

Диагностическая ценность онкомаркеров TRF1 и MMP-7 в отношении различных новообразований предстательной железы

В.П. Авдошин¹, С.А. Апрытин², С.А. Пульбере¹, С.А. Гордеев², А.И. Глухов^{2,3}

¹Кафедра урологии и оперативной нефрологии РУДН, Москва;

²ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии Департамента здравоохранения Москвы;

³Кафедра биохимии ГОУ ВПО МГМУ им. И.М. Сеченова

Контакты: Сергей Александрович Апрытин apryatin@mail.ru

Проанализированы относительные уровни экспрессии мРНК теломерсвязывающего белкового фактора (TRF1) и матрикс-металлопротеиназы-7 (MMP-7) клетками, полученными из биоптатов предстательной железы пациентов с доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы (РПЖ) и здоровых мужчин, не имевших видимых заболеваний предстательной железы, и рассчитан индекс отношения уровней экспрессии TRF1/MMP-7 для указанных выше патологий.

Установлено статистически достоверное различие уровней экспрессии TRF1, MMP-7 и индекса TRF1/MMP-7 в исследуемых группах, что может свидетельствовать о высокой диагностической значимости данных маркеров в отношении определения ранних стадий РПЖ и позволит клиницистам проводить более точную диагностику пациентов с различными урологическими заболеваниями.

Ключевые слова: рак предстательной железы, диагностическая ценность, онкомаркеры, теломерсвязывающий белковый фактор, матрикс-металлопротеиназа-7

Diagnostic value of TRF1 and MMP-7 against various prostate neoplasms

V.P. Avdoshin¹, S.A. Apryatin², S.A. Pulbere¹, S.A. Gordeev², A.I. Glukhov^{2,3}

¹Department of Urology and Surgical Nephrology, Russian Peoples Friendship University, Moscow; ²Moscow Research Institute of Medical Ecology, Moscow Department of Healthcare; ³Department of Biochemistry, I.M. Sechenov Moscow State Medical University

The authors analyzed the relative levels of telomeric repeat-binding protein factor 1 (TRF1) and matrix metalloproteinase-7 (MMR-7) mRNA expression by the cells obtained from prostate biopsy specimens of patients with benign prostate hyperplasia and cancer (PC) and healthy men without visible prostate diseases and calculated a TRF1/MMR-7 expression ratio for the above conditions.

There was a statistically significant difference in the levels of TRF1 and MMP-7 expression and TRF1/MMP-7 ratio in the study groups, which may be suggestive of the high diagnostic value of these markers in determining the early-stage of PC and which enables clinicians to make a more accurate diagnosis in patients with various urologic diseases.

Key words: prostate cancer, diagnostic value, oncomarkers, telomeric repeat-binding protein factor, matrix metalloproteinase-7

Введение

Увеличение продолжительности жизни мужского населения является одной из причин значительного роста числа пациентов, страдающих доброкачественной гиперплазией (ДГПЖ) и раком (РПЖ) предстательной железы. Появление симптомов ДГПЖ и присоединение различных осложнений течения болезни крайне отрицательно сказываются на качестве жизни пациентов.

В структуре онкологических заболеваний РПЖ занимает 4-е место в мире после рака легких, желудка и кожи и 1-е место — в США. За последние 20 лет в России также отмечен значительный рост заболеваемости РПЖ: абсолютный прирост впервые выявленных больных с этим диагнозом за 1993–2003 гг. составил 104,1%,

а по темпам ежегодного прироста (24,1%) РПЖ вышел на 1-е место среди всех онкологических заболеваний [1, 2]. Едва ли можно назвать другую проблему в современной медицине, которая привлекала бы столь пристальное внимание не только клиницистов, но и биохимиков, молекулярных биологов, эндокринологов, морфологов. Современные биохимические, эндокринологические и молекулярно-биологические методы позволяют рассматривать зависимость возникновения РПЖ от присутствия в опухолевых клетках конкретных химических соединений, нарушение структуры и функции которых может лежать в основе развития и прогрессии опухолевого процесса. В настоящее время поиск причин возникновения болезни от изучения вопросов,

связанных с влиянием вредных факторов окружающей среды, перешел к исследованиям цитогенетических и молекулярных процессов, лежащих в основе неконтролируемого инвазивного роста и метастазирования РПЖ, которые способствуют развитию гормонорезистентности и прогрессии опухоли [3].

РПЖ может долго оставаться бессимптомным, на ранних стадиях опухолевого процесса никаких признаков заболевания не наблюдается. Как правило, симптомы РПЖ появляются уже на поздних стадиях, для которых характерно прорастание капсулы и распространение опухоли в окружающие ткани. В связи с этим сегодня одним из важных клинических вопросов остается ранняя диагностика данного заболевания, так как до сих пор высока доля его позднего выявления (в стадии распространенных метастазов). Арсенал диагностических методов, которые используют для обследования больных с подозрением на РПЖ, включает пальцевое ректальное (ПРИ) и трансректальное ультразвуковое (ТРУЗИ) исследования, компьютерную и магнитно-резонансную томографию, остеосцинтиграфию костей скелета и биопсию предстательной железы. Однако наиболее ценным в диагностике и мониторинге эффективности лечения РПЖ является метод определения уровня концентрации простатического специфического антигена (ПСА), его вариантов и молекулярных форм [1–3]. Основная трудность ранней диагностики — дифференциация РПЖ с ДГПЖ, простатитом и другими заболеваниями, сопровождающимися расстройствами мочеиспускания, а также сочетание данных заболеваний, что приводит к снижению чувствительности и специфичности таких методов обследования, как определение уровня ПСА, ПРИ предстательной железы и ТРУЗИ.

В связи с этим необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на изучение механизмов инвазии, прогрессии и метастазирования РПЖ, что позволит выявить новые факторы прогноза и маркеры развития РПЖ, в частности неблагоприятного течения заболевания. Результаты этих исследований помогут клиницистам повысить эффективность лечения. Последние годы характеризуются переходом на качественно новый этап в изучении патогенетических механизмов заболевания. В первую очередь это связано с молекулярно-биологическими исследованиями онкогенов и супрессорных генов, полипептидных факторов роста, цитокинов, а также процессов регуляции программированной клеточной гибели (апоптоз) и механизмов метастазирования опухолей [4].

Одна из основных функций теломер заключается в сохранении целостности и стабильности хромосом: теломеры препятствуют нуклеазной деградации хромосомных концов, а также предотвращают их слияние.

В клетках человека идентифицирован теломерсвязывающий белковый фактор TRF1, способ-

ный связываться с теломерными повторами *in vitro* [5, 6]. Данный белок присоединяется к двухнитевым участкам теломер и препятствует работе фермента теломеразы. Этот фермент отвечает за восстановление теломер, концевых участков хромосом, которые укорачиваются при каждом делении [7]. Активация теломеразы в обычной соматической клетке приводит к стабилизации длины теломер, что в свою очередь вызывает нарушение запрограммированной гибели клеток, которые приобретают возможность неограниченного роста (иммортализация). Уменьшение количества TRF1 в цитоплазме приводит к постепенному удлинению теломер в связи с открытием доступа для работы теломеразы [5, 8]. Показана диагностическая значимость TRF1 при разных злокачественных новообразованиях, например, при раке желудка [9], однако данные литературы по использованию этого маркера в диагностике РПЖ отсутствуют.

Опухолевые клетки в процессе ангиогенеза продуцируют фактор роста эндотелия, стимулируют деление и ускоряют формирование капилляров в опухоли [10, 11]. Помимо этого, клетки опухолей продуцируют ферменты семейства матрикс-металлопротеиназ (ММП), например, ММП-7 (матрилизин), которые разрушают внеклеточный матрикс посредством упрощения инвазии клеток эндотелия и образования капилляров в опухолевой ткани [12, 13]. Инвазия сосудов в опухоль и способность опухолевых клеток с помощью металлопротеиназ растворять базальные мембраны обеспечивает им проникновение в кровоток и метастазирование в различные органы и ткани. В некоторых работах [14, 15] продемонстрирована диагностическая значимость ММП-7 при РПЖ.

Цель исследования — определение уровней экспрессии мРНК TRF1, ММП-7 клетками, полученными из биоптатов предстательной железы больных с ДГПЖ, различной степенью дифференцировки РПЖ (высоко- — ВДР, умеренно- — УДР и низкодифференцированный — НДР), а также пациентов, не имеющих видимых заболеваний предстательной железы (норма), и индекса отношения уровней экспрессии TRF1/ММП-7.

Анализ проводили с учетом основных клинических и морфологических характеристик заболевания (стадия опухолевого процесса, возраст пациентов, гистологическое строение и степень дифференцировки новообразования).

Материалы и методы

В исследование входили 30 пациентов, находившихся на стационарном лечении в урологическом отделении московской клинической больницы №29, от которых был получен 31 биоптат (3 — без патоморфологических изменений в тканях предстательной железы — норма, 11 — с верифицированной ДГПЖ и 17 — с различными

стадиями РПЖ). Средний возраст больных составил 62,4 года (от 51 до 69 лет).

Жалобы на возникновение дизурических явлений предъявляли как пациенты с верифицированной ДГПЖ, так и больные с различными стадиями РПЖ. Наличие болевого синдрома в пояснице и костях таза наблюдалось у 2 пациентов с метастатическим РПЖ. Среди пациентов с морфологически верифицированным РПЖ при ПРИ подозрение на злокачественное новообразование возникло в 9 (56%) случаях. Результаты ТРУЗИ показали, что большинство (89%) больных имели увеличенный объем предстательной железы. В группе пациентов с верифицированным РПЖ асимметрия ($n=9$; 47%), наличие гипоехогенных зон ($n=9$; 53%) и нечеткие контуры ($n=5$; 29%) предстательной железы прослеживались чаще, чем в других исследуемых группах. Таким образом, по данным ТРУЗИ, подозрение на злокачественное новообразование возникло у 12 (70%) больных.

Из биоптатов были выделены образцы ($n=31$) тотальной РНК, для которых в дальнейшем определяли уровни экспрессии мРНК TRF1 и MMP-7, а также β -актина (который как конститутивный ген использовался в качестве внутреннего стандарта) с помощью полуколичественного метода после проведения совмещенных реакций обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

По характеру заболевания биоптаты были разделены на 3 группы: норма ($n=3$), ДГПЖ ($n=12$) и РПЖ ($n=17$). Группу РПЖ, в свою очередь, подразделяли на 3 подгруппы в зависимости от стадии развития и степени дифференцировки опухоли. В соответствии со стадией развития РПЖ по классификации TNM распределение пациентов было следующим: I стадия — 3; II — 7; III–IV стадии — 7 больных. Число пациентов в зависимости от степени дифференцировки составило: ВДР РПЖ (сумма баллов по шкале Глисона 1+2) — 3, УДР (3+3 и 3+4) — 7 и НДР (4+4) — 7 пациентов. РНК выделяли методом, предложенным P. Chomczynski и N. Sacchi [16] с некоторыми модификациями. Растворы РНК хранили в морозильной камере при температуре -70°C .

Концентрацию полученных растворов РНК измеряли с помощью спектрофотометра GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания) по поглощению при длине волны 260 нм. Чистоту РНК определяли по отношению поглощений при длинах волн 260, 280 и 230 нм (отношение $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$; $A_{260}/A_{230} > 2$).

Для оценки качества выделенной РНК проводили электрофорез образцов (по 1 мкг) в 1,5% агарозном геле. После осуществления электрофореза гель окрашивали с помощью красителя SYBRGreen II (Sigma, США) — 8 мкл на 40 мл геля с экспозицией 40 мин. Целостность РНК определяли визуально при облучении геля на ультрафиолетовом (УФ) трансиллюминаторе по наличию 2 субъединиц (28S и 18S) рибосомальной РНК.

Уровни экспрессии мРНК TRF1 и MMP-7 оценивали полуколичественным методом после проведения совмещенных реакций ОТ и ПЦР. ОТ осуществляли в 25 мкл реакционной смеси, приготовленной на обработанной DEPC деионизированной стерильной воде и содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween-20, 4 мМ MgCl, 1 мМ каждого дезоксирибонуклеозидфосфата (dNTP), 3,2 мкг гексамерных праймеров со случайной последовательностью, 10 мМ дитиотреитола, 10 ед. ингибитора рибонуклеаз (Fermentas, Литва), 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы M-MLV (Sigma, США), 1 мкг РНК. Смесь инкубировали при температуре 42°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали путем денатурации обратной транскриптазы посредством выдерживания смеси при температуре 94°C в течение 10 мин. Полученную кДНК амплифицировали методом ПЦР с использованием специфических праймеров на исследуемые РНК-матрицы, последовательности которых были взяты из научных статей: TRF1 — сенси 5'-TGTGCGGATGGTAGGGATGC-3', антисенси 5'-GGGCTGATCCAAGGGTGTGA-3' (размер амплифицируемого фрагмента 421 п.н. [17]); MMP-7 — сенси 5'-TCTTTGGCCTACCTATAACTGG-3', антисенси 5'-CTAGACTGCTACCATCCGTC-3' (420 п.н. [18]); β -актин — сенси 5'-CTCACCATGGATGATGATAT-3', антисенси 5'-TGGGTCATCTTCTCGCGGTT-3' (368 п.н. [19]). Все праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Реакцию амплификации проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween-20, 1,5 мМ MgCl, 0,2 мМ каждого dNTP, 15 пкмоль каждого из пары праймеров, 2,5 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы («Диалат», Россия), 5 мкг кДНК.

Число циклов ПЦР подбирали для исследуемых кДНК на основании экспоненциальных кривых выхода ПЦР-продукта. Так, для TRF1 количество циклов составило 34, для MMP-7 — 33, для β -актина — 29.

Характеристика температурных режимов, применяемых для проведения ПЦР

Цикл	Амплификация кДНК		
	TRF1	MMP-7	β -актин
Первый	94°C — 3 мин	94°C — 3 мин	94°C — 3 мин
	54°C — 2 мин	55°C — 2 мин	57°C — 2 мин
	72°C — 3 мин	72°C — 3 мин	72°C — 3 мин
Последующие	94°C — 1 мин	94°C — 1 мин	94°C — 1 мин
	54°C — 1 мин	55°C — 1 мин	57°C — 1 мин
	72°C — 1 мин	72°C — 1 мин	72°C — 1 мин
Последний	94°C — 1 мин	94°C — 1 мин	94°C — 1 мин
	54°C — 1 мин	55°C — 1 мин	57°C — 1 мин
	72°C — 7 мин	72°C — 7 мин	72°C — 7 мин

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле и 0,1М буфере TBE. Образцы вносили в лунки геля в объеме 10 мкл. Визуализацию разделенных продуктов осуществляли на УФ-трансиллюминаторе после выдерживания геля в высокочувствительном красителе SYBRGreen I (Sigma, США) — 8 мкл на 40 мл геля с экспозицией 40 мин.

Гель снимали на цифровую фотокамеру Kodak с выдержкой 1 с и проводили анализ изображения на компьютере с помощью программы ImageJ.

Для полуколичественной оценки уровня экспрессии мРНК TRF1 и MMP-7 измеряли интенсивность свечения в геле ПЦР-продуктов (фрагменты TRF1, MMP-7 и β-актина). После этого определяли отношение интенсивности свечения исследуемого фрагмента к интенсивности свечения фрагмента β-актина (TRF1/β-актин и MMP-7/β-актин).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью непараметрического t-критерия Манна–Уитни [20]. Данный критерий был выбран в связи с отсутствием нормального распределения и небольшим размером изучаемой выборки.

Результаты и обсуждение

При исследовании содержания общего ПСА (PSA_{общ.}) в сыворотке крови было обнаружено, что у 3 пациентов с различными стадиями РПЖ уровень PSA_{общ.} находился в пределах ≤10, а у 7 — > 10 нг/мл. Среди 3 больных с уровнем PSA_{общ.} ≤10 нг/мл 2 образца относились к группе УДР, 1 — к группе НДР РПЖ. У остальных 7 пациентов данные по этому показателю отсутствовали. На рис. 1 представлены средние значения и медианы PSA_{общ.} для групп ВДР, УДР и НДР РПЖ. Как видно из рис. 1, уровень PSA_{общ.} в группе УДР был достоверно ниже, чем в группах ВДР и НДР РПЖ (p ≤ 0,05). Таким образом, чувствительность ПСА в отношении РПЖ составила 70%.

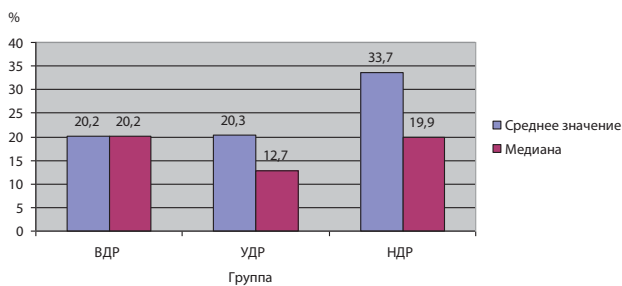


Рис. 1. Характеристика уровня PSA_{общ.} в исследуемых группах пациентов

Данные литературы, касающиеся TRF1 и MMP-7, свидетельствуют о том, что TRF1 и MMP-7 являются перспективными маркерами различных онкозаболеваний. В связи с этим были определены уровни

экспрессии мРНК TRF1 и MMP-7 клетками, полученными из биоптатов предстательной железы пациентов с ДГПЖ, различными стадиями и степенями дифференцировки РПЖ, а также больных, не имеющих видимых заболеваний предстательной железы (норма), и индекса отношения уровней экспрессии TRF1/MMP-7. Для анализа уровня экспрессии описанных выше онкомаркеров в качестве конститутивного гена использовали β-актин. На рис. 2 показан пример электрофоретического разделения ПЦР-продуктов фрагментов генов, кодирующих TRF1, MMP-7 и β-актин.

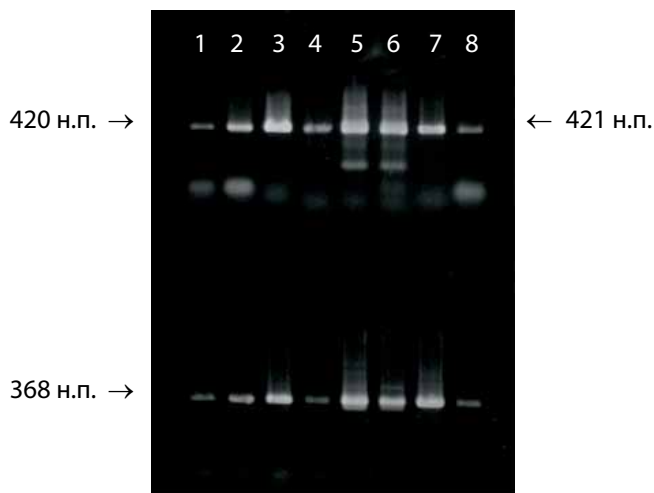


Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения ПЦР-продуктов фрагментов генов, кодирующих TRF1 (1, 2, 3, 7 и 8, верхний ряд), MMP-7 (треки 4, 5 и 6, верхний ряд) и β-актин (треки 1–8, нижний ряд). Исследуемые патологии: норма (треки 1–3) и ДГПЖ (треки 4–8)

Показано достоверное отличие уровней экспрессии TRF1 и MMP-7 в группах норма-ДГПЖ и норма-РПЖ (p ≤ 0,05). Между группами ДГПЖ и РПЖ не выявлено достоверного различия в уровнях экспрессии исследуемых маркеров (рис. 3). Несоответствие значений индекса и уровней экспрессии исследуемых маркеров объясняется различным количеством биоптатов, составивших ту или иную выборку, а также отсутствием экспрессии исследуемых маркеров в некоторых образцах.

Статистический анализ уровней экспрессии TRF1 показал достоверное отличие между группами норма-ВДР и ДГПЖ-ВДР (p ≤ 0,05, рис. 4а).

Следует отметить, что между теми же исследуемыми группами наблюдалось статистически достоверное различие в уровне экспрессии мРНК MMP-7 (p ≤ 0,05, рис. 4б).

Для групп норма, ДГПЖ, ВДР, УДР и НДР был рассчитан индекс отношения уровней экспрессии TRF1/MMP-7. Продемонстрировано статистически достоверное различие (p ≤ 0,05) между группами

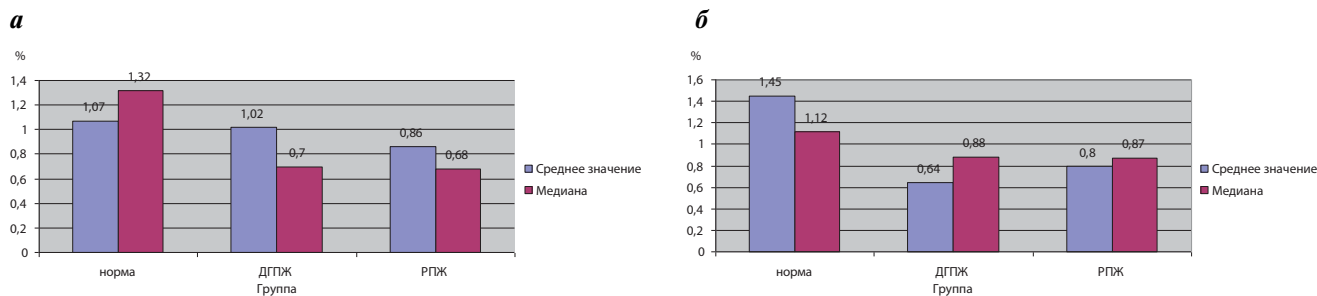


Рис. 3. Характеристика относительных уровней экспрессии TRF1 (а) и MMP-7 (б) в исследуемых группах пациентов

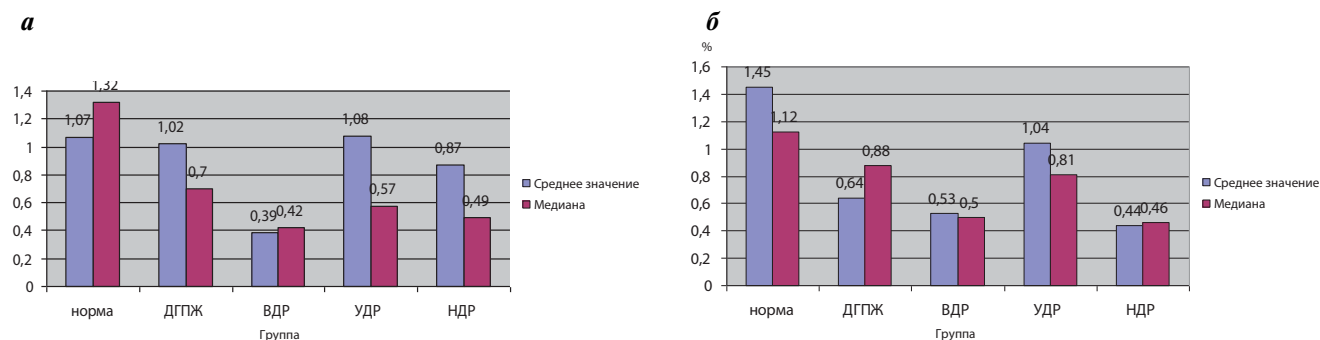


Рис. 4. Статистический анализ относительных уровней экспрессии TRF1 (а) и MMP-7 (б) в исследуемых группах пациентов

норма-ДГПЖ, норма-ВДР и ДГПЖ-ВДР в значениях индекса TRF1/MMP-7 (рис. 5). Также наблюдалось статистически достоверное снижение значения индекса TRF1/MMP-7 с уменьшением степени дифференцировки опухоли (от ВДР к НДР) до значений, сопоставимых с уровнями экспрессии указанных выше маркеров в группе норма ($p \leq 0,05$). Это позволяет надеяться на высокую диагностическую ценность индекса TRF1/MMP-7 в отношении определения ранних стадий РПЖ.

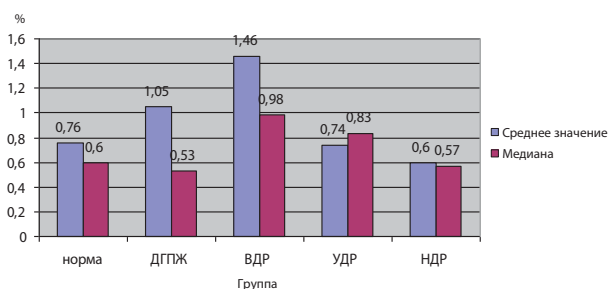


Рис. 5. Характеристика индекса TRF1/MMP-7 в исследуемых группах пациентов

Таким образом, с учетом полученных результатов можно предположить, что существует взаимосвязь между снижением уровней экспрессии TRF1 и MMP-7 и неблагоприятным течением РПЖ.

Выводы

1. Проанализированы относительные уровни экспрессии мРНК TRF-1 и MMP-7 клетками, полученными из биоптатов предстательной железы пациентов с ДГПЖ, РПЖ и здоровых мужчин, не имевших видимых заболеваний предстательной железы, и рассчитан индекс отношения уровней экспрессии TRF1/MMP-7 для указанных выше патологий.

2. Установлено статистически достоверное различие уровней экспрессии TRF1, MMP-7 и индекса TRF1/MMP-7 в группах норма-ВДР и ДГПЖ-ВДР, что может свидетельствовать о высокой диагностической значимости данных маркеров в отношении определения ранних стадий РПЖ и позволит клиницистам проводить более точную диагностику пациентов с различными урологическими заболеваниями.

3. Благодаря проведенному исследованию уровней экспрессии мРНК TRF1 и MMP-7, определению индекса TRF1/MMP-7 и сравнению их с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания появилась возможность не только отличить норму от таких заболеваний предстательной железы, как ДГПЖ и РПЖ, но и выделить различные стадии развития опухолевого роста (в том числе ранние), что может стать критерием дифференциального подхода, используемого при диагностике новообразований предстательной железы, и будет способствовать повышению эффективности лечения больных РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Братчиков О.И., Ильченко В.А., Шумакова Е.А., Бабанко В.В. Некоторые аспекты диагностики и лечения рака предстательной железы. В сб.: Материалы I конгресса РООУ. М., 2006.
2. Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями мочевых и мужских половых органов в России в 2003 г. Онкоурология 2005;(1):6–9.
3. Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Матвеев В.Б. Рак предстательной железы. М., 1999.
4. Рак предстательной железы. Под ред. Н.Е. Кушлинского, Ю.Н. Соловьева, М.Ф. Трапезниковой. М.: РАМН, 2002.
5. Глухов А.И., Гордеев С.А., Апрятин С.А., Северин С.Е. Теломераза: клеточное старение, иммортализация и рак. Вестник НИИ молекулярной медицины. М.: Русский врач, 2006; вып. 6.
6. Angèle S., Falconer A., Foster C.S. et al. ATM protein overexpression in prostate tumors: possible role in telomere maintenance. *Am J Clin Pathol* 2004;121:231–6.
7. Cong Y.-S., Wright E.W., Shay W.J. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:407–25.
8. William C., Hahn J. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *Clin Oncol* 2003;21:2034–204.
9. Yamada M., Tsuji N., Nakamura M. et al. Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Res* 2002;22(6):3303–7.
10. Апрятин С.А., Пульбере С.А., Авдошин В.П. и др. Исследование фактора роста эндотелия сосудов человека и рецепторов к нему как перспективных генетических маркеров диагностики новообразований предстательной железы. *Вопр биол мед фарм хим* 2007;(3):32–8.
11. Lawrence T., Hageman T., Balkwill F. Cancer, sex, cytokines and cancer. *Science* 2007;317:51–2.
12. Patherson B.C. Sang Q.A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 1997;272(46):28823–5.
13. Cardillo M.R., Di Silverio F., Gentile V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Res* 2006;26:973–82.
14. Littlepage L.E., Sternlicht M.D., Rougier N. et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer Res* 2010;70:2224–34.
15. Ii M., Yamamoto H., Adachi Y. et al. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med* 2006;231:20–7.
16. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
17. Fugimoto R., Kamata N., Taki M. et al. Gene expression of telomerase related proteins in human normal oral end ectocervical epithelial cells. *Oral Oncol* 2003;39(5):445–52.
18. Yamamoto H., Horuichi S., Adachi Y. et al. Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2004;25(3):325–32.
19. Choy M.Y., Siu S.N., Leung T.N., Lau T.K. Human decidua production of hepatocyte-growth factor is not influenced by trophoblastic invasion in vivo. *Fertil Steril* 2004;82(3):1220–5.
20. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999.