

Экспрессия молекулярных маркеров в ткани рака предстательной железы, связь с клинико-морфологическими особенностями заболевания

Спирина Л.В.^{1,2}, Тарасенко Н.В.^{2,3}, Горбунов А.К.¹,
Кондакова И.В.¹, Слонимская Е.М.^{1,2}, Усынин Е.А.¹

¹ НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

³ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск

Рак предстательной железы (РПЖ) является одной из самых распространенных опухолей среди мужчин. Цель проведенного исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционного фактора *Brn-3α*, AR, ERα в процессах развития РПЖ в связи с уровнем активации сигнального пути АКТ/м-TOR, наличием инвазии в семенные пузырьки и степенью дифференцировки опухоли. В исследование было включено 50 больных местно-распространенным РПЖ, прошедших стандартное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Определение уровня экспрессии генов *Brn-3α*, AR, ERα, и компонентов сигнального пути АКТ/м-TOR проводили методом ПЦР в реальном времени. Показана ассоциация увеличения экспрессии ядерного белка *Brn-3α* с развитием РПЖ, что связано с возрастанием уровня ERα и активацией сигнального каскада АКТ/м-TOR. При этом инвазия опухоли происходит при высоких уровнях мРНК стероидных рецепторов и PTEN, а также низкой экспрессии м-TOR. Выявлены связи между индексом Глисона и уровнем мРНК изучаемых молекулярных маркеров. Снижение экспрессии АКТ, GSK-3β на фоне возрастания уровня мРНК 4E-BP1 наблюдалось по мере снижения степени дифференцировки опухоли. Такие измерения происходили на фоне гиперэкспрессии фосфатазы PTEN. Представленные факты, отражающие особенности изменений биологических свойств опухоли, вероятно, могут составлять основу создания молекулярной панели для оценки развития и прогрессирования заболевания

Ключевые слова: транскрипционный фактор *Brn-3α*, рак предстательной железы, AR, ER, сигнальный путь АКТ/м-TOR, кастрационно-рефрактерная форма, коэффициент Глисона, инвазия.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Molecular markers expression in prostate cancers: association with clinical and morphological features of disease

Spirina L.V.^{1,2}, Tarasenko N.V.^{2,3}, Gorbunov A.K.¹,
Kondakova I.V.¹, Slonimskaya E.M.^{1,2}, Usynin E.A.¹

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Russia

Introduction. Prostate cancers belong to the high-spread tumors among men. **Objectives:** The purpose of the study was to investigate *Brn-3α*, AR, ERα expression in prostate cancer tissues in association with АКТ/мTOR signaling pathway activation, cancer invasion and grade. **Materials and methods:** 50 patients with locally advanced cancer of the prostate were included in the study. Expression of *Brn-3α*, AR, ERα, components of АКТ/м-TOR signaling pathway was determined by RT-PCR. **Results.** Overexpression of *Brn-3α* was found in prostate cancer tissues, which was accompanied by high level of ERα mRNA. Activation of АКТ/м-TOR signaling pathway was revealed in cancers. It was noted that the invasion of tumor was associated with high expression of ER, AR, PTEN as well as decreased mRNA level of m-TOR. The low activity of АКТ/м-TOR signaling pathway was revealed in least-differentiated tumors. Decrease of АКТ, GSK-3β expression and increase of 4E-BP1 happened in least-differentiated tumors compared to well-differentiated tumors (Gleason score 6-7). The altered protein kinase expression was associated with overexpression of PTEN. **Conclusion.** These data, reflecting the biological features of cancers, are the molecular pattern of prostate tumors progression.

Key words: transcription factor *Brn-3α*, prostate cancer, AR, ER, АКТ/м-TOR signaling pathway, castrate-refractory cancer, Gleason score, invasion.

Рак предстательной железы (РПЖ) является распространенной опухолью у мужчин. Известно, что ответ опухоли на проводимое комбинированное лечение регистрируется более чем у 90% пациентов с метастатическим РПЖ. Однако длительность ответа составляет в среднем от 12 до 36 мес, что в конечном итоге приводит к прогрессированию опухолевого процесса с развитием кастрационно-резистентной формы заболевания [1, 2]. Неуклонный прирост заболеваемости, отсутствие 100% эффективности классической депривационной терапии являются факторами, способствующими поиску молекулярных маркеров развития РПЖ [3].

Прогнозирование риска прогрессирования РПЖ в настоящее время основано на оценке исходного уровня простатспецифического антигена, суммы баллов по Глиссону, клинической стадии с использованием номограмм Kattan, классификации рисков D'Amico [3] и таблицы Partin [4]. Основным недостатком предложенных моделей является недостаточное количество хорошо изученных и апробированных переменных, что определяет их невысокую диагностическую точность. Эффективность номограмм с включением в прогностическую модель молекулярно-генетических параметров опухоли является предметом изучения в настоящее время [5, 6].

В развитии гормонозависимых опухолей человека большое значение имеют транскрипционные факторы POU4F1, также известные как нейрогенные факторы Brn-3α [7]. Diss J.K. с соавторами полагают, что транскрипционный фактор Brn-3α участвует в различных процессах онкогенеза, определяя интенсивность пролиферации опухолевых клеток и участвуя в регуляции апоптоза [8]. Кроме того, выявлены ассоциации данного показателя с рецепторами половых гормонов: эстрогенов (ER) и андрогенов (AR) [9].

Рецепторы стероидных гормонов входят в большое семейство внутриклеточных рецепторов, которые активируются под действием соответствующих лигандов. ER и AR являются их основными представителями. ER имеют 2 подтипа: ERα и ERβ. Каждый из них кодируется отдельным геном, при этом имеются сведения о преимущественной экспрессии того или иного подтипа рецептора в разных тканях [10]. Известна роль ERα в качестве важного регулятора интенсивности процессов ангиогенеза гормонозависимых опухолей [11]. Изменение уровня и экспрессии стероидных гормонов найдены в злокачественных новообразованиях различных локализаций [12]. Ключевым сигнальным каскадом, обеспечивающим регуляцию процессов пролиферации и апоптоза при действии AR и ER, является АКТ/m-TOR [13, 14, 15]. К его значимым компонентам относятся протеинкиназы АКТ, m-TOR, PTEN и др.

Цель проведенного исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционного фактора Brn-3α, AR, ERα, компонентов сигнального пути АКТ/m-TOR в ткани РПЖ в связи с клинико-морфологическими особенностями, в частности наличием инвазии в семенные пузырьки и уровнем гистологической организации опухоли

Материал и методы

В исследование было включено 50 больных местно-распространенным РПЖ T2-3N0M0, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. 10 пациентов РПЖ имели признаки инвазии в семенные пузырьки. Индекс Глиссона от 6 до 7 имели 8 пациентов, а более 7 — 13 человек. Объемы диагностики и лечения больных соответствовали рекомендуемым алгоритмам по диагностике и лечению злокачественных новообразований, утвержденным Министерством здравоохранения РФ. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Материалом исследования являлись образцы опухолевой ткани, полученные при диагностической биопсии. Нормальная ткань простаты для изучения экспрессии молекулярных показателей была получена при оперативном вмешательстве у больных раком мочевого пузыря, которым была проведена цистпростатэктомия.

Для исследования экспрессии молекулярных показателей и выделения мРНК образцы тканей помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C).

Определение уровня экспрессии генов Brn-3α, AR, ERα, а также компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути

РНК выделяли с использованием набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Germany). На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, A260/A280 = 1,95—2,05; A260/A230 = 1,90—2,31. Целостность РНК оценивалась с использованием капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA). RIN составил 5,6—7,8.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени

Уровень экспрессии генов оценивали методом количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора ОТ m-MuLV-RH (БиоЛабмикс, Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. ПЦР ставили в трех репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабмикс, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл — 94°C, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов — 1 шаг 94°C, 10 с и 2 шаг 20 с — при температуре 60°C. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (табл. 1).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии гена *GAPDH*.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 8.0. Результаты определения экспрессии генов представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Значимость различий оценивали по критерию Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Существование связи между показателями определяли с использованием корреляционного анализа, силу связи между переменными оценивали, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты и их обсуждение

В ранее проведенных работах показана роль ядерного белка Bcr-3 α в развитии РПЖ, что связано с возрастанием уровня ER α . Выявлена активация сигнального каскада АКТ/m-TOR: отмечены высокие уровни экспрессии АКТ, m-TOR, а также повышение уровня фосфатазы PTEN [16]. Эти сведения позволили провести работу по изучению связи изучаемых показателей у больных РПЖ и клинико-морфологическими пара-

метрами заболевания. К наиболее значимым параметрам относят инвазию в семенные пузырьки и показатель Глисона, отражающий уровень гистологической организации опухоли.

У больных с наличием инвазивного роста отмечено увеличение экспрессии AR и ER в 1,78 и 3,9 раза соответственно по сравнению с пациентами без инвазии (табл. 2).

Распространение опухоли и наличие инвазии в семенные пузырьки приводило к снижению уровня активации сигнального пути АКТ/m-TOR на фоне повышения экспрессии PTEN. Выявлено снижение уровня m-TOR в 135,6 раза на фоне роста экспрессии фосфатазы в 2,19 раза у больных с инвазией в семенные пузырьки. В настоящее время имеются немногочисленные сведения, позволяющие оценить связь молекулярных показателей с клиническими параметрами заболевания. Было показано, что маркер Ki-67, отражающий интенсивность процессов пролиферации, может быть связан с наличием инвазии у больных РПЖ [17], однако в дальнейшем этот факт не был подтвержден.

Особый интерес представляют связи изучаемых молекулярных параметров с индексом Глисона, который отражает степень дифференцировки опухоли. В табл. 3 показаны уровни их экспрессии в двух группах больных с уровнем Глисона 6—7 и более 7. Выявлено падение ак-

Таблица 1

Последовательность праймеров проб исследованных генов

	Ампликон	Последовательность
<i>POU4F1</i> NM_006237	294 п.н.	F 5- CACGCTCTCGCACAACAA-3 R 5- ATCCGCTTCTGCTTCTGTCT-3
<i>AR</i> NM_000044	190 п.н.	F 5- GAGGGACAGCAGGCAGA-3 R 5- GCTATCAGAACACACACACACT-3
<i>ER</i> NM_000125	386 п.н.	F 5- TCCTGATGATTGGTCTCGTCT-3 R 5- GATGTGGGAGAGGATGAGGA-3
<i>4E-BP1</i> NM_004095.3	244 п.н.	F 5- CAGCCCTTTCTCCCTCACT -3 R 5- TTCCCAAGCACATCAACCT -3
<i>AKT1</i> NM_001014431.1	181 п.н.	F 5- CGAGGACGCCAAGGAGA -3 R 5- GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT -3
<i>C-RAF</i> NM_002880.3	152 п.н.	F 5- TGGTGTGTCTCTGCTCCCT -3 R 5- ACTGCCTGCTACCTTACTTCCT -3
<i>GSK3b</i> NM_001146156.1	267 п.н.	F 5- AGACAAGGACGGCAGCAA -3 R 5- TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT -3
<i>70S kinase alpha</i> NM_001272042.1	244 п.н.	F 5- CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3 R 5- ACACATCTCCCTCTCCACCTT -3
<i>M-TOR</i> NM_004958.3	160 п.н.	F 5- CCAAAGGCAACAAGCGAT-3 R 5- TTCACCAAACCGTCTCCAA -3
<i>PDK1</i> NM_001278549.1	187 п.н.	F 5- TCACCAGGACAGCCAATACA -3 R 5- CTCCTCGGTCACTCATCTTCA -3
<i>GAPDH</i> NM_001256799.2	138 п.н.	F 5- GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3 R 5 -GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3

Примечание. NM — номер последовательности ПНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); F — прямой праймер; R — обратный праймер

тивности сигнального пути АКТ/m-TOR по мере снижения дифференцировки опухоли. Так, у больных с показателем Глисона более 7 отмечено снижение экспрессии АКТ, GSK-3 β и рост уровня мРНК 4E-BP1 в 9,1, 56,6 и 2,36 раза соответственно, по сравнению с более дифференцированными опухолями с индексом Глисона 6–7. При этом экспрессии PTEN увеличивалась в 1,39 раза.

При проведении корреляционного анализа выявлены зависимости между уровнем экспрессии АКТ

($r = -0,48$; $p = 0,01$), GSK-3 β ($r = -0,49$; $p = 0,001$), PTEN ($r = 0,34$; $p = 0,01$) и индексом Глисона. Эти факты являются дополнительным доказательством связи молекулярных параметров с уровнем гистологической организации опухоли. В ранее проведенных исследованиях не удалось доказать связь молекулярных параметров с уровнем гистологической организации опухоли, при этом была доказана их прогностическая значимость [18].

Таблица 2

Экспрессия генов при РПЖ в зависимости от наличия инвазии опухоли в семенные пузырьки

Показатель, Усл. Ед.	Рак предстательной железы	
	Без инвазии	С инвазией
Brn-3 α	40,5 $\pm$ 9,75	45,85 $\pm$ 13,85
AR	140,78 $\pm$ 22,32	250,8 $\pm$ 36,99*
ER	70,36 $\pm$ 19,50	275,43 $\pm$ 36,39*
Компоненты АКТ/m-TOR сигнального пути		
PTEN	225,99 $\pm$ 25,04	494,87 $\pm$ 17,13*
АКТ	10,50 $\pm$ 3,40	11,73 $\pm$ 4,27
GSK-3-beta	13,04 $\pm$ 5,86	0,73 $\pm$ 0,26
PDK1	14,80 $\pm$ 4,49	2,93 $\pm$ 1,06
c-RAF	25,38 $\pm$ 8,53	18,93 $\pm$ 10,93
Протеинкиназа m-TOR и ее субстраты		
m-TOR	31,93 $\pm$ 14,21	0,68 $\pm$ 0,20*
70 S6	18,55 $\pm$ 11,45	11,97 $\pm$ 9,14
4E-BP1	3,89 $\pm$ 2,00	4,93 $\pm$ 3,06
Примечание. * — значимость различий по сравнению с пациентами без инвазии в семенные пузырьки, $p < 0,05$		

Таблица 3

Экспрессия генов при РПЖ в зависимости от индекса Глисона

Показатель, Усл. Ед.	Рак предстательной железы	
	Индекс Глисона 6-7	Индекс Глисона более 7
Brn-3 α	24,85 $\pm$ 11,16	49,11 $\pm$ 23,6
AR	143,29 $\pm$ 53,86	142,86 $\pm$ 36,99
ER	188,56 $\pm$ 58,22	38,87 $\pm$ 36,39
Компоненты АКТ/m-TOR сигнального пути		
PTEN	213,10 $\pm$ 53,60	297,17 $\pm$ 54,31*
АКТ	22,4 $\pm$ 11,2	2,46 $\pm$ 0,57*
GSK-3-beta	39,38 $\pm$ 23,08	0,60 $\pm$ 0,16*
PDK1	29,07 $\pm$ 14,6	2,83 $\pm$ 1,13
c-RAF	20,5 $\pm$ 8,7	9,53 $\pm$ 2,77
Протеинкиназа m-TOR и ее субстраты		
m-TOR	49,1 $\pm$ 24,0	18,01 $\pm$ 12,7
70 S6	3,07 $\pm$ 1,03	5,83 $\pm$ 3,12
4E-BP1	3,76 $\pm$ 2,08	1,6 $\pm$ 0,51*
Примечание. * — значимость различий по сравнению с пациентами с индексом Глисона от 6 до 7, $p < 0,05$		

Стоит отметить, что изучаемые клинко-морфологические особенности заболевания отражают биологические характеристики опухоли и связаны с ее агрессивностью. Снижение экспрессии компонентов сигнального пути АКТ/m-TOR при росте уровня мРНК PTEN встречаются в более запущенных и клинически неблагоприятных случаях. При этом развитие заболевания с признаками инвазии определяется возрастанием экспрессии AR и ER.

Таким образом, развитие РПЖ связано с ростом экспрессии ядерного фактора Brn-3α и рецепторов стероидных гормонов, а также активацией сигнального пути АКТ/m-TOR. Инвазия опухоли происходит при высоких уровнях мРНК стероидных рецепторов, низкой экспрессии m-TOR и высокой экспрессии PTEN. Выявлены связи между индексом Глисона и уровнем мРНК изучаемых молекулярных маркеров, что характеризует значимость данных показателей в процессах онкогенеза. Так, снижение экспрессии АКТ, GSK-3β и повышение экспрессии PTEN происходит при повышении индекса Глисона и сопровождается развитием низкодифференцированных раков. Резюмируя полученные сведения, надо отметить важную роль молекулярных показателей в процессе развития данного заболевания. Связи, показанные в данной работе, имеют значение для развития молекулярных подходов в клинической онкологии, что, несомненно, требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Amiya Y, Yamada Y, Sugiura M, Sasaki M, Shima T, Suzuki N, Nakatsu H, Murakami S, Shimazaki J. Treatment of locally advanced prostate cancer (Stage T3). *Jpn J Clin Oncol*. 2017 Jan 17. doi: 10.1093/jjco/hyw186.
2. Маркова АС, Поликарпова СБ, Камолов БШ, Гриднева ЯВ, Калинин СА, Петерс МВ, Матвеев ВБ. Факторы прогноза общей выживаемости больных метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы. *Онкоурология*. 2015;11(2):77-84.
3. D'Amico AV, Moul J, Carroll PR, Sun L, Lubeck D, Chen MH. Prostate specific antigen doubling time as a surrogate end point for prostate cancer specific mortality following radical prostatectomy or radiation therapy. *J Urol*. 2004 Nov;172(5 Pt 2):42-46.
4. Makarov DV1, Partin AW. Prostate-Cancer Risk Stratification via Early PSA Testing. *Rev Urol*. 2007;9(2):91-92.
5. Strand SH, Hoyer S, Lynnerup AS, Haldrup C, Storebjerg TM, Borre M, Orntoft TF, Sorensen KD. High levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is an adverse predictor of biochemical recurrence after prostatectomy in ERG-negative prostate cancer. *Clin Epigenetics*. 2015;7:111. doi: 10.1186/s13148-015-0146-5.
6. Niedworok C1, Tschirdewahn S1, Reis H2, Lehmann N3, Szucs M4, Nyirady P4, Romics I4, Rubben H1, Szarvas T5. Serum Chromogranin A as a Complementary Marker for the Prediction of Prostate Cancer-Specific Survival. *Pathol Oncol Res*. 2016. doi: 10.1007/s12253-016-0171-5.
7. Budhram-Mahadeo V, Fujita R, Bitsil S, Sicard P, Heads R. Co-expression of POU4F2/Brn-3b with p53 may be important for controlling expression of pro-apoptotic genes in cardiomyocytes following ischaemic/hypoxic insults. *Cell Death and Disease*. 2014;5:1503. doi:10.1038/cddis.2014.452
8. Diss JK, Faulkes DJ, Walker MM, Patel A, Foster CS, Budhram-Mahadeo V, Djamgoz MB, Latchman DS, Berwick DC. A simple technique for the prediction of interacting proteins reveals a direct Brn-3a-androgen receptor interaction. *J. Biol. Chem*. 2010;285:15286-15295.
9. Berwick DC, Diss JK, Budhram-Mahadeo VS, Latchman DS. A simple technique for the prediction of interacting proteins reveals a direct Brn-3a-androgen receptor interaction. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15286-15295. doi: 10.1074/jbc.M109.071456. Epub 2010 Mar 12.
10. Stoica J, Franke FT, Wellstein A, Szubaiko F, List H-J, Reiter R, Morgan E, Martin MB, Stoica A. Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway. *Molecular Endocrinology*. 2003;17:818-830.
11. Vamesu S. Angiogenesis and ER/PR status in primary breast cancer patients: an analysis of 158 needle core biopsies. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2007;48:25-31.
12. Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Letters*. 2011;300:1-9.
13. Wang Y, Romigh T, He X, Orloff MS, Silverman RH, Heston WD, Eng C. Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19:4319-4329.
14. Spirina LV, Usynin YA, Kondakova IV, Yurmazov ZA, Slonimskaya EM, Kolegova ES. The AKT-mTOR Signalling Pathway in Kidney Cancer Tissues. *AIP Conf Proc*. 2015;1688: 080004-1-5.
15. Спирина ЛВ, Усынин ЕА, Кондакова ИВ, Юрмазов ЗА, Слонимская ЕМ. Влияние таргетной терапии на содержание транскрипционных, ростовых факторов, протеинкиназы TOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;60(6):768-772.
16. Spirina LV, Usynin EA, Kondakova IV, Yurmazov ZA, Slonimskaya EM. Effect of Target Therapy on the Content of Transcription and Growth Factors, Protein Kinase TOR, and Activity of Intracellular Proteases in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2016. 60(6):798-801.
17. Горбунов АК, Спирина ЛВ, Усынин ЕА, Слонимская ЕМ, Кондакова ИВ. Роль транскрипционного фактора в развитии рака предстательной железы, связь с особенностями гормональной рецепции и уровнем активации АКТ/m-TOR-сигнального пути. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016;3:54.
18. Zellweger T1, Gunther S, Zlobec I, Savic S, Sauter G, Moch H, Mattarelli G, Eichenberger T, Curschellas E, Rufnacht H, Bachmann A, Gasser TC, Mihatsch MJ, Bubendorf L. Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer. *Int J Cancer*. 2009;124(9):2116-23.
19. Dunsmuir WD1, Gillett CE, Meyer LC, Young MP, Corbishley C, Eeles RA, Kirby RS. Molecular markers for predicting prostate cancer stage and survival. *BJU Int*. 2000 Nov;86(7):869-78.