

# Панель молекулярных маркеров для скрининга рака предстательной железы

*О.И. Аполихин, С.Е. Северин, А.В. Сивков, М.В. Савватеева, Н.Г. Кешишев, О.В. Шкабко, А.А. Раевская*

*НИИ урологии Минздравсоцразвития РФ, Московский НИИ медицинской экологии департамента здравоохранения, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*

## **Molecular Markers Panel for Prostate Cancer Screening**

*O.I. Apolikhin, S.E. Severin, A.V. Sivlov, M.V. Savvateeva, N.G. Keshishev, O.V. Shkabko, A.A. Raevskaya*

At present time the challenge of prostate cancer early detection becomes more and more vital due to prostate cancer (PCa) is one of the most common malignant tumors in males. Development and clinical introduction of programs of prostate cancer early detection is not only about a medical concern but about social and economic meaning for government. After introduction 20 years ago PSA test gave a start to early prostate cancer detection era, increased rate of localized curable cancer detection. This article reveals efficiency and specificity of test-system for early diagnostics and control of prostate cancer. This system consist of molecular markers DNA-marker, GST  $\pi$ 1, RAR $\beta$ 2, RASSF1A. The study was conducted on a biological material obtained from 157 men whose average age was  $67,6 \pm 7,7$  years, PSA ranged from 4 to 10 ng/ml. Was formed 4 groups of patients: a group of patients with chronic prostatitis (30 patients), a group of patients with benign prostatic hyperplasia (55 patients), a group of patients with Pca (50 patients) and a group of conventionally healthy donors without identified pathology of prostate (22 person). Selected markers have sufficient high sensibility and specificity. Development of test-system based on selected molecular markers for diagnostics and control of prostate diseases potentially can survival rate and quality of life of a big group of population able to work. Effective research of such molecular genetic markers is possible only in terms of using of modern high informative methods of large-scale screening of genetic/genomic and epigenetic/epigenomic abnormalities in malignant tumors specimens.

**Р**ак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний у мужчин. РПЖ широко распространен в России и характеризуется высокими темпами роста заболеваемости и показателями смертности [1].

В России в структуре онкозаболеваемости РПЖ занимает 4 место, составляя 9,7%, а по величине среднегодового темпа роста – 1 место (8,9% в 2008 г.). В структуре онкологической заболеваемости в 2008 г. доля злокачественных новообразований предстательной железы составляла 9,7% [2].

Если в 2002 г. на учете в онкологических учреждениях России состояло 44 411 больных РПЖ, в 2004 г. – 54 756, то в 2008 г. – уже 85 215 больных. В 2008 г. вновь было выявлено 20 887 случаев заболевания, что почти в 1,5 раза превысило данные 2002 г. [3, 4].

В настоящее время в нашей стране еще не произошло ожидаемого перелома в состоянии оказания медицинской помощи больным РПЖ. Кумулятивный риск умереть от РПЖ составил в 2008 г. 1,23. Смертность от РПЖ, как и заболеваемость, связана с возрастом. У лиц 70-74 лет смертность от РПЖ составляет 8,4%, у мужчин 75-79 лет – 10,8%.

Несложные расчеты позволяют предположить, что сегодня в России наблюдается более 50 000 мужчин с распространенным и/или метастатическим РПЖ, лечение которых требует больших медицинских ресурсов и экономических затрат. Поэтому разработка и внедрение в клиническую практику программ ранней диагностики РПЖ является не только важной медицинской, но большой социальной и экономической задачей государственного значения.

С момента внедрения 20 лет назад, тест на простатспецифический антиген (PSA) положил начало ранней диагностике рака предстательной железы, повысив частоту его обнаружения на ранних, курбельных стадиях [5, 6, 7]. Тем не менее, тесты для раннего определения рака простаты все еще остаются предметом дискуссий.

До недавнего времени считалось, что проблему точной диагностики РПЖ решает определение PSA, однако в настоящее время существуют убедительные данные о его недостаточной диагностической значимости [8]. В настоящее время роль PSA в снижении смертности от РПЖ в результате раннего обнаружения заболевания широко обсуждается в урологических кругах. По этому поводу не существует единого мнения [9, ■

10]. Так, например, были получены противоречивые результаты двух проспективных рандомизированных исследований ERSPC и PLCO, в которых было показано, что существует потенциальный риск гипердиагностики клинически незначимого рака, а его гиперлечение приводит к развитию осложнений, требующих большего внимания и затрат. Это приводит к дискуссии о пользе раннего определения рака и доводов против скрининга. По этим причинам, в некоторых странах, в частности, в Канаде, при скрининге уже отказались от использования диагностического теста на PSA [11]. Также, в связи с относительно низкой специфичностью и чувствительностью теста PSA [12] особую сложность представляет проведение биопсий и, особенно, повторных биопсий при уровне PSA в «серой зоне» (4-10 нг/мл). В декабре 2008 г. Американская ассоциация урологов обновила рекомендации по практическому применению PSA, что впервые было представлено на конгрессе AUA в апреле и опубликовано в Journal of Urology в ноябре (Guidelines AUA, 2009).

В то же время, отсутствие лечения при наличии заболевания ведет к увеличению агрессивности опухоли и, как следствие, повышению смертности от РПЖ. Таким образом, актуальным становится поиск новых маркеров РПЖ и разработка на их основе тест-систем ранней диагностики. Как следствие, за рубежом осуществляются поиски новых маркеров для данного вида заболевания, таких как p2PSA, генотип CYP3A4, Ki67 LI, Bcl-2, p53, syndecan-1, CD10, циркулирующие опухолевые клетки (CTCs), цитокератин, СК 8, СК 18, СК 19, человеческий эпителиальный антиген, молекулы адгезии к эпителиальным клеткам [EpCAM], PSMA, PSA/RT-PCR, PSCA, PCA3, EPCA, AMACR.

Сегодня выявлено более 90 раз-

личных генов и их продуктов, потенциально вовлеченных в развитие рака предстательной железы и способных в той или иной степени считаться маркерами данного заболевания [10, 12, 13, 15, 16, 18]. Изменения ткани предстательной железы в процессе малигнизации затрагивают все основные клеточные функции и находят отражение на различных уровнях клеточных структур и процессов, таких как цитоморфологические изменения, изменения в уровне экспрессии генов и их продуктов, эпигенетические изменения и другие.

При злокачественных заболеваниях предстательной железы одним из наиболее значимых событий на молекулярном уровне является эпигенетические изменения генетического материала, в частности, изменение статуса метилирования ДНК [13-22]. Установлено, что опухольспецифическое гиперметилирование 5'-регуляторных областей ряда генов, приводящее к их инактивации, можно использовать для диагностики разных патологических состояний ткани предстательной железы [23, 24]. Одним из наиболее широко описанных проявлений эпигенетических аномалий в опухолевых клетках (в том числе, предстательной железы) является изменение профиля метилирования промоторной области гена GSTπ1 (Glutathione-S-Transferase π1, вовлеченной в регуляцию апоптоза и утилизацию ксенобиотиков). Помимо гена GSTπ1, при малигнизации ткани предстательной железы значительные изменения в статусе метилирования 5'-регуляторных областей наблюдаются также среди генов, продукты которых участвуют в подавлении опухолевого роста [25-34]. Метилирование CpG-островков (CGI) в промоторных областях таких генов приводит к их инактивации, что связано с повышением риска возникновения злокачественных заболеваний. Из

большого количества инактивируемых при РПЖ супрессоров опухолевого роста нами был выбран ген RARβ2 (Retinoic Acid Receptor β2, гормоночувствительный, вовлеченный в рецептор-опосредованную супрессию опухолевого роста).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были определены границы промоторных областей выбранных генов и выявлены GC-богатые участки, а также предложены пары праймеров для амплификации метилированной и неметилированной последовательностей данных генов, которые могут быть использованы для детекции данных маркеров методом метил-специфической ПЦР.

Таким образом, с целью разработки и создания тест-системы для диагностики и контроля течения заболевания предстательной железы нами были выбраны следующие молекулярные маркеры:

- ДНК-маркер – гиперметилирования CpG-островков в промоторных областях ряда генов;
- GST π1, маркер присутствующий в гормонорезистентных и гормоночувствительных опухолях;
- RARβ2, находящийся под контролем андрогенов;
- RASSF1A.

Известно, что указанные маркеры могут быть определены в образцах ткани предстательной железы, полученных в результате биопсии. Вместе с тем, встречаются данные о возможности детекции данных маркеров в биоматериале, полученном путем неинвазивного вмешательства (в моче). Кроме того, в литературных источниках отсутствуют сведения об определении этих маркеров в других биологических жидкостях, в частности, в крови.

Стоит отметить, что выбранные маркеры отличаются достаточно высокой чувствительностью

**Таблица 1. Клинические характеристики диагностической системы маркеров РПЖ, вычисленные по выборке образцов ДНК, выделенных из ткани предстательной железы и мочи, полученной после процедуры пальцевого ректального исследования**

Маркер	Чувствительность		Специфичность		+PV		-PV		Диагностическая точность	
	Биопат	Моча	Биопат	Моча	Биопат	Моча	Биопат	Моча	Биопат	Моча
Метилирование промоторной области гена GSTл1	85,1%	81,9%	69,7%	36,8%	85,1%	90,4%	30,3%	78,1%	98,2%	96,3%
Метилирование промоторной области гена RARβ2	85,9%	64,2%	75,0%	40,0%	85,9%	88,0%	25,0%	86,0%	94,0%	91,7%
Метилирование промоторной области гена RASSF1A	87,9%	71,3%	85,3%	57,1%	92,1%	88,5%	21,6%	69,8%	96,6%	92,8%
Суммарно	86,3%	72,5%	76,7%	44,6%	87,7%	89,0%	25,6%	78,0%	96,3%	93,6%

**Таблица 2. Клинические характеристики диагностической системы маркеров РПЖ, вычисленные по выборке образцов ДНК, выделенных из цельной крови и лимфоцитов периферической крови пациентов с различными заболеваниями предстательной железы**

Маркер	Чувствительность		Специфичность		+PV		-PV		Диагностическая точность	
	Кровь	Лимфоциты	Кровь	Лимфоциты	Кровь	Лимфоциты	Кровь	Лимфоциты	Кровь	Лимфоциты
Метилирование промоторной области гена GSTл1	61,2%	64,9%	60,9%	61,5%	90,1%	89,5%	78,8%	74,2%	88,2%	91,9%
Метилирование промоторной области гена RARβ2	61,6%	62,6%	38,1%	57,7%	87,6%	88,2%	84,6%	76,6%	86,0%	84,6%
Метилирование промоторной области гена RASSF1A	72,6%	70,6%	57,6%	65,8%	86,5%	86,6%	64,2%	58,3%	82,3%	85,8%
Суммарно	67,1%	66,0%	52,2%	61,7%	88,1%	88,1%	75,9%	69,7%	85,5%	87,4%

и специфичностью. Мы считаем, что анализ различных комбинаций данных маркеров приведет к созданию тест-системы с оптимальными параметрами. Более того, такая тест-система с высокой степенью вероятности позволит проводить раннюю диагностику наличия заболеваний предстательной железы.

Исследование проводилось на материале, полученном от 157 мужчин, средний возраст которых составил  $67,6 \pm 7,7$  лет, а уровень PSA варьировал от 4 до 10 нг/мл.

На основе верифицированных диагнозов были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) группа больных хроническим простатитом (30 пациентов);
- 2) группа больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы разной степени (55 пациентов);
- 3) группа больных аденокарциномой предстательной железы разной степени дифференцировки (50 пациентов);
- 4) группа условно-здоровых доноров без выявленных заболеваний предстательной железы (22

человека).

Для сравнения параметров получаемого генетического материала и эффективности проведения амплификации, а также в целях экономической целесообразности исследования были выбраны следующие типы биологического материала: кровь, моча, собираемая после проведения процедуры пальцевого ректального исследования (ПРИ) предстательной железы, ткань предстательной железы, полученная при биопсии. Из данных видов биоматериала были выделены ДНК, и сформирован банк образцов для дальнейшего анализа выбранных молекулярных маркеров. Для диагностики маркеров в качестве основного метода выбрана полимеразная цепная реакция.

Одним из подходов к количественной оценке диагностической способности методики является статистический подход – определение ее чувствительности и специфичности, где чувствительность определяется как доля положительных результатов в группе больных пациентов, а специфичность – как доля отрицательных

результатов в группе здоровых доноров. Таким образом, метод с высокой чувствительностью часто дает положительный результат при наличии заболевания (обнаруживает его), однако является наиболее информативным при получении отрицательного результата (редко допускает ложноотрицательные результаты). Напротив, высокоспецифичный тест редко допускает ложноположительный результат и является наиболее информативным при положительном результате, подтверждая (предположенный) диагноз.

Также оценивалась прогностическая ценность положительного теста, или положительная прогностическая ценность – доля истинно положительных результатов среди всех положительных (positive predictive value, +PV), предсказательная ценность отрицательного теста, или отрицательная прогностическая ценность – доля истинно отрицательных ответов среди всех отрицательных (negative predictive value, -PV).

При расчете диагностических параметров разрабатываемой системы маркеров использовали

**Таблица 3. Сравнительные характеристики некоторых методов диагностики аденокарциномы предстательной железы [Sardana G. et al, 2008; Tricoli J.V. et al, 2004, НИИ Урологии, Институт Биохимии, 2011 г.]**

	Чувствительность	Специфичность	+PV	-PV
ПСА	98%	5%	40%	83%
DD3/PCAZ	58%	76%	67%	87%
EPСА	92%	72%	–	–
AMACR	62%	72%	–	–
Статус метилирования промоторных областей генов GSTπ1, RARβ2, RASSF1A, ткань железы	86,3%	76,7%	87,7%	25,6%
Статус метилирования промоторных областей генов GSTπ1, RARβ2, RASSF1A, моча после ПРИ	72,5%	44,6%	89,0%	78,0%
Статус метилирования промоторных областей генов GSTπ1, RARβ2, RASSF1A, цельная кровь	67,1%	52,2%	88,1%	75,9%
Статус метилирования промоторных областей генов GSTπ1, RARβ2, RASSF1A, лимфоциты	66,0%	61,7%	88,1%	69,7%

условные обозначения, определения и формулы стандартной четырехпольной таблицы Р. Флетчера [35].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно приведенному выше алгоритму вычисления основных клинических характеристик диагностической системы, указанные параметры были рассчитаны как для каждого маркера в отдельности, так и для системы маркеров в совокупности. В приведенных ниже таблицах отражены значения чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности и отрицательной прогностической ценности исследуемых ДНК-маркеров с учетом типа биологического материала, из которого была выделена ДНК для проведения анализа.

При анализе характеристик диагностической системы маркеров РПЖ, вычисленных на выборке образцов ДНК, выделенных из ткани простаты, чувствительность составила 86,3%, специфичность – 76,7%, а из мочи чувствительность метода составила 72,5% и 44,6% соответственно.

При анализе характеристик диагностической системы, вычисленных на выборке образцов ДНК, выделенных из крови, чувстви-

тельность составила 67,1%, специфичность – 52,2%, а из лимфоцитов – 66% и 61,7% соответственно.

Таким образом, наиболее эффективное выделение геномной ДНК возможно из образцов ткани предстательной железы, цельной крови больных и лимфоцитов, в то время, как выделение ДНК из клеток, обнаруживаемых в образцах мочи, является значительно менее эффективным.

При сравнении рассчитанных диагностических параметров разрабатываемой системы маркеров с таковыми параметрами других диагностических маркеров можно полагать, что совокупная прогностическая ценность выбранных молекулярных маркеров превосходит таковую для PSA. Специфичность нашего диагностического метода превышает специфичность PSA. Таким образом, сочетание данных маркеров в клинической практике будет способствовать более точной постановке диагноза.

## ВЫВОДЫ

- При сравнении диагностических характеристик маркеров GST π1, RARβ2 и RASSF1A с PSA, специфичность нашей диагностической системы превосходит PSA (61,7% против 5%,  $p < 0,05$ ).

- Наиболее эффективное вы-

деление геномной ДНК возможно из образцов ткани предстательной железы, цельной крови и лимфоцитов.

- Сочетанное применение данных маркеров в клинической практике будет способствовать более точной постановке диагноза.

Разработка тест-системы на основе выбранных молекулярных маркеров для диагностики и лечения заболеваний предстательной железы потенциально способна повысить продолжительность и качество жизни широкой группы работоспособного населения. Разработка системы ДНК-маркеров заболеваний предстательной железы позволит в будущем эффективно проводить скрининг заболеваний на ранних этапах его возникновения, проводить превентивную терапию и мониторинг в периоды ремиссий, определять наличие микрометастазов в период лечения и тактику терапии в случае инактивации определенных генов. Эффективный поиск подобных молекулярно-генетических маркеров возможен только при использовании современных высоко информативных методов крупномасштабного скрининга генетических/геномных и эпигенетических/эпигеномных аномалий в материале злокачественной опухоли. ■

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, скрининг, диагностика, онкомаркеры, молекулярные маркеры, ДНК-маркеры, маркеры *GST π1*, *RARβ2* и *RASSF1A*.

**Keywords:** prostate cancer, screening, diagnosis, tumor markers test, molecular markers test, DNA markers test, *GST π1*, *RARβ2*, *RASSF1A* tests.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лопаткин Н.А., Максимов В.А., Ходырева Л.А., Давыдова Е.Н. Оптимизация ранней диагностики заболеваний предстательной железы в условиях мегаполиса // Урология. 2009. № 5. С. 50-54.
2. В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. Злокачественные новообразования в России в 2008 г. (заболеваемость и смертность). М. ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий. 2010. 256 с.
3. Аполихин О.И., Сивков А.В., Бешлиев Д.А., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ уронефрологической заболеваемости в РФ по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. 2010. № 1. С. 4-12.
4. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные опухоли в России: статистика, научные достижения, проблемы // Казанский медицинский журнал. 2004. № 4. С. 241.
5. Stamey T.A., Yang N., Hay A.R., McNeal J.E., Freiha F.S., Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate // N. Engl. J. Med. 1987. Vol. 317. P. 909-916.
6. Cooner W.H., Mosley B.R., Rutherford C.L. Jr., Beard J.H., Pond H.S., Terry W.J., Igel T.C., Kidd D.D. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen // J. Urol. 1990. Vol. 143. № 3. P. 1146-1152.
7. Catalona W.J., Smith D.S., Ratliff T.L., Dodds K.M., Coplen D.E., Yuan J.J., Petros J.A., Andriole G.L. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer // N. Engl. J. Med. 1991. Vol. 324. № 17. P. 1156-1161.
8. Yao S.L., Lu-Yao G. Understanding and appreciating overdiagnosis in the PSA era // J. Natl. Cancer Inst. 2002. Vol. 94. № 13. P. 958-960.
9. Collin S.M., Martin R.M., Metcalfe C., Gunnell D., Albertsen P.C., Neal D., Hamdy F., Stephens P., Lane J.A., Moore R., Donovan J. Prostate-cancer mortality in the USA and UK in 1975-2004: an ecological study // Lancet Oncol. 2008. Vol. 9. № 5. P. 445-452.
10. Schröder F.H., Hugosson J., Roobol M.J., Tammela T.L., Ciatto S., Nelen V., Kwiatkowski M., Lujan M., Lilja H., Zappa M., Denis L.J., Recker F., Berenguer A., Määttänen L., Bangma C.H., Aus G., Villers A., Rebillard X., van der Kwast T., Blijenberg B.G., Moss S.M., de Koning H.J., Auvinen A.; ER-SPC Investigators. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study // N. Engl. J. Med. 2009. Vol. 360. № 13. P. 1320-1328.
11. Labrie F., Candas B., Dupont A. et al. Screening diseases prostate cancer death: first analysis of the 1988 Quebec Prospective Randomized Controlled Trial // Prostate. 1999. Vol. 38. № 2. P. 83-91.
12. O'Shaughnessy M., Konety B., Warlick C. Prostate cancer screening: issues and controversies // Minn Med. 2010. Vol. 93. № 8. P. 39-44.
13. Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., Issa J.P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia // Adv. Cancer Res. 1998. Vol. 72. P. 141-196.
14. Bird A. The essentials of DNA methylation // Cell. 1992. Vol. 70. № 1. P. 5-8.
15. Merlo A., Herman J.G., Mao L., Lee D.J., Gabrielson E., Burger P.C., Baylin S.B., Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers // Nat. Med. 1995. Vol. 1. № 7. P. 686-692.
16. Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Kane M.F., Kolodner R.D., Vogelstein B., Kunkel T.A., Baylin S.B. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. № 12. P. 6870-6875.
17. Hoque M.O., Topaloglu O., Begum S., Henrique R., Rosenbaum E., Van Criekinge W., Westra W.H., Sidransky D. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects // J. Clin. Oncol. 2005. Vol. 23. № 27. P. 6569-6575.
18. Cooper C.S., Foster C.S. Concepts of epigenetics in prostate cancer development // Br. J. Cancer. 2009. Vol. 100. № 2. P. 240-245.
19. Nelson W.G., Yegnasubramanian S., Agoston A.T., Bastian P.J., Lee B.H., Nakayama M., De Marzo A.M. Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer // Front. Biosci. 2007. Vol. 12. P. 4254-4266.
20. Dobosy J.R., Roberts J.L., Fu V.X., Jarrard D.F. The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia // J. Urol. 2007. Vol. 177, N 3. P. 822-831.
21. Li L.C. Epigenetics of prostate cancer // Front. Biosci. 2007. Vol. 12. P. 3377-3397.
22. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps // Nat. Rev. Genet. 2007. Vol. 8. № 4. P. 286-298.
23. Hoque M.O., Kim M.S., Ostrow K.L., Liu J., Wisman G.B., Park H.L., Poeta M.L., Jeronimo C., Henrique R., Lendvai A., Schuurin E., Begum S., Rosenbaum E., Ongenaert M., Yamashita K., Califano J., Westra W., van der Zee A.G., Van Criekinge W., Sidransky D. Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome // Cancer Res. 2008. Vol. 68. № 8. P. 2661-2670.
24. Ngan R.K., Lau W.H., Yip T.T., Cho W.C., Cheng W.W., Lim C.K., Wan K.K., Chu E., Joab I., Grunewald V., Poon Y.F., Ho J.H. Remarkable application of serum EBV EBEB-1 in monitoring response of nasopharyngeal cancer patients to salvage chemotherapy // Ann. NY Acad. Sci. 2001. Vol. 945. P. 73-79.
25. Henrique R., Costa V.L., Cerveira N., Carvalho A.L., Hoque M.O., Ribeiro F.R., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., Jerónimo C. Hypermethylation of Cyclin D2 is associated with loss of mRNA expression and tumor development in prostate cancer // J. Mol. Med. 2006. Vol. 84. № 11. P. 911-918.
26. Henrique R., Jerónimo C., Hoque M.O., Carvalho A.L., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. Frequent 14-13-3 sigma promoter methylation in benign and malignant prostate lesions // DNA Cell Biol. 2005. Vol. 24. № 4. P. 264-269.
27. Henrique R., Jerónimo C., Hoque M.O., Nomoto S., Carvalho A.L., Costa V.L., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. MT1G hypermethylation is associated with higher tumor stage in prostate cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005. Vol. 14. № 5. P. 1274-1278.
28. Henrique R., Jerónimo C., Teixeira M.R., Hoque M.O., Carvalho A.L., Pais I., Ribeiro F.R., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis // Mol. Cancer Res. 2006. Vol. 4. № 1. P. 1-8.
29. Henrique R., Ribeiro F.R., Fonseca D., Hoque M.O., Carvalho A.L., Costa V.L., Pinto M., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., Jerónimo C. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients // Clin. Cancer Res. 2007. Vol. 13, № 20. P. 6122-6129.
30. Jerónimo C., Henrique R., Hoque M.O., Mambo E., Ribeiro F.R., Varzim G., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. // Clin. Cancer Res. 2004. Vol. 10. № 24. P. 8472-8478.
31. Jerónimo C., Usadel H., Henrique R., Silva C., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. Quantitative GST P11 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer // Urology. 2002. Vol. 60. № 6. P. 1131-1135.
32. Liang G., Gonzalzo M.L., Salem C., Jones P.A. Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction // Methods. 2002. Vol. 27. № 2. P. 150-155.
33. Luo J., Duggan D.J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C.M., Bittner M.L., Trent J.M., Isaacs W.B. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling // Cancer Res. 2001. Vol. 61. № 12. P. 4683-4688.
34. Sambrook J. and Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 1.116-1.118, 15.14-15.19.
35. Флетчер П., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. М. Медиасфера. 1998. 352 с.