США по рекомендации Американского онкологического общества и Американской урологической ассоциации была принята программа массового скрининга мужчин старше 50 лет с использованием одного из сывороточных маркеров, ранняя диагностика РПЖ возросла. Например, в 1996 г. ожидалось 317 тысяч случаев первичной диагностики при 41 тысяче летальных исходов [9,10].

Молекулярно-биологической и биохимической основой для такого скрининга до последнего времени является простатический специфический антиген (ПСА). На сегодня ПСА считается одним из наиболее ценных маркеров опухолей предстательной железы, широко применяемым для диагностики, прогнозирования и контроля за течением РПЖ. В то же время, ПСА признается неидеальным маркером РПЖ [11] из-за зависимости его экспрессии от влияния андрогенов. При целенаправленной андрогенной депривации диагностическая ценность ПСА сомнительна, поскольку его биосинтез значительно снижается (по этой же причине ПСА не является маркером гормонально-независимых клонов опухолевых клеток). Отсюда понятны поиски других (возможно более специфичных) белковых маркеров РПЖ, одним из которых является обнаруженный в 1987 г. [12] специфический мембранный белок предстательной железы - ПСМА (PSMA - Prostate-Specific Membrane Antigen).

ПСМА представляет собой мембранный гликопротеин с кажущейся молекулярной массой полипептидного компонента около 84 кДа (на углеводные компоненты приходится примерно 20% общего состава зрелого белка). В зависимости от условий электрофоретического анализа и от природы исходного материала он проявляется в интервале 100 до 120 кДа. Большие значения ПСМА характерны для тканевых экстрактов, меньшие - для культивируемых клеток карциномы простаты линии LNCaP [13]. Его первичная структура полностью расшифрована и включает 750 аминокислотных остатков (а.о.), образующих единственную полипептидную цепь. Анализ углеводной части ПСМА выявил 10 потенциальных сайтов N-гликозилирования (с сиалированием комплексного типа без полилактозаминных структур) и пока точно не определенное (но явно небольшое) количество сайтов O-гликозилирования [14,15].

Установлена локализация гена ПСМА на короткой ветви хромосомы 11, определена его полная нуклеотидная последовательность и проведено клонирование его кДНК [15 - 17]. При этом первичное иммунопреципитирование нативного белка проводилось с моноклональными антителами 7E11-C5.3. Выделенный белок подвергался ограниченному протеолизу, полученные пептиды секвенировали и по полученным результатам синтезировали олигонуклеотидные праймеры для полимеразных цепных реакций (PCR) с кДНК клеток LNCaP в качестве матрицы. Продукты PCR, содержавшие кодирующие последовательности для нескольких пептидных фрагментов ПСМА, использовали для выделения полной кДНК этого белка (размером 2,65 тыс. нуклеотидов).

Кроме того, было установлено, что ген ПСМА локализуется в той области 11-й хромосомы (11p11.1-14 и 11q14), экспрессируемые продукты которой (в частности, ген KA11) ассоциируются со способностью к подавлению метастазирования клеток РПЖ. В связи с этим было высказано предположение о наличии таких же свойств и у ПСМА. Эта гипотеза нашла подтверждение в экспериментах по трансфекции полной кДНК этого белка

ПРОСТАТИЧЕСКИЙ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ МЕМБРАННЫЙ АНТИГЕН И ЕГО РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ
РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

в клетки РС-3 линии с последующим их ортотипическим имплантированием в предстательные железы самцов бестимусных мышей. В результате этой процедуры наблюдалось снижение частоты метастазирования и сокращение размеров самих метастазов [5].

Общее строение ПСМА позволяет отнести его к известной группе трансмембранных гликопротеинов типа II. В его молекуле выделяются три структурные домена: короткая N-концевая внутриклеточная часть (19 а.о.), гидрофобный трансмембранный участок (24 а.о.) и экстрацеллюлярный C-концевой домен из 707 а.о. (Рисунок 1). Характерно, что один из фрагментов кодирующей последовательности его мРНК (участок 1250-1700) на 54% гомологичен соответствующей области мРНК трансферринового рецептора, который также относится к интегральным мембранным белкам этого типа. Предполагается, что выше указанная гомологичность может быть как-то связанной с известным стимулирующим действием трансферрина на

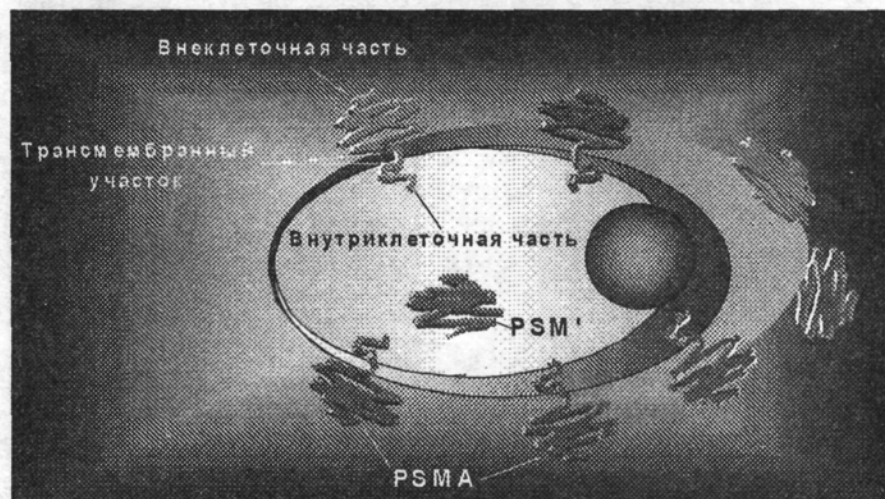


Рисунок 1.

Специфический мембранный антиген простаты (ПСМА) и его усеченная форма, образующаяся при альтернативном сплайсинге (ПСМ').

пролиферацию культивируемых клеток карциномы простаты [18 - 20].

При молекулярно-биологическом анализе были выявлены два варианта этого белка. Полный вариант белка, который содержит 750 а.о., и укороченный, который полностью лишен внутриклеточного и трансмембранного доменов, а также той небольшой части экстрацеллюлярной последовательности, которая в первом варианте примыкает к плазмалемме. Второй вариант обозначается ПСМ. Он совершенно не связан с клеточной мембраной и локализуется исключительно в цитоплазме (рис. 1).

В нормальной предстательной железе преимущественным вариантом является ПСМ' (молекулярное отношение $PSMA/PSM'$ равняется 0,075-0,45), тогда как при РПЖ преобладает ПСМА (в частности, в культивируемых клетках LNCaP то же отношение составляет 9-11, а в образцах ткани карциномы простаты-3-6). В ДГП содержание этих форм примерно одинаково (0,75-1,6) [5, 22]. По-видимому, эти особенности тканевой специфичности определяются разным соотношением эпителиальных и стромальных элементов в соответствующих тканях. В настоящее время эти различия пока не используются в клинико-лабораторной практике

(вероятно, потому что они были обнаружены только сравнительно недавно), но потенциальное их значение для дифференциальной диагностики не вызывает сомнений.

Первоначальная характеристика ПСМА была выполнена с использованием моноклональных антител 7E11, эпитопом для которых являлись первые шесть аминокислотных остатков N-концевого внутриклеточного домена этого белка. Такой характер специфичности этих антител ограничивал их эффективность, поскольку в естественном состоянии этот эпитоп неэкспонирован, вследствие чего он остается недоступным для антител, поступающих извне. Тем не менее, с помощью этих антител, ПСМА был иммуногистохимически выявлен в плазматических мембранах клеток практически на всех исследованных срезах ткани предстательной железы (нормальный эпителий, ДГП, интраэпителиальная неоплазия и карцинома [3, 5, 6, 12, 23 - 28]). В последующем, использование более чувствительных способов детектирования ПСМА, с применением других клонов антител специфичных к экстрацеллюлярным эпитопам (в том числе и к конформационным [29]), этот белок был выявлен иммуногистохимически и определен количественно во многих органах и тканях. В основном, для этой цели были использованы методы иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа, иммуноблоттинга с фотометрическим сканированием и с помощью анализа его мРНК-транскриптов, выполненного в условиях блокирования РНКаз (Таблица).

Таблица 1. Содержание ПСМА в тканях человека [25].

Нормальная ткань простаты		Концентрация ПСМА	
		нг/мл	Нг/мг белка
Нормальная ткань простаты	Мембранная фракция	10492	1029
	Цитозоль	138	18
ДГП	Мембранная фракция	4701	611
	Цитозоль	267	30
РПЖ	Мембранная фракция	69789	3561
	Цитозоль	718	64
Нормальная ткань молочной железы	Мембранная фракция	79	21
	Цитозоль	1,1	0,4
Рак молочной железы	Мембранная фракция	884	43
	Цитозоль	23,5	2
Тонкий кишечник		4,6	1
Толстый кишечник	Мембранная фракция	71,3	8,3
	Цитозоль	2,3	0,4
Почки	Мембранная фракция	31,5	1,8
	Цитозоль	0,7	0,1
Яичники	Мембранная фракция	244	51
	Цитозоль	21,3	3,3
Печень	Мембранная фракция	64,3	2,7
	Цитозоль	1,9	0,1
Костная ткань	Мембранная фракция	21,7	2,6
	Цитозоль	0,9	0,3
Кожа	Мембранная фракция	17	8,1
	Цитозоль	2,3	0,4

Из данных таблицы видно, что содержание ПСМА в мембранной фракции простаты на несколько порядков выше, чем во всех других исследованных органах и тканях. Следует отметить, что в ткани ДГП его

концентрация ниже нормы в 1,5-2 раза, но в ткани РПЖ она превышает норму в 3-7 раз. Этот факт является исключительно важным для дифференциальной диагностики ДГП и РПЖ.

Весьма существенным отличием ПСМА от ПСА является то, что для первого характерна обратная зависимость степени экспрессии мРНК и биосинтеза белка от уровня андрогенов, в то время как у ПСА отмечается противоположный эффект. Как в клеточных культурах *in vitro*, так и в образцах тканей, полученных от больных гормоно-рефрактерным РПЖ, максимальные концентрации ПСМА регистрировались при полной андрогенной депривации (применяемой в терапевтических целях в случаях гормонально-зависимых опухолей), а также в опухолевых клонах, рефрактерных к андрогенам [23, 30,31]. В частности, в культуре клеток LNCaP введение тестостерона или 5 α -дигидротестостерона селективно снижало биосинтез белка ПСМА в 2-3 и 8-10 раз соответственно (характерно, что кортикостероиды такого эффекта не вызывали).

В связи с этим предполагается, что гормоно-рефрактерные опухоли предстательной железы могут развиваться вследствие того, что под влиянием специфических факторов роста доминируют именно те аутокринные митогенные механизмы, которые способны тем или иным образом преодолевать ограничения роста, характерные для нормальных паракринных механизмов. Обоснованием этого предположения являются результаты исследований влияния различных цитокинов и факторов роста на экспрессию ПСМА [32,33]. Было показано, что фактор роста фибробластов (bFGF) и α -трансформирующий фактор роста (TGF- α) в 10 раз, а эпидермальный фактор роста (EGF) в 6 раз стимулируют синтез ПСМА, причем эта стимуляция может блокироваться моноклональными антителами, специфичными к рецептору EGF. Напротив, TNF- α (тромбоцитарный нейротрофический фактор, токсичный для клеток LNCaP, с которыми проводились эти эксперименты) на 92% ингибировал экспрессию ПСМА в переживающих клонах этих клеток, лишенных андрогенов. Полагают, что эти явления свидетельствуют о возможности переключения клеток простаты с паракринного пути на замкнутый круг аутокринных механизмов. С другой стороны, чувствительность ПСМА к стимуляции гормонами и факторами роста может оказаться полезной для повышения эффективности диагностических и терапевтических процедур, основанных на определении этого белка или на его использовании в качестве маркера, мишени или активного агента [3].

У ПСМА обнаружена ферментативная активность фолаттидролазы [34] (точнее, фоллил-поли- γ -глутаматкарбоксипептидазы), он катализирует последовательное отщепление концевых остатков глутаминовой кислоты от поли- γ -глутаматных конъюгатов фолиевой кислоты. В этом энзимологическом аспекте данный белок предстательной железы сходен с кишечной формой соответствующего фермента (по профилям pH-зависимостей, кинетическим параметрам, специфическим ингибиторам и т.п.). Это сходство подтверждается и на уровне нуклеотидных последовательностей. В частности, высокая степень гомологичности обнаружена между ПСМА и фолаттидролазой тонкого кишечника свиньи [35]. Так же есть данные о невысоком, но все же заметном содержании ПСМА в кишечнике человека. (таблица).

С наличием этой активности связывают некоторые планы ее фармакологического использования по принципу активации проформы цитотоксического агента *in situ* - для расщепления триглутаматного

конъюгата метотрексата [36]. Олиго- γ -глутаматные конъюгаты этого антагониста фолиевой кислоты не могут проникать через клеточные мембраны и поэтому не являются цитотоксичными. Однако при непосредственном контакте с клетками РПЖ (или с клетками неоваскулярного эпителия в опухолях других типов см. ниже) эти конъюгаты эффективно расщепляются под действием фолаттидролазной активности ПСМА, после чего освобожденный метотрексат легко проникает в такие клетки и убивает их. Эти данные получены пока только в экспериментальных условиях и реальная клиническая перспектива такого фармакологического подхода пока не определена. Основным препятствием здесь является экспрессия ПСМА на плазматических мембранах не только опухолевых клеток, но и в нормальных тканях (хотя и в гораздо меньших количествах), где даже минимальное цитотоксическое действие метотрексата совсем не желательно.

Практически, одновременно с обнаружением фолаттидролазной активности ПСМА у этого белка было выявлено сходство еще с одним ферментом - нейрокарбоксидипептидазой. В 1996 г. Carter с соавт. [37] идентифицировали длинный фрагмент кДНК, клонированный из библиотеки кДНК мозга крысы, который кодирует аминокислотную последовательность мозговой пептидазы N-ацетилированных дипептидов, соединенных α -связями (так называемой NAALADазы или нейрокарбоксидипептидазы). При этом выяснилось, что кДНК этого фермента на 86% гомологична кодирующему участку человеческого гена ПСМА. Физиологической функцией этой нейроспецифической карбоксидипептидазы является расщепление одного из нейропептидов (N-ацетиласпартилглутамата). В формально-энзимологическом отношении она вполне аналогична описанной выше фолаттидролазе, поскольку катализирует весьма похожую реакцию отщепления остатка глутамата, только присоединенного α -связью, а не по γ -карбоксильной группе.

Последующий анализ клеток LNCaP позволил обнаружить в них высокий уровень ферментативной активности NAALADазы, а трансфекция соответствующей крысиной кДНК в клетки, исходно негативные по этому ферменту, приводила к восстановлению его экспрессии и в этих клетках (одновременно с появлением в них же иммунохимически детектируемого ПСМА). На основании этих данных делается вывод о том, что возможной биохимической функцией ПСМА является именно обеспечение α - или γ -карбоксидипептидазной активности в эпителиальных клетках предстательной железы. Однако нельзя исключить и того, что дальнейшее исследование этого весьма интересного белка откроет и многие другие его функции, неизвестные в настоящее время.

Существенной особенностью ПСМА является его недавно обнаруженная экспрессия в неоваскулярных эпителиальных клетках злокачественных образований самой различной природы (вне предстательной железы). В частности, этот антиген иммуногистохимически выявлен в сосудистом эпителии рака почки (неспецифического типа), карцином толстого кишечника, клеток переходного слоя мочевого пузыря, легких, печени, молочной железы, поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы и еще в 23 других опухолевых тканях [3, 39,40]. В тоже время, следует подчеркнуть, что экспрессия ПСМА обнаружена именно в неоваскулярном эпителии, но не выявлена в сосудистом эпителии нормальных тканей или доброкачественных образований, а также в раковых клетках

неэпителиальной природы (кроме ткани РПЖ, где этот антиген определяется в клетках практически всех типов - за исключением как раз неоваскулярного эпителия [26, 39, 41]). Это открытие самых последних лет предоставляет новые возможности использования ПСМА как более универсального онкологического маркера и потенциального антиангиогенного терапевтического антигена-мишени. Поэтому дальнейшее исследование регуляторных факторов, определяющих экспрессию ПСМА в неоваскулярном эпителии, может оказаться исключительно важным и для выяснения фундаментальных механизмов неоангиогенеза.

Причины отсутствия иммуногистохимической реактивности ПСМА в сосулистом эпителии РПЖ остаются неясными. Можно предположить, что они связаны с тем, что предстательная железа в отличие от солидных злокачественных опухолей иных типов не обладает выраженными классическими ангиогенными характеристиками и не проявляет четкой стромальной десмопластической реакции. Это отсутствие ангиогенного ответа (возможно, в сочетании с пока неизвестными другими факторами, специфичными для этой железы) может являться причиной подавления экспрессии ПСМА.

В 1990 г. Lopes с соавт. [24] впервые описали синтез препарата CYT-356, сайт-специфичного иммуноконъюгата моноклональных антител 7E11-C5.3. Этот препарат, меченый радиоактивным ^{111}In , оказался эффективным 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.

Обычно показанием к проведению такого исследования является пре- или постоперационное повышение сывороточного уровня ПСА. Клинические испытания показали достаточную иммунологическую безопасность этого препарата при его диагностической чувствительности и специфичности, составляющих 60-80 и 70-90% соответственно [24, 42 - 47]. Наиболее эффективны исследования с препаратом ProstaScint при метастазах в лимфоузлы; однако при метастазах в костной ткани, печени и селезенке они менее информативны, чем обычное радионуклидное сканирование, компьютерная и/или магниторезонансная томография [6].

Даже относительно недолгий опыт иммуноскинтиграфического использования этого препарата продемонстрировал, что он обладает статистически достоверной положительной прогностической значимостью (большей, чем у использовавшихся до сих пор прогностических номограмм и алгоритмов). В частности, сочетание одного из таких алгоритмов со сканированием с препаратом ProstaScint позволило достигнуть 72% величины положительной прогностической значимости [47]. Предполагают, что по мере дальнейшего накопления опыта эти цифры будут возрастать, поскольку некоторая часть тех результатов, которые пока еще считаются ложно-положительными, перестанут быть таковыми (вследствие проявления клинических признаков заболевания, остававшихся латентными в момент проведения сканирования) [3].

В 1999 г. появилось сообщение о том, что с помощью иммуноскинтиграфии с радиоиммуноконъюгатом ProstaScint была обнаружена солидная опухоль почки с очагом некроза [48]. Этот факт может служить дополнительным доказательством экспрессии ПСМА в неоваскулярном эпителии опухолей, отличных от РПЖ (что было установлено ранее с помощью только иммуногистологического анализа на срезах). Он также подтверждает потенциал этого белка как более

универсального онкологического маркера. Не вызывает сомнения, что этот потенциал будет еще более эффективно реализован после приготовления радиоиммуноконъюгатов с препаратами нового поколения моноклональных антител, специфичных к экстрацеллюлярным эпитопам ПСМА.

Однако, несмотря на постоянно расширяющуюся практику применения этого метода, большинство клиницистов пока рассматривает его лишь как вспомогательное средство и только немногие используют его в качестве единственного или основного критерия при принятии конкретных решений о тактике терапии.

Параллельно с внедрением в клиническую практику уже разработанных методов ведутся интенсивные фундаментальные и прикладные исследования по их дальнейшему совершенствованию, а также по созданию принципиально новых средств и не только диагностических (например, терапевтических иммуноконъюгатов направленного действия с использованием ПСМА в качестве антигена-мишени с иттрием-90 или с иммунотоксинами). Считают, что особенно полезным было бы применение таких препаратов для воздействия на опухоли, нечувствительные к андрогенам, поскольку клоны таких клеток продолжают экспрессировать ПСМА [3,6].

Принципиально новые терапевтические подходы, основанные на иммунологическом использовании ПСМА, описаны в работах [49, 50]. Известно, что развитие иммунного ответа начинается с сенсибилизации хелперных и цитотоксических субпопуляций Т-лимфоцитов посредством специфических взаимодействий с клетками, презентирующими антиген. Эти взаимодействия включают специфическое связывание поверхностных гликопротеинов Т-клеток (т.е. Т-клеточных рецепторов) с антигенным пептидом, ассоциированным с определенным белком главного комплекса гистосовместимости на презентирующих клетках. Наиболее эффективными презентирующими клетками в настоящее время считаются дендритные клетки. Тjoа с соавт. удалось выделить эти клетки из периферической крови пациентов с РПЖ и успешно клонировать их *in vitro* [50]. При этом проводилось их специфическое активирование соответствующими фрагментами человеческого ПСМА, после чего они снова вводились тем же пациентам. Проведенные ограниченные испытания этой аутологической иммунотерапии доказали ее перспективность. В экспериментах *in vitro* наблюдался иммуноцитотоксический лизис культуры клеток РПЖ; положительный эффект отмечался и при клинических испытаниях: у 9 из 33 пациентов сывороточный уровень ПСА снижался более чем на 50%. Исследования в этом направлении продолжаются.

Несколько иной аутоиммунотерапевтический подход разработан Gong с соавт. [49]. Эти исследователи создали генетически измененный Т-клеточный рецептор с искусственной специфичностью к клеткам, экспрессирующим ПСМА. Этот измененный рецептор затем был введен в одноцепочечную молекулу антитела к тому же ПСМА и такая молекулярная конструкция соединялась с ζ -цепью домена, транслирующего иммунный сигнал. В этом случае также наблюдался лизис клеток РПЖ, содержащих ПСМА. Кроме того, в условиях *in vivo* в присутствии антигена (в составе соответствующих клеток либо в виде изолированного ПСМА или его пептидных фрагментов) происходила эффективная пролиферация модифицированных Т-лимфоцитов, усиливаемая дополнительной

стимуляцией. В настоящее время проводятся клинические испытания данного метода.

Общей особенностью двух последних подходов является их аутологичность, т.е. использование собственного клеточного и антигенного материала больного. После соответствующих манипуляций *ex corpore* этот материал возвращается в тот же организм, из которого он был первоначально извлечен. Это практически полностью исключает риск нежелательных иммунных реакций, которые неизбежны при применении даже самых прогрессивных гетерологических продуктов (например, "гуманизированных" химерных моноклональных антител, получаемых генно-инженерным путем).

В первой публикации о ПСМА [2] сообщалось о том, что он был обнаружен в крови больных РПЖ. С целью количественного мониторинга определения ПСМА в биологических жидкостях используют различные методы. Иммуноферментный анализ (различные варианты ELISA). Метод иммуноблоттинга, заключающийся в электрофоретическом разделении белковых компонентов в образце биожидкости с последующим проявлением путем переноса электрофоретической картины на мембрану, пропитанную раствором специфических антител, а также иммунофлюоресцентный анализ. В одной из опубликованных работ [27] описан сэндвич-вариант иммунофлюоресцентного теста с двойными моноклональными антителами, содержащими соединение европия в качестве флюоресцентной метки (чувствительность этого теста - 80 пг/мл.) Диагностическая ценность количественного определения ПСМА заключается в том, что в случаях гормонорефрактерного РПЖ уровень ПСМА повышен, в то время как сывороточная концентрация ПСА находится в пределах "серой зоны" [53].

Однако следует отметить, что по проблеме клинической значимости определения ПСМА в сыворотке крови в последние два года развернулась довольно острая полемика, не завершившаяся до сих пор. В частности, было показано, что сывороточный уровень ПСМА существенно повышается с возрастом, особенно у мужчин старше 50 лет, у которых не было отмечено какой-либо патологии в предстательной железе [11]. В тоже время, авторы не обнаружили статистически значимой разницы между уровнями антигена при различных стадиях РПЖ и соответствующей "возрастной нормы"; они также отрицают наличие каких бы то ни было диагностических или прогностических преимуществ сывороточного ПСМА по сравнению с ПСА (за исключением случаев гормональной рефрактерности или целенаправленной андрогенной депривации). Более того, аналогичное повышение уровней ПСМА может наблюдаться при простатите и других патологических состояниях, не связанных с предстательной железой. Так, уровень ПСМА был обнаружен у здоровых женщин старше 50 лет и у пациенток с раком молочной железы. Поэтому авторы данной работы утверждают, что сывороточный ПСМА не является специфическим биомаркером РПЖ, так как к повышению его сывороточного уровня могут приводить различные неспецифические факторы.

В опровержение этих утверждений в публикациях Murphy с сотр. [25] приводятся многочисленные собственные результаты и данные других исследователей, подтверждающие их точку зрения, а выводы оппонентов объясняются несовершенством применяемых ими методик. Вышеизложенное свидетельствует в пользу того, что необходима

дальнейшая работа по тщательной верификации и стандартизации методологии сывороточных тестов на ПСМА.

Сывороточные концентрации белковых маркеров предстательной железы недостаточно информативны в отношении степени метастатической агрессивности РПЖ. В этой связи в последние годы предпринимаются попытки использования принципиально иного метода детектирования клеток РПЖ, отделившихся от основной солидной опухоли и распространяющихся в системном кровотоке с возможной последующей диссеминацией в виде метастазов. Таким молекулярно-биологическим методом является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (обозначается аббревиатурой английского названия - RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) [54].

Обычно при помощи RT-PCR выявляют мРНК определяемого белка. При этом сначала из анализируемого образца (в случае ПСА и ПСМА - это моноядерные клетки периферической крови) экстрагируется суммарная РНК, по которой затем синтезируют комплементарную ДНК с использованием фермента обратной транскриптазы (RT). В дальнейшем, с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) проводится специфическая амплификация кДНК для определяемого белка (на автоматических аппаратах-амплификаторах с использованием термостабильной ДНК-полимеразы *Taq* из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*). Накопленное количество амплифицированной ДНК обычно детектируется электрофоретически.

Высокая специфичность по отношению к определяемому белку обеспечивается использованием в качестве праймеров, затравок для синтеза второй нити кДНК по имеющейся первой нити, синтезированной на стадии RT, небольших цепочек олигонуклеотидов, соответствующих какому-либо специфичному участку в нуклеотидной последовательности гена определяемого белка. Естественно, что проведение этого анализа возможно только для белков с полностью известной нуклеотидной последовательностью их генов. Чувствительность этого метода исключительно высока (возможно детектирование одной клетки, содержащей РНК для ПСМА среди 1-1000 млн. других моноядерных клеток, что соответствует 1-2 искомым клеткам в 5-8 мл периферической крови.)

Однако при таком уровне чувствительности иногда приходится сталкиваться с ограничениями уже не процедурно-методического, а статистико-вероятностного характера с так называемым эффектом Монте Карло [55], который может являться причиной значительного количества ложноотрицательных результатов. Например, если предположить, что в организме имеется 2000 раковых клеток, отделившихся от основной опухоли и равномерно распределенных во всем объеме крови, то это будет в среднем соответствовать всего лишь двум таким клеткам в аликвоте объемом 5-8 мл. Однако при таких малых количествах реальное число раковых клеток в каждой отдельно взятой аликвоте крови указанного объема определяется уже биномиальным распределением их количества около среднего значения. В этой ситуации примерно 40% таких аликвот будут содержать меньше двух раковых клеток (т.е. только одну или совсем ни одной). И, если порог чувствительности применяемого метода детектирования позволяет определить не менее двух клеток в аликвоте, то очевидно, что именно в 40% случаев результаты анализа будут ложноотрицательными. Подобные ситуации встречаются и в реальной

практике. В частности, в работе Ellis с соавт. [56] было установлено, что в одной и той же группе пациентов с клинически локализованным РПЖ общее количество положительных результатов при серийных анализах периферической крови с RT-PCR достоверно увеличивается, если рассматривается общий массив результатов всех повторных определений, но оно не меняется, если каждая группа результатов рассматривается по отдельности, т.е. отчетливо проявляется эффект Монте Карло.

RT-PCR впервые была использована Moreno с соавт. [57] для выявления циркулирующих опухолевых клеток у пациентов с метастазирующим РПЖ. Они использовали праймеры, приготовленные на основе нуклеотидной последовательности кДНК для ПСА, и, таким образом, смогли обнаружить циркулирующие опухолевые клетки примерно у одной трети обследованных больных. В работе [58] был использован более чувствительный "гнездовой" вариант RT-PCR и на одной и той же группе пациентов проведено сравнение результатов, получаемых с праймерами для ПСА и ПСМА (соответственно 7 и 48 RT-PCR-положительных случаев из 77 обследованных). Другим исследователям не удалось подтвердить эти результаты. Так, в опубликованной обзорной работе, в которой отражен опыт применения RT-PCR, накопленный по 1997 год включительно, отмечается, что тест для определения клеток с РНК для ПСМА в среднем несколько более чувствителен, чем аналогичный тест с РНК для ПСА (63 и 50% соответственно). Однако ни один из них не дает результатов, достаточно адекватных для обоснования тактики терапии [59]. Обобщенные данные по результатам RT-PCR на ПСМА для больных с локализованным РПЖ не коррелируют ни со стадией развития заболевания, ни с такими общепринятыми прогностическими индикаторами как суммарная оценка по Глисон или сывороточный ПСА. Это может объясняться тем, что RT-PCR обнаруживает не только раковые клетки, но и вполне доброкачественные, по той или иной причине (массаж предстательной железы или пальцевое ректальное исследование), отделившиеся от нормальной ткани железы и попавшие в кровоток. В тоже время, другая работа, опубликованная почти одновременно с обзором [59], содержит результаты об использовании комбинированной оценки RT-PCR на ПСА и ПСМА, которые свидетельствуют о том, что такая комбинация удовлетворительно коррелировала со стадийностью заболевания. Авторы этой работы утверждают, что их комбинированный тест лучше прогнозирует экстракапсулярное распространение опухоли, чем предоперационный уровень сывороточного ПСА или оценка по шкале Глисона [60].

Таким образом, метод RT-PCR, хотя и является весьма перспективным, пока еще не может быть признан достаточно утвердившимся из-за его недостатков в виде качественного характера результатов и большого числа ложноположительных заключений вследствие чрезвычайно высокой чувствительности. Преодоление этих фактов позволит RT-PCR прочно утвердиться среди клинико-лабораторных тестов, способствующих раннему выявлению метастазирования при РПЖ.

1. *Armbruster D.A.* (1993), *Clin. Chem.*, **39**, 181-195.
2. *Brauer M.K., Benson M. C., Bostwick D.G., et al.* (1999), *Seminars Urol. Oncol.*, **17** (4), 206-221.
3. *Chang S.S., Gaudin P.B., Reuter V.E., Heston W.D.W.* (2000), *Urology*, **55**, 622-629.
4. *Daher R., Beaini.* (1998), *Clin. Chem. Lab. Med.*, **36** (9), 671-681.
5. *Fair W.R., Israeli R.S., Heston W.D.W.* (1997), *Prostate*, **32**, 140-148.
6. *Gregorakis A.K., Holmes E.H., Murphy G.P.* (1998), *Seminars Urol. Oncol.*, **16** (1), 2-12.
7. *Coffey D.S.* (1993), *Cancer Suppl.*, **71**, 880-886.
8. *Epstein J.I., Carmichael V.J., Pizov G., Walsh P.C.* (1993), *J. Urol.*, **150**, 135.
9. *Littrup P.J.* (1997), *Cancer.*, **80**, 1864-1870.
10. *Wingo P.A., Tong T., Bolden D.* (1995), *Cancer statistics*, *CA Cancer J. Clin.*, **45**, 8-30.
11. *Beckett M.L., Cazares L.H., Vlahou A., et al.* (1999), *Clin. Cancer Res.*, **5**, 4034-4040.
12. *Horoszewicz J.S., Kawinski E., Murphy G.P.* (1985), *Anticancer Res.*, **7**, 927-936.
13. *Troyer J.K., Beckett M.L., Wright G.L.* (1995), *Jr. Int. J. Cancer.*, **62**, 552.
14. *Holmes E.H., Greene T.G., Tino W.T., et al.* (1996), *Prostate.*, **7** (Suppl.), 25-29.
15. *Israeli R.S., Powell C.T., Fair W.R., et al.* (1993), *Cancer Res.*, **53**, 227-230.
16. *Leek J., Lench N., Maraj B., et al.* (1995), *Br. J. Cancer.*, **72**, 583-588.
17. *O'Keefe D.S., Su S.L., Bacich D.J., et al.* (1998), *Biochim. Biophys. Acta.*, **1443**, 113-127.
18. *Keer W.P., Koslowski J.M., Tsai Y.C., et al.* (1990), *J. Urol.*, **143**, 381-385.
19. *Parks G.D., Lamb R.A.* (1991), **64**, 777-787.
20. *Rossi M.C., Zeller B.R.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 6197-6201.
21. *Grauer L.S., Lawler K.D., Marignac J.L., et al.* (1998), *Cancer Res.*, **58**, 4787-4789.
22. *Su S.L., Huang I.P., Fair W.R., et al.* (1995), *Cancer Res.*, **55**, 1441-1443.
23. *Israeli R.S., Powell C.T., Corr J.G., et al.* (1994), *Cancer Res.*, **54**, 1807-1811.
24. *Lopes A.D., Davis W.L., Rosenstraus M.J., et al.* (1990), *Cancer Res.*, **50**, 6423-6429.
25. *Murphy G.P., Kenny G.M.* (2000), *Prostate*, **42**, 318-319.
26. *Silver D.A., Pellicer I., Fair W.R., et al.* (1997), *Clin Cancer Res.*, **3**, 81-85.
27. *Sokoloff R.L., Norton K.C., Gastor C.L., et al.* (2000), *Prostate.*, **43**, 150-157.
28. *Wright G.L., Haley C., Beckett M.L., et al.* (1995), *Urol. Oncol.*, **1**, 18-28.
29. *Tino W.T., Huber M.J., Lake T.S., et al.* (2000), *Hybridoma*, **19** (3), 249-257.
30. *Kawakami M., Nakayama J.* (1997), *Cancer Res.*, **57**, 2321-2324.
31. *Wright G.L., Jr., Grob B.M., Haley C., et al.* (1996), *Urology*, **48**, 326-334.
32. *Diamond S.M., Fair W.R., Wise G.J., Heston W.D.W.* (1995), *J. Urol.*, **153**, 382A.
33. *Montgomery B.T., Young C.Y.F., Bilbartz D.C., et al.* (1992), *Prostate*, **21**, 63-73.
34. *Pinto J.T., Suffoletto B.P., Berzin T.M., et al.* (1996), *Clin. Cancer Res.*, **2**, 1445-1451.
35. *Halsted C.H., Ling E.H., Luthi-Carter R., et al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**, 20417-20424.
36. *Heston W.D.W.* *Urology*, **49** (Suppl. 3A), 104-112.
37. *Carter R.E., Feldman A.R., Coyle J.T.* (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 749-753.
38. *Chang S.S., O'Keefe D.S., Bacich D.J., et al.* (1999), *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2674-2681.
39. *Chang S.S., Reuter V.E., Heston W.D.W., et al.* (1999), *Cancer Res.*, **59**, 3192-3198.

40. *Liu H., Moy P., Kim S., et al.* (1997), **57**, 3629-3634.
41. *Bostwick D.G., Pacelli A. Blute M., et al.* (1998), *Cancer*, **82**, 2256-2261.
42. *Babaian R.J., Sayer J., Podoloff D.A., et al.* (1994), *J. Urol*, **152**, 1952-1955.
43. *Chengazi V.U., Feneley M.R., Ellison D., et al.* (1997), *J. Nucl. Med.*, **38**, 675-682.
44. *Elgamal A.A., Troychak M.J., Murphy G.P.* (1998), *Prostate*, **37**, 261-269.
45. *Levesque P.E., Nieh P.T., Zinman L.N., et al.* (1998), *Urology*, **51**, 978-984.
46. *Murphy G.P., Maguire R.T., Rogers B., et al.* (1997), *Prostate*, **33**, 281-285.
47. *Polascik T.J., Manyak M.J., Haseman M.K., et al.* (1999), *Cancer*, **85**, 1586-1592.
48. *Michaels E.K., Blend M., Quintana J.C.* (1999), *J. Urol*, **161**, 597-598.
49. *Gong M.C., Latouch J.B., Krause A., et al.* (1999), *Neoplasia*, **1**, 123-127.
50. *Tjoa B.A., Erickson S.J., Barren R., et al.* (1995), *Prostate*, **27**, 63-69.
51. *Tjoa B.A., Erickson S.J., Bowes V.A., et al.* (1997), *Prostate*, **32**, 272-278.
52. *Tjoa B.A., Simmons S.J., Bowes V.A., et al.* (1998), *Prostate*, **36**, 39-44.
53. *Murphy G.P., Kenny G.M., Ragde H., et al.* (1998), *Urology*, **51**, 89-97.
54. *Corey E., Corey M.J.* (1995), *Int. J. Cancer*, **77**, 655-673.
55. *Karrer E.E., Lincoln J.E., Hogenbout S., Bennett A.B., et al.* (1995), *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **92**, 3814-3818.
56. *Ellis W.J., Vessella R.L., Corey E., Arfman E.W., et al.* (1998), *J. Urol*, **159**, 1134-1138.
57. *Moreno J.G., Croce C.M., Fischer R., et al.* (1992), *Cancer Res.*, **52**, 6110-6112.
58. *Israeli R.S., Miller W.H., Jr., Su S.L., et al.* (1994), *Cancer Res.*, **54**, 6306-6310.
59. *Murphy G.P., Elgamal A.A., Su S.L., et al.* (1998), *Cancer*, **83**, 2259-2269.
60. *Grasso YZ., Gupta M.K., Levin H., et al.* (1998), *Cancer Res.*, **58**, 1456-1459.

Поступила

THE ROLE OF PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGENE IN THE DIAGNOSTIC OF PROSTATE CANCER.

V.P.Chebonin¹, M.E. Grigoriev², U.A. Jerkov¹, D.V. Lebedev¹

¹Serbsky National Research Center for Social & Forensic Psychiatry
23 Kropotkinsky Per., Moscow, Russia.

²Urological Clinic of Russian State Medical University, Leninskiy Pr.10/12 Moscow, Russia.

This paper reviews recent achievements of the employment of prostate specific membrane antigen in the diagnostics of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, diagnostics, prostate specific antigen, prostate specific membrane antigen.