

К.А. Павлов¹, А.Н. Шкопоров², Е.В. Хохлова², А.А. Корчагина², А.В. Сидоренков³, М.Э. Григорьев²,
Д.Ю. Пушкар³, В.П. Чехонин¹

¹ Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского МЗ РФ,
Москва, Российская Федерация

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ,
Москва, Российская Федерация

³ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ,
Российская Федерация

Разработка диагностической тест-системы для ранней неинвазивной диагностики рака простаты, основанной на количественной детекции мРНК гена *PCA3* в осадке мочи методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

45

Широкое внедрение в клиническую практику определения содержания простатического специфического антигена (ПСА) привело к увеличению числа выполняемых биопсий простаты, а снижение порога возрастных норм ПСА — к увеличению числа неоправданных биопсий. В связи с этим возникла необходимость в новых биомаркерах рака предстательной железы. *PCA3* — некодирующая мРНК, которая экспрессируется исключительно клетками предстательной железы. Целью данной работы было разработать диагностическую тест-систему для ранней неинвазивной диагностики рака простаты, основанной на количественной детекции мРНК гена *PCA3* в осадке мочи методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ) в режиме реального времени. В результате был создан лабораторный образец диагностической ПЦР-тест-системы, и отработана методика его применения. Получены данные о специфичности и чувствительности разработанного метода. Показана способность диагностической системы выявлять значительное превышение параметра *PCA3/KLK3* в образцах биоматериала, полученного от больных раком простаты, по сравнению с образцами от здоровых индивидуумов. В ходе проведенных исследований установлены достаточно высокие показатели диагностической чувствительности, специфичности и негативной предсказательной ценности для раннего неинвазивного скринингового обнаружения рака предстательной железы.

Ключевые слова: рак предстательной железы, биомаркер, *PCA3*, ОТ-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени.

К.А. Pavlov¹, А.Н. Shkoporov², Е.В. Khokhlova², А.А. Korchagina², А.В. Sidorenkov³, М.Е. Grigoriev²,
D.U. Pushkar³, V.P. Chekhonin¹

¹ Serbsky National Research Center

² Pirogov Russian National Research Medical University

³ Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov

Development of a Diagnostic Test System for Early Non-Invasive Detection of Prostate Cancer Based on *PCA3* mRNA Levels in Urine Sediment Using Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

The wide introduction of prostatic specific antigen (PSA) determination into clinical practice has resulted in a larger number of prostate biopsies, while the lower age threshold for PSA has led to a larger number of unnecessary prostate biopsies. Hence, there is a need for new biomarkers that can detect prostate cancer. *PCA3* is a noncoding messenger ribonucleic acid (mRNA) that is expressed exclusively in prostate cells. The aim of the study has been to develop a diagnostic test system for early non-invasive detection of prostate cancer based on *PCA3* mRNA levels in urine sediment using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). As part of the study, a laboratory diagnostic test system prototype has been designed, an application methodology has been developed and specificity and sensitivity data of the method has been assessed. The diagnostic system has demonstrated its ability to detect significantly elevated levels of *PCA3/ KLK3* in samples from prostate cancer (PCa) patients compared with those from healthy men. The findings have shown relatively high diagnostic sensitivity, specificity and negative-predictive values for an early non-invasive screening of prostate cancer

Key words: prostate cancer, biomarker, *PCA3*, RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — одно из наиболее часто диагностируемых онкологических заболеваний у мужчин в развитых странах мира [1, 2]. Ранняя диагностика рака простаты позволяет провести своевременное радикальное лечение, зачастую способствующее полному выздоровлению пациентов. Однако на начальных стадиях это заболевание может протекать бессимптомно либо с симптоматикой, которая обусловлена сопутствующими, более распространенными патологиями, такими как хронический простатит и доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) [3]. Одним из наиболее перспективных среди предложенных методов ранней неинвазивной диагностики РПЖ являются тест-системы, основанные на количественном анализе РНК-продукта гена *PCSA3*, сверхэкспрессия которого наблюдается при малигнизации тканей простаты.

Ген *PCSA3* был открыт в конце 1990-х гг. в ходе сравнения транскриптомов нормальных и злокачественных тканей предстательной железы. Дальнейшие исследования показали, что высокий уровень экспрессии *PCSA3* строго специфичен для злокачественных опухолей простаты и ее метастазов, но не для любых нормальных тканей, а также доброкачественных или злокачественных опухолей другого генеза. На основании этих данных было высказано предположение о возможности использования уровня экспрессии гена *PCSA3* в качестве биомаркера РПЖ [4].

Ген *PCSA3* расположен на хромосоме 9 в районе 9q21–22 и имеет размер 25 тыс. пар нуклеотидов (п.н.). Ген состоит из 4 экзонов, которые содержат 7 сайтов полиаденилирования. В настоящее время описано несколько альтернативных изоформ зрелой матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), транскрибируемой на матрице гена *PCSA3*, и почти во всех изоформах отсутствует экзон 2. Наиболее часто в клетках экспрессируются изоформы, содержащие экзоны 1, 3 и 4а либо 4б. Анализ гипотетических полипептидов, кодируемых открытыми рамками считывания мРНК *PCSA3*, не выявил гомологий с описанными ранее белками. Все эти данные указывают на то, что *PCSA3* относится к некодирующим РНК [5].

Ген *PCSA3* сверхэкспрессируется в тканях злокачественных опухолей предстательной железы, а РНК-продукт этого гена может присутствовать в моче и эякуляте. В связи с этим количественный анализ РНК *PCSA3* в этих биологических жидкостях может быть использован для неинвазивной диагностики рака простаты [4]. На сегодняшний день предложено 3 поколения таких систем диагностики, основанных на определении содержания РНК *PCSA3* в моче или ее клеточном осадке. Полученное значение нормируют на число клеток простаты в анализируемом образце, определяемое, в свою очередь, по количеству мРНК гена *KLK3*, кодирующего белок ПСА и экспрессирующегося исключительно в тканях предстательной железы [5, 6].

Существующие системы диагностики рака простаты, основанные на количественном анализе уровня экспрессии *PCSA3*, различаются по типу исследуемого материала и по способу оценки количества мРНК *PCSA3*. В первой предложенной тест-системе РНК *PCSA3* детектируют в клеточном осадке мочи, собранной после массажа простаты. Исследование, проведенное на выборке из 534 человек, показало, что высокий уровень *PCSA3* в клеточном осадке мочи коррелирует с высоким риском обнаружения рака простаты, по результатам биопсии,

при этом чувствительность теста на *PCSA3* составила 67%, а специфичность — 83%, что позволило сделать вывод о клинической перспективности нового диагностического теста [7]. Схожий метод диагностики рака предстательной железы, разработанный компанией «DiagnoCure Inc.» (Канада), базируется на определении уровня экспрессии *PCSA3* посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). В ходе проведенного мультицентрового исследования, охватившего 517 пациентов, было показано, что наличие высокого уровня *PCSA3* в моче пациента коррелирует с высокой вероятностью обнаружения РПЖ. Чувствительность теста, разработанного компанией «DiagnoCure Inc.», составила 66%, а специфичность — 89% [8, 9].

Доказано, что проведение массажа простаты и его характер не влияют на чувствительность и специфичность этого метода диагностики, и около 80% образцов мочи, собранных без предварительного массажа, пригодны для анализа мРНК *PCSA3* [10].

С 1986 г. анализ на содержание ПСА в сыворотке крови применяют для первичного скрининга мужчин на РПЖ. В то же время, по данным последних исследований, позитивная и негативная прогностическая ценность для теста на *PCSA3* выше, чем для теста на ПСА [8, 9, 11–13]. В связи с этим нельзя отрицать, что внедрение теста *PCSA3* в клиническую практику может существенно повысить эффективность диагностики РПЖ и сократить число ненужных биопсий.

Высокая распространенность рака простаты в Российской Федерации и несовершенство используемых на сегодняшний день методов ранней экспресс-диагностики данного заболевания делают чрезвычайно актуальной разработку новых отечественных тест-систем, предназначенных для быстрой, неинвазивной и малозатратной скрининговой диагностики РПЖ.

Цель исследования: создать диагностическую тест-систему для ранней неинвазивной диагностики рака простаты, основанную на количественной детекции мРНК гена *PCSA3* в осадке мочи методом ОТ-ПЦР-РВ.

Пациенты и методы

Участники исследования

Исследование проводилось на когорте из 49 человек, которые проходили лечение в клинике урологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова с декабря 2011 г. по март 2012 г. включительно. Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с поставленным диагнозом. Группа с верифицированным раком простаты составила 28 пациентов в возрасте 51–81 года с клинической стадией болезни $T_{2a}N_0M_0-T_{3b}N_1M_0$. Стадирование выполнялось по результатам патогистологического исследования после простатэктомии. Группа сравнения включала 13 пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в возрасте 56–82 лет, в контрольную группу вошли 8 условно здоровых индивидуумов в возрасте 29–54 лет.

Методы исследования

Параллельно с определением уровня *PCSA3* у пациентов с РП и ДГПЖ проводили исследование содержания общего ПСА в сыворотке крови с использованием стандартных методов.

После массажа предстательной железы производился сбор 20–40 мл первой порции мочи. Исследуемая моча

(10 мл) подвергалась центрифугированию с добавлением к клеточному осадку лизирующего буфера.

Дизайн ДНК-олигонуклеотидов для применения в качестве праймеров и зондов в реакциях ПЦР проводился с использованием программ «PerlPrimer v. 1.1.19» и «CLC DNA Workbench 6». Уникальность ПЦР-праймеров проверяли посредством поиска их последовательностей в базе данных «GenBank» при помощи алгоритма «BlastN».

Выделение тотальной РНК из биоптатов (около 25 мг ткани простаты) и осадков мочи (полученных при центрифугировании 10 мл мочи) производили с применением набора «RNeasy mini kit» (Qiagen, Голландия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. ОТ тотальной РНК осуществляли при помощи набора «RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis» (Fermentas, Литва) в соответствии с протоколом изготовителя. В качестве праймеров для ОТ использовали смесь олигонуклеотидов *KLK3-R1* и *PCSA3-R3* в концентрации каждого 1 мкМ.

Постановку ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием 2,5X ПЦР-смесей (Синтол, Россия). Для анализа кривых плавления ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймеров под *PCSA3* и *KLK3*, применяли реакционную смесь того же производителя с добавлением интеркалирующего красителя EvaGreen. В реакционные смеси объемом 20 мкл добавляли 1 мкл препарата кДНК и смесь 4 праймеров и 2 зондов (*PCSA3* и *KLK3*) до финальной концентрации каждого 0,2 мкМ. ПЦР проводили в приборе «С1000» с оптическим модулем «CFX96» (BioRad, США) согласно следующей программе:

- первичная денатурация — 95 °С, 5 мин;
- денатурация — 94 °С, 15 с;
- отжиг и элонгация — 60 °С, 60 с.

Длительность программы составила 45 циклов. Калибровочные кривые для значений порогового цикла *Ct* строили с использованием серийных 10-кратных разведений ДНК-матриц (кДНК или плазмидных ДНК). Расчеты относительных уровней мРНК осуществляли в программе «Microsoft Excel».

Клонирование полученных ПЦР-продуктов производили с применением вектора рAL-TA (Евроген, Россия)

при помощи стандартных методов молекулярного клонирования.

Статистическая обработка данных

Анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и коэффициента корреляции R^2 в программном пакете «LibreOffice Calc». Количественные данные представлены в формате: среднее (М) ± стандартная ошибка среднего (m). Построение ящичковых диаграмм проводили в приложении «SciDAVis».

Результаты

Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов для проведения ОТ-ПЦР-РВ

В ходе настоящего исследования была разработана тест-система для проведения ОТ-ПЦР-РВ, предназначенная для одновременной детекции в одной пробирке мРНК-продуктов 2 генов — *PCSA3* и *KLK3* (ген, кодирующий белок ПСА). Определение относительного уровня экспрессии мРНК гена *PCSA3* с помощью созданной тест-системы осуществляется путем сравнения значения порогового цикла амплификации *PCSA3* со значением порогового цикла для мРНК гена *KLK3*, являющегося конститутивно экспрессирующимся РНК-маркером клеток простаты. Таким образом, уровень экспрессии мРНК *PCSA3* выражается как отношение *PCSA3/KLK3*. Превышение данного параметра над референсными значениями будет указывать на малигнизацию клеток предстательной железы.

В качестве мишени для амплификации на матрице кДНК гена *PCSA3* был выбран участок экзон-экзонного соединения между экзонами 2 и 3. Таким образом была снижена вероятность амплификации на матрице остаточных количеств геномной ДНК, присутствующей в препаратах РНК и кДНК из простаты и мочи. Мишенью для амплификации на матрице гена *KLK3* был избран участок соединения экзона 1 и 2. Данный район присутствует во всех изоформах мРНК, синтезирующихся с гена *KLK3* (рис. 1).

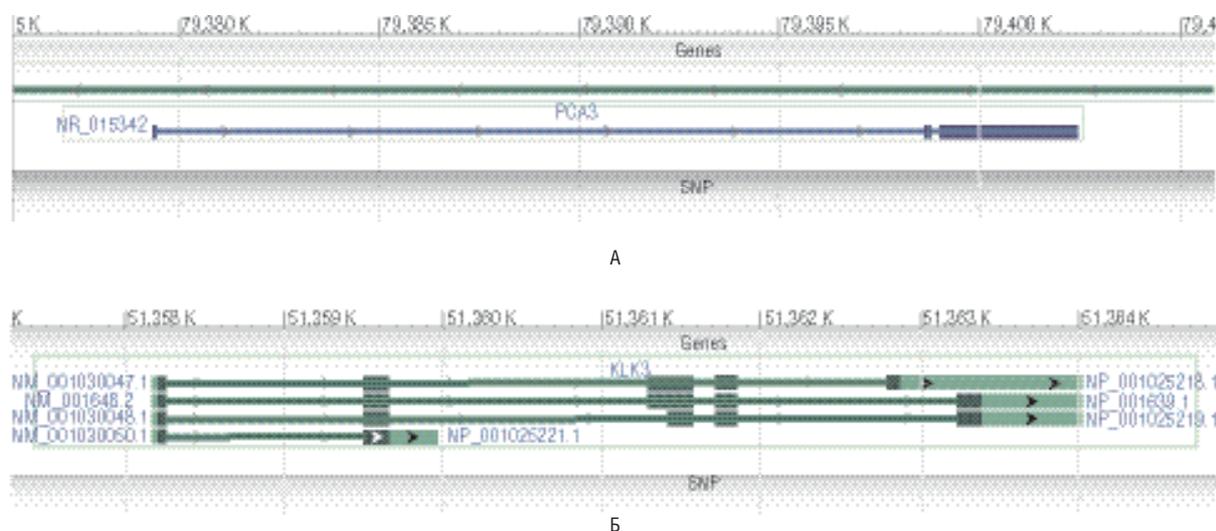


Рис. 1. Структура генов *PCSA3* (А) и *KLK3* (Б).

Примечание. Экзоны обозначены прямоугольниками, интроны — стрелками. Для гена *KLK3* приведены 4 альтернативные формы мРНК.

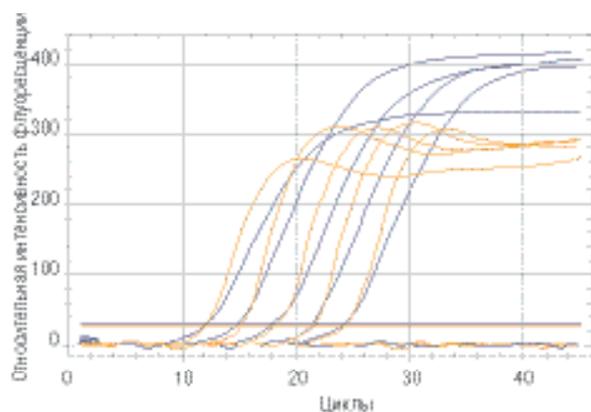


Рис. 2. Кривые амплификации, полученные с использованием созданной тест-системы и набора из 5 разведений кДНК из рака простаты.

Примечание. Синие кривые — *KLK3*, оранжевые кривые — *PCAZ*.

48

Расчетный размер ПЦР-продуктов, получаемых при помощи созданных пар праймеров, составляет 102 и 93 п.н. для генов *PCAZ* и *KLK3*, соответственно. Проверка специфичности подобранных пар праймеров и Taqman-зондов с использованием базы данных «GenBank» и алгоритма «BlastN» не выявила в геноме человека возможных побочных мишеней для амплификации с данными праймерами.

Изучение аналитической специфичности и чувствительности созданной тест-системы

Для изучения специфичности и чувствительности тест-системы, состоящей из 2 пар праймеров и 2 Taqman-зондов, комплементарных мРНК генов *PCAZ* и *KLK3* человека, были проведены испытания на 6 модельных образцах биоматериала, представляющих собой биоптаты предстательной железы, полученные от больных с верифицированным диагнозом РПЖ.

Образцы комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК), выделенные из перечисленных образцов, были использованы для приготовления серийных 10-кратных разведений в диапазоне 10^0 – 10^{-4} и протестированы с использованием созданной тест-системы.

Для определения достоверности количественной детекции и эффективности амплификации целевых фрагментов кДНК построены калибровочные графики зависимости порогового цикла C_t от относительной концентрации кДНК. Было показано, что коэффициент корреляции R^2 для генов *PCAZ* и *KLK3* превышает 0,99, а эффективность амплификации во всех случаях близка к 100% (рис. 2).

Для изучения специфичности ПЦР-амплификации фрагментов кДНК генов *PCAZ* и *KLK3* выполнили анализ кривых плавления и провели электрофорез полученных ПЦР-продуктов. Результаты эксперимента представлены на рис. 3. Как видно из рисунка, оба ПЦР-продукта (*PCAZ* и *KLK3*) представляют собой гомогенные фрагменты ДНК с ожидаемой молекулярной массой и температурой плавления (87,5 и 86 °С), соответствующей расчетной (рассчитана по последовательности фрагментов с использованием программы «PerfPrimer»).

Получение калибровочных образцов плазмидной ДНК. Изучение достоверности количественной детекции с помощью созданной тест-системы

В качестве калибровочных ДНК нами были выбраны рекомбинантные плазмиды, содержащие целевые фрагменты кДНК генов *PCAZ* и *KLK3*. Преимуществом плазмидных ДНК является их возобновляемость, дешевизна производства и хранения. Для получения рекомбинантных плазмид ПЦР-продукты генов *PCAZ* и *KLK3* были клонированы в вектор *pAL-TA*. Полученные рекомбинантные плазмиды были верифицированы секвенированием. Из них была приготовлена эквимоллярная смесь, которую в дальнейшем подвергли серийному 10-кратному разведению в диапазоне 10^{-6} – 10^{-11} для получения 6 калибровочных образцов. Было обнаружено, что аналитическая чувствительность созданной тест-системы находится на уровне 30–50 копий кДНК генов *PCAZ* и *KLK3* на реакцию.

Калибровочные графики (рис. 4), полученные с использованием набора калибровочных образцов, были в дальнейшем применены для расчета относительных концентраций кДНК генов *PCAZ* и *KLK3* и отношения *PCAZ/KLK3* и индекса *PCAZ* в образцах биоматериала по формулам 1 и 2.

Формула 1. Расчет абсолютного содержания мРНК генов *PCAZ* и *KLK3* в образце с использованием значений C_t и калибровочных кривых:

$$N_{\text{копий}} = e^{\frac{b - C_t}{k}},$$

где N — относительное число копий мРНК *PCAZ* или *KLK3*; C_t — значение порогового цикла; e — основание натурального логарифма; b и k — эмпирически определенные коэффициенты.

Формула 2. Расчет индекса *PCAZ*:

$$\text{Индекс } PCAZ = \frac{\text{Среднее } N_{PCAZ}}{\text{Среднее } N_{KLK3}} \times 10^1,$$

где N — относительное число копий мРНК *PCAZ* или *KLK3*.

Изучение диагностической чувствительности и специфичности созданной тест-системы

Изучение диагностической ценности тест-системы проводили на образцах осадков мочи, полученных от выборки пациентов численностью 49 человек. Из них 28 имели гистологически подтвержденный диагноз РПЖ (сывороточные концентрации ПСА у всех пациентов данной группы превышали 4 нг/мл), 13 (группа сравнения) — ДГПЖ, а 8 человек, входящие в контрольную группу, были условно здоровы. Среднее значение индекса *PCAZ* у группы пациентов с РПЖ составило $135,55 \pm 31,02$, у пациентов с ДГПЖ — $41,89 \pm 17,72$, а у лиц контрольной группы — $3,17 \pm 3,12$. Медианы индексов *PCAZ* были равны 82,3, 20,56 и 0,11 у наблюдаемых всех 3 групп, соответственно. Средние значения концентрации ПСА в сыворотке, определенные у групп пациентов с РПЖ и ДГПЖ, составили $4,4 \pm 0,53$ и $9,86 \pm 1,3$ нг/мл, соответственно (рис. 5).

Выраженной корреляции между значениями индекса *PCAZ* и сывороточными концентрациями ПСА обнаружено не было ($R^2 = 0,18$). Исходя из полученных данных, было выбрано пороговое значение индекса *PCAZ*,

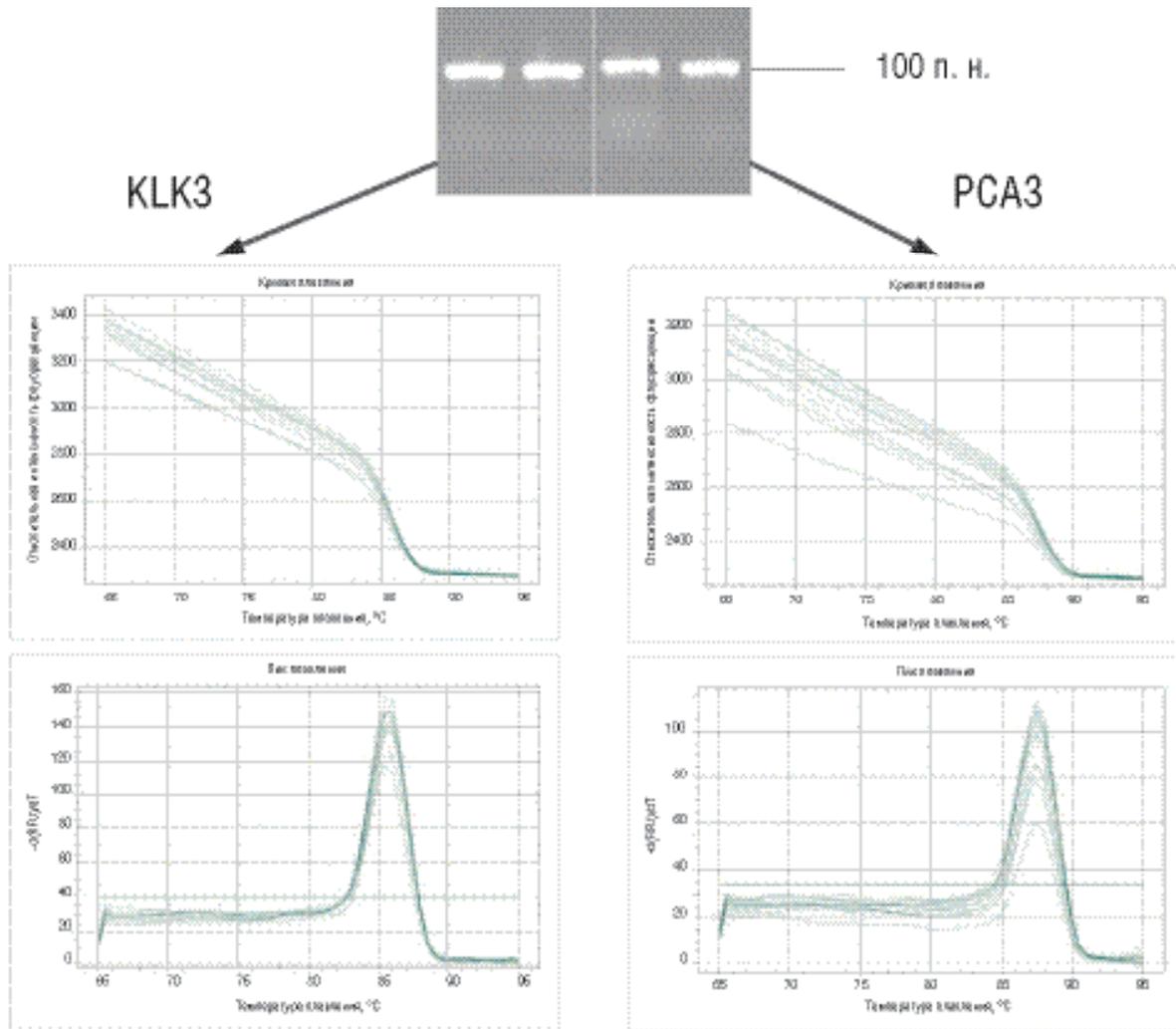


Рис. 3. Электрофорез и анализ кривых плавления ПЦР-продуктов генов *PCA3* и *KLK3*, полученных на матрице образца кДНК из биопсии рака простаты с использованием разработанной тест-системы.

Примечание. П.н. — пар нуклеотидов.

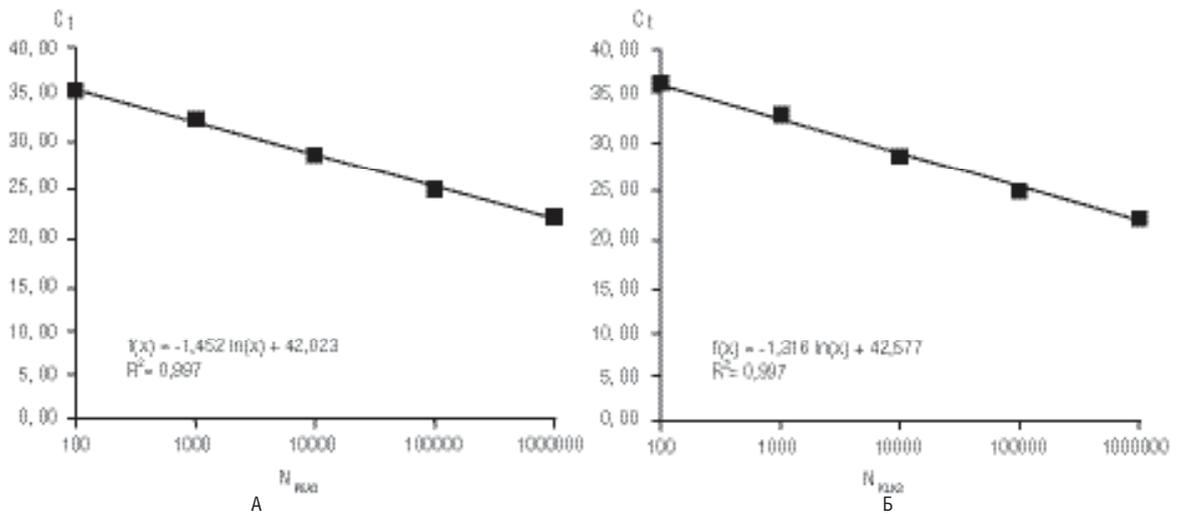
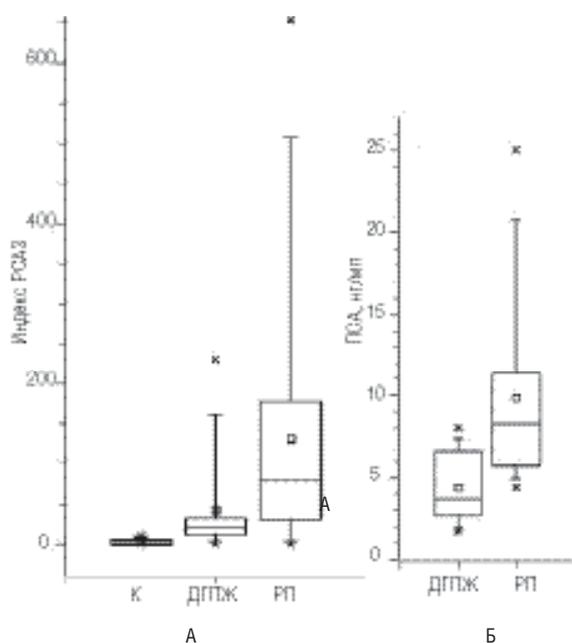


Рис. 4. Калибровочные кривые, полученные в ходе проведения ПЦР в режиме реального времени с серийными разведениями (10^{-6} – 10^{-10}) калибровочных плазмид, содержащих клонированные фрагменты генов *PCA3* (А) и *KLK3* (Б).

Примечание. Ст — значение порогового цикла; N — относительное число копий мРНК генов *PCA3* и *KLK3*.



50

Рис. 5. «Ящичковые» диаграммы распределения значений индекса $PSA3$ (А) и сывороточных концентраций ПСА (Б) в обследуемых группах пациентов.

Примечание. К — контрольная группа; ДГПЖ — группа пациентов с ДГПЖ; РП — группа пациентов с раком простаты. «Ящички» соответствуют диапазонам значений в 25–75-м центилях, «усы» — в 5–95-м центилях, крестиками отмечены крайние значения. Средние обозначены квадратами, медианы — перекладинами.

равное 50. Превышение индекса $PSA3$ над пороговым значением (диагностическая чувствительность теста) было обнаружено у 75% больных с верифицированным диагнозом РПЖ. В то же время специфичность теста составила 87,5%. Для сравнения, специфичность теста ПСА (с пороговым значением 4 нг/мл) в данной когорте больных оказалась равной лишь 68,75%. Негативная предска-

зательная ценность теста на $PSA3$ составила 67%. Среди пациентов с гистологически верифицированным диагнозом РПЖ и индексом $PSA3$ ниже порогового значения 5 больных имели очень низкие значения индекса $PSA3$ (1,52–7,6), а еще двое — значения, приближающиеся к 50 (29,75 и 32,37). В группе больных с ДГПЖ большинство пациентов имели значения индекса $PSA3$ в интервале от 10 до 40. В то же время в 2 образцах были выявлены высокие значения индекса (114,61 и 231,87), что может быть связано с наличием недиагностированной злокачественной опухоли. Значения индекса $PSA3$ в группе пациентов, не имеющих РПЖ или ДГПЖ, находились в диапазоне от 0 до 9,4.

Заключение

Создан лабораторный образец диагностической тест-системы для ранней неинвазивной диагностики рака простаты, основанной на количественной детекции мРНК гена $PSA3$ в осадке мочи методом ОТ-ПЦР-РВ. Отработана методика его применения совместно с детектирующим термоциклером «CFX96» (BioRad, США). Установлена высокая аналитическая специфичность и чувствительность разработанного метода по выявлению специфических фрагментов мРНК. Показана возможность использования разработанной тест-системы для обнаружения мРНК гена $PSA3$ в осадках мочи и способность тест-системы выявлять значительное превышение параметра $PSA3/CLK3$ в образцах биоматериала, полученных от больных раком простаты, по сравнению с образцами от здоровых людей. В ходе проведенных исследований обнаружены достаточно высокие показатели диагностической чувствительности, специфичности и негативной предсказательной ценности для раннего неинвазивного скринингового выявления рака простаты. На основании полученных данных можно сделать вывод о целесообразности выполнения дальнейших лабораторных исследований, направленных на совершенствование тест-системы, уточнение ее аналитических характеристик и диагностической ценности, а также проведения клинических испытаний полученной тест-системы на расширенном контингенте пациентов.

REFERENCES

1. Ferlay J., Autier P., Boniol M., Heanue M., Colombet M., Boyle P. *Ann. Oncol.* 2007; 18: 581–592.
2. Kok J.B., Verhaegh G.W., Roelofs R.W., Hessels D., Kiemeny L.A., Aalders T.W., Swinkels D.W., Schalken J.A. *Cancer Res.* 2002; 62: 2695–2698.
3. Bryzgunova O.E., Vlasov V.V., Laktionov P.P. *Biomedical chemistry - Voprosy biomeditsinskoj khimii.* 2007; 1 (3): 177–184.
4. Bussemakers M.J., van Bokhoven A., Verhaegh G.W., Smit F.P., Karthaus H.F., Schalken J.A., Debruyne F.M., Ru N., Isaacs W.B. *Cancer Res.* 1999; 59 (23): 5975–5979.
5. Day J.R., Jost M., Reynolds M.A., Groskopf J., Rittenhouse H. *Cancer Lett.* 2011; 301: 1–6.
6. Bourdumis A., Papatouris A.G., Chrisofos M., Efstathiou E., Skolarikos A., Deliveliotis C. *Int. Braz. J. Urol.* 2010; 36 (6): 665–668.
7. van Gils M.P., Hessels D., van Hooij O., Jannink S.A., Peelen W.P., Hanssen S.L., Witjes J.A., Cornel E.B., Karthaus H.F., Smits G.A., Dijkman G.A., Mulders P.F., Schalken J.A. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13 (3): 939–943.
8. Fradet Y., Saad F., Aprikian A., Dessureault J., Elhilali M., Trudel C., Masse B., Piche L., Chypre C. *Urology.* 2004; 64 (2): 311–315.
9. Tinzl M., Marberger M., Horvath S., Chypre C. *Eur. Urol.* 2004; 46 (2): 182–186.
10. Hessels D., Schalken J.A. *Nat. Rev. Urol.* 2009; 6 (5): 255–261.
11. Brawer M.K., Chetner M.P., Beatie J., Buchner D.M., Vessella R.L., Lange P.H. *J. Urol.* 1992; 147(3 Pt. 2): 841–845.
12. Roobol M.J., Schroder F.H., van Leeuwen P., Wolters T., van den Bergh R.C., van Leenders G.J., Hessels D. *Eur. Urol.* 2010; 58 (4): 475–481.
13. Wang R., Chinnaiyan A.M., Dunn R.L., Wojno K.J., Wei J.T. *Cancer.* 2009; 115 (17): 3879–3886.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Pavlov Konstantin Aleksandrovich, PhD, Senior Research Worker, Department of Fundamental and Applied Neurobiology, V.P. Serbskii State Research Center for Social and Forensic Psychiatry

Address: 119991, Moscow, Kropotkin lane 23; **tel.:** (901) 533-7790; **e-mail:** pkanew@mail.ru

Shkoporov Andrei Nikolaevich, PhD, Senior Research Worker, Laboratory of Microbiology and Biosafety, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 117997, Moscow, Ostrovityanova St., 1; **tel.:** (495) 434-16-77; **e-mail:** a.shkoporov@gmail.com

Khokhlova Ekaterina Viktorovna, PhD, Research Worker, Laboratory of Microbiology and Biosafety, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 117997, Moscow, Ostrovityanova St., 1; **tel.:** (495) 434-16-77, **fax:** (495) 434-17-66;

e-mail: ekat.khokhlova@gmail.com

Anna Aleksandrovna Korchagina, Ph.D student, Department of Medical Nanobiotechnologies, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 117997, Moscow, Ostrovityanova St., 1; **tel.:** (495) 434-13-01; **e-mail:** avilis1@yandex.ru

Aleksandr Vladimirovich Sidorenkov, Urologist, Ph.D student, Department of Urology, A.I. Eudukimov Moscow State University of Medicine and Dentistry

Address: 127006, Moscow, Dolgorukovskaya St., 4; **tel.:** (499) 978-01-21; **e-mail:** avsid-v@mail.ru

Maksim Eduardovich Grigor'ev, PhD, Professor, Department of Urology, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 117997, Moscow, Ostrovityanova St., 1; **tel.:** (495) 434-33-98; **e-mail:** drgrigoriev@mail.ru

Dmitrii Yur'evich Pushkar, PhD, Professor, Head of the Department of Urology, A.I. Eudukimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Honored Doctor of Russian Federation

Address: 127006, Moscow, Dolgorukovskaya St., 4; **tel.:** (499) 978-01-21

Vladimir Pavlovich Chekhonin, Head of the Department of Medical Nanobiotechnologies, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 117997, Moscow, Ostrovityanova St., 1; **tel.:** (495) 434-04-56; **e-mail:** chekhoninnew@yandex.ru