

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ П. А. ГЕРЦЕНА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
125284, Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3

**ДИАГНОСТИКА И ПРОГНОЗ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАКТОРОВ РОСТА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ**

Медицинская технология

Москва 2013

УДК 616.65-006.6-037-091.8 ББК 55,6 Д 44

Алексеев Б.Я., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. и др. Диагностика и прогноз при раке предстательной железы с использованием факторов роста и молекулярно-генетических маркеров.

М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России.-2013.-12 с. ISBN 978-5-85502-185-1

Технология диагностики и прогноза при раке предстательной железы включает определение факторов роста (HGF), (VEGF) и профиля метилирования генов N33 и GSTP1 в биопсийных образцах предстательной железы.

Технология позволяет уточнить степень распространения опухолевого процесса в предстательной железе, прогнозировать дальнейшее течение, выявлять потенциально агрессивные формы рака предстательной железы, а также проводить дифференциальную диагностику между раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы.

Медицинская технология предназначена для врачей-онкологов, урологов и может быть использована в онкологических учреждениях с лабораторией оснащенной соответствующим оборудованием, получивших лицензию на проведение данного вида диагностических процедур.

Учреждение-разработчик: ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России.

Авторы: проф. Б.Я. Алексеев, докт. мед. наук Ю.Ю. Андреева, докт. биол. наук Л.Э. Завалишина, канд. мед. наук П.В. Шегай, канд. мед. наук Т.В. Кекеева.

Рецензенты: первый зам. директора по научной работе ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России канд. мед. наук А.В. Сивков; зав. отделением урологии ФГБУ «РНЦРР» Минздрава РФ докт. мед. наук С.А. Иванов.

Ответственный за издание: профессор В.В. Старинский

ISBN 978-5-85502-185-1 © Коллектив авторов, 2013 г.

© ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Москва, 2013 г.

Все права авторов защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема диагностики и лечения рака предстательной железы (РПЖ) является наиболее актуальной в современной онкоурологической практике. Это обусловлено прежде всего продолжающимся увеличением заболеваемости.

В России в 2011 г. зарегистрировано 19657 новых случая РПЖ, причем заболеваемость составила 33,3 на 100000 мужского населения. На долю опухолей предстательной железы приходится 8,2% всех злокачественных новообразований у мужчин, занимая 4-е место. По величине прироста показателя заболеваемости в России РПЖ занимает 1-е место за период 2000-2010гг. (136,86%). Смертность от РПЖ составила 11,61 на 100000 мужского населения. Столь широкое распространение РПЖ ставит это заболевание в ряд наиболее важных социальных проблем современности [1].

Простатспецифический антиген (ПСА) является одним из самых исследованных и широко применяемых биомаркеров ранней диагностики РПЖ. Однако Г1СА имеет ряд серьезных недостатков, в частности, причиной повышения уровня ПСА может быть не только РПЖ, но и доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ), хронический и острый простатит, массаж железы, эякуляция, биопсия, что свидетельствует о невысокой специфичности метода. Кроме того, в 20-40% случаев РПЖ уровень ПСА не превышает принятую в настоящее время норму 4 нг/мл. В этой связи многими специалистами было предложено снизить пороговое значение ПСА с 4 до 2,5 нг/мл, что привело к выявлению относительно благоприятных опухолей – небольших и высокодифференцированных, представляющих невысокий риск для жизни и здоровья пациента [2]. Клинически эти опухоли трудно дифференцировать имеющимися в арсенале уролога средствами, поэтому в большинстве случаев применяют агрессивное лечение даже относительно благоприятного РПЖ.

Применение ПСА в сочетании с трансректальной мультифокальной биопсией предстательной железы под ультразвуковым контролем позволяет увеличить выявляемость РПЖ на ранних стадиях, а также дает возможность на дооперационном этапе определить агрессивность и распространенность опухоли. Однако при биопсии часто недооцениваются злокачественность и степень распространенности опухолевого процесса в предстательной железе.

Для определения тактики ведения больного с локализованным РПЖ важное значение имеет не только своевременная диагностика, но и возможность прогнозировать дальнейшее течение и выявлять потенциально агрессивные формы РПЖ [3]. Очевидна необходимость поиска и внедрения в клиническую практику новых, более чувствительных, специфичных и прогностически эффективных маркеров РПЖ.

За последние годы ситуация существенно изменилась, так как увеличилось количество публикаций, свидетельствующих о том, что молекулярно-биологическая диагностика занимает все более прочное место в онкологии. Так, морфологический анализ может быть значительно улучшен путем использования иммуногистохимического окрашивания для некоторых маркеров РПЖ

(высокомолекулярный цитокератин, P63, AMACR, калликреины, PSMA, Ki-67, андрогеновый рецептор, генные слияния, PTEN, SPINK1/TATI, метилирование ДНК и т.д.) [4-14].

В МНИОИ им. П. А. Герцена для диагностики и прогноза при раке предстательной железы наряду с клинико-морфологическими критериями используют факторы роста и молекулярно-генетические маркеры, исследование которых определяет лечебную тактику.

ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

1. ДГПЖ легкой или средней степени.
2. Рак предстательной железы II стадии T1c-T2c.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

1. Невозможность выполнить биопсию предстательной железы.
2. Предшествующая системная химиотерапия или лучевая терапия на область предстательной железы.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

1. Лаборатория стандартно оборудованная для проведение ПЦР и ИФА.
2. Реактивы для пробоподготовки (Tris-HCl, додецилсульфат натрия (SDS), ацетат натрия, ксилол, этанол, протеиназа К, фенол, хлороформ, изоамиловый спирт, изопропанол, Tween 20, деионизированная вода), для проведения ПЦР (ПЦР-буфер с 5мМ хлоридом магния, раствор дезоксирибонуклеотидов, Taq-полимераза, праймеры), для электрофореза и окраски ПААГ (акриламид, N,N-метиленабисакриламид, персульфат аммония, TEMED, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), борная кислота, Tris-основной, нитрат серебра, формалин, гидроксид натрия, формамид, мочевины).
3. Праймеры для амплификации участков промоторных областей генов N33HGSP1.
4. Стандартные наборы реактивов для иммуноферментного анализа «Quantikine human HGF Immunoassay» (cat. Number DHGOO), «Quantikine human EGF Immunoassay» (cat. Number DEGOO) «Quantikine human VEGF Immunoassay» (cat. Number DVEOO), производитель «R&D systems, Inc.» (USA).
5. Ридер-спектрофотометр «Bio-Rad», модель 680, с фильтрами 450 нм в качестве основного и 570 нм в качестве корректирующего.

ОПИСАНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Больным проводят стандартное общеклиническое обследование, включающее сбор анамнеза, физикальное обследование, исследование клинических анализов крови и мочи, биохимического анализа крови, ЭКГ. Обязательным методом обследования является пальцевое ректальное исследование (ПРИ), которое наряду с трансректальным ультразвуковым исследованием (ТРУЗИ) расценивают как основной метод определения клинической стадии РПЖ в отношении распространенности опухоли ПЖ. Выполняют УЗИ брюшной полости и забрюшинного пространства, а также ТРУЗИ ПЖ и органов малого таза. Уровень ПСА в сыворотке крови определяют не ранее чем через 28 дней после биопсии ПЖ. Для определения распространенности опухолевого процесса и исключения отдаленного метастазирования проводят сцинтиграфию скелета и рентгенографию легких.

Забор биологического материала

Для определения уровня ПСА производят забор крови из локтевой вены одноразовой иглой в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа «Venoject» (с ЭДТА). При заборе в шприц кровь переносят в одноразовую пробирку с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:19 или 3,8% раствор цитрата Na в соотношении 1:9, гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя). Пробирку с кровью до исследования хранят в холодильнике при температуре от +4°C до +8°C не более 2 суток.

Для уточняющей диагностики РПЖ применяют мультифокальную биопсию. Пункцию предстательной железы производят при помощи автоматической системы для пункционной биопсии, состоящей из биопсийного пистолета PRO-MAG 2,5 и одноразовых биопсийных игл типа True-cut 18G. Пункцируют различные отделы предстательной железы из 6-12 точек, в зависимости от клинической ситуации. Помимо забора образцов ткани из стандартных мест (основание, средняя часть и верхушки обеих долей) проводят биопсию периферических отделов Л Ж; в ряде случаев пунктируют переходную зону. Биопсию выполняют под контролем ТРУЗИ.

Полученные столбики ткани помещают в отдельные нумерованные контейнеры для определения распространения патологического процесса в различных областях предстательной железы. Необходимо отметить, что столбики для молекулярно-генетического исследования забирают из зоны подозрительной на РПЖ. Сразу после биопсии их замораживают и хранят в жидком азоте.

Определение аномального метилирования CpG-островков промоторных областей N33 и GSTP1 генов

Для определения метилирования CpG-островков промоторных областей исследуемых генов применяют метод метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований и

оставлять негидролизованной участки, содержащие метилцитозин. В качестве матрицы для ПЦР используют ДНК, полученную из материала биоптата или соскоба ткани шейки матки, предварительно гидролизованную метилчувствительной рестриктазой HpaII (CCGG).

При проведении ПЦР учитывают наличие внутренних сайтов узнавания для HpaII в амплифицируемом участке. В случае, если произошла модификация цитозинов в метилцитозин (аномальное метилирование), гидролиза ДНК не происходит, и продукт ПЦР определенной молекулярной массы, соответствующий каждому гену, может быть выявлен в геле. При отсутствии аномального метилирования ДНК полностью гидролизуется и продукт ПЦР не определяется. В качестве контроля реакции ПЦР используют специфические праймеры на фрагмент гена XLISS, который не содержит сайтов узнавания для фермента HpaII.

Многолокусную ПЦР проводят для двух пар праймеров (исследуемый ген и контроль). Используют следующую схему: к 2 мкл гидролизованной ДНК (50-200 нг), полученной из ткани, добавляют по 0,05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1-2 единицы Taq-полимеразы, 50 мкл однократного буфера для ПЦР (50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl pH 8,4; 5 мМ MgCl₂, 10% DMSO). К полученной смеси добавляют 2 капли вазелинового масла, прогревают смесь при 95°C в течение 10 мин и проводят 33 цикла с параметрами: денатурация 95°C – 30 с, отжиг и элонгация 58-62°C – 2 мин 30 с. Нуклеотидная последовательность праймеров и режимы отжига представлены в табл. 1. После окончания реакции ПЦР продукт хранят при 4°C в холодильнике.

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность праймеров

Ген	Праймеры	Температура отжига, °C
N33	F: tgg gtt cag age agg atg gc R: gca gga gaa gga agg gaa age	60
GSTP1	F: acc tgg gaa aga ggg aaa ggc tt R: gaa gac tgc ggc ggc gaa act	60
Контроль XL3.2	F: ttg get age age aac agt gc R: agt ttg atg get tct gtg at	60

Твердофазный иммуоферментный анализ

Количественное содержание растворимых факторов роста HGF и VEGF в гомогенате биоптатов ткани предстательной железы определяют с помощью твердофазного иммуоферментного анализа. Исследование выполняется с помощью стандартных наборов реактивов для иммуоферментного анализа «Quantikine human HGF Immunoassay» (cat. Number DHG00), «Quantikine human EGF Immunoassay» (cat. Number DEG00) «Quantikine human VEGF Immunoassay» (cat. Number DVE00),

производитель «R&D systems, Inc.» (USA). Анализ осуществляют по стандартному протоколу. В основе количественного определения лежит колориметрический тест – измерение оптической плотности цветового продукта реакции пероксидазы, конъюгированной с поликлональными антителами к искомому фактору роста, с перекисью водорода и гетраметилбензидином. Оптическую плотность определяют на ридере-спектрофотометре «Bio-Rad», модель 680, при использовании фильтров 450 нм в качестве основного и 570 нм в качестве корректирующего. Определение искомых концентраций вычисляется автоматически на основе сравнений со стандартной кривой.

Интерпретация результатов исследования

Для интерпретации результатов исследования и определения лечебной тактики нами сформулирован лечебно-диагностический алгоритм с использованием факторов роста и молекулярно-генетических маркеров (табл. 2).

Таблица 2

Лечебно-диагностический алгоритм с использованием факторов роста и молекулярно-генетических маркеров

Диагноз	Стандартное исследование	Опухолевые маркеры (гомогенат)	Лечебно-диагностический алгоритм действий
ДГПЖ или ПИН (легкой и средней степени)		GSTP1 и N33 метилированы	Повторная мультифокальная биопсия ПЖ через 1,5 мес.
		GSTP1 и N33 не метилированы	Динамическое наблюдение, мониторинг ПСА
Рак предстательной железы Т1b-Т2c	ПСА < 10 нг/мл Глисон < 6	VEGF < 190 пг/мл HGF < 170 пг/мл	Низкий риск экстракапсулярной инвазии: тщательное наблюдение брахитерапия нервосберегающая радикальная простатэктомия (РПЭ) дистанционная лучевая терапия (ДЛТ)
		VEGF < 190 пг/мл HGF > 170 пг/мл	Высокий риск экстракапсулярной инвазии и лимфогенного метастазирования: РПЭ + расширенная лимфаденэктомия ДЛТ + тазовая лимфаденэктомия длт+гт
		VEGF > 190 пг/мл HGF < 170 пг/мл	
		VEGF > 190 пг/мл HGF > 170 пг/мл	

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможны ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Для снижения риска получения ложноположительных и ложно-отрицательных результатов необходимо строго соблюдать регламент 8 забора биологического материала и проведения ИФА, ПЦР, электрофореза и окрашивания геля.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

В 2004-2007 гг. в отделении онкоурологии МНИОИ им. П.А. Герцена технология определения содержания факторов роста и молекулярно генетических маркеров в биопсийном материале предстательной железы применена у 115 больных, которым выполняли мультифокальную биопсию. Среди них у 91 больного выявлен РПЖ, у 24 – ДППЖ. Группы больных были статистически достоверно сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$).

Средний возраст больных РПЖ составил 64 года (46-75 лет). При анализе распределения больных в зависимости от уровня общего ПСА в доминантной группе (55%) уровень сывороточного ПСА составил менее 20 нг/мл, среднее значение 14,5 нг/мл, медиана уровня ПСА 10,59 нг/мл (интерквартильный размах от 7,11 до 21,3 нг/мл), медиана плотности ПСА – 0,25 нг/мл/см³ (интерквартильный размах от 0,13 до 0,61 нг/мл/см³).

Распределение оперированных больных РПЖ по патоморфологической стадии представлено в таблице 3.

Таблица 3.

Распределение больных РПЖ в зависимости от патоморфологической стадии РПЖ

Стадия	TNM	Количество больных	
		абс.	%
II	pT2a-2eN0M0	11	12%
	pT2cN0M0	32	35%
III	pT3aN0M0	24	27%
	pT3вШМО	7	8%
IV	pT2cN1M0	1	1%
	pT3aN1M0	3	3%
	pT3вШМО	13	14%
Всего:		91	100%

Распределение больных РПЖ в зависимости от степени дифференцировки опухоли по шкале Глисона на основании патоморфологического исследования послеоперационного материала представлено в табл. 4.

Таблица 4

Распределение больных РПЖ по степени опухолевой дифференцировки

Сумма баллов по шкале Глисона	Количество больных	
	абс.	%
2-4	11	12
5-6	47	47
7	11	11
8-10	3	3
Гормональный патоморфоз	19	21
Всего:	91	100

При сравнении до- и послеоперационной суммы баллов по Глисона группы больных были статистически сопоставимы по степени дифференцировки ($p > 0,05$).

Диагноз ДГПЖ установлен у 24 больных по результатам мультифокальной биопсии. Средний возраст больных составил 67 лет (51-76 лет). Значение общего ПСА превышало 20 нг/мл только в 1 (5,7%) случае. Среднее значение ПСА составляло 11 нг/мл (1-21,9 нг/мл), а медиана уровня ПСА – 10,6 нг/мл (интерквартильный диапазон – 7,1 – 15,7 нг/мл).

В образцах ткани, полученных у больных при РПЖ и ДГПЖ, концентрация факторов роста достоверно различалась. У больных РПЖ медиана уровня HGF составила 1162,6 пг/мл, у больных ДГПЖ – 104,85 пг/мл ($p < 0,001$); медиана уровня VEGF в группе РПЖ составила 606,5 пг/мл, в группе ДГПЖ – 148,6 пг/мл ($p < 0,001$).

Уровень экспрессии факторов роста достоверно коррелировал с такими характеристиками опухолевого процесса, как экстракапсулярная инвазия (ЭИ), наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, уровень сывороточного ПСА, процент «положительных» биоптатов, степень дифференцировки по шкале Глисона. Концентрация VEGF является наиболее прогностически значимым фактором в прогнозе ЭИ 10 опухоли ПЖ (коэффициент корреляции = 0,54; $p < 0,001$), а уровень HGF для метастатического поражения лимфатических узлов (коэффициент корреляции = 0,51; $p < 0,001$).

Уровень экспрессии HGF сильно коррелировал с применением медикаментозной кастрации (коэф. корреляции = 0,57; $p < 0,001$), что свидетельствует об андрогеннезависимой регуляции этого фактора роста в развитии РПЖ.

Частота метилирования генов GSTP1 и N33 при РПЖ достоверно выше, чем при ДГПЖ ($p = 0,005$ и $p = 0,013$ соответственно).

Чувствительность определения метилирования для GSTP1 составила 41%, для N33 – 19%, а специфичность для GSTP1 – 87%, для N33 – 100%.

Разработанная технология и лечебно-диагностический алгоритм позволяют индивидуализировать раннюю диагностику РПЖ и прогноз течения заболевания на основе определения содержания факторов роста (VEGF, HGF) и профиля метилирования генов опухолевой супрессии (GSTP1, N33) для выбора тактики лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) // под редакцией В. И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П. А. Герцена» Минздрав-соцразвития России, – 2012.
2. Онкология национальное руководство // под редакцией В.И. Чиссов, М.И. Давыдов, Г.А. Франк, С.Л. Дарьялова – М., 2008.
3. Молекулярно-генетические маркеры в онкоурологии. – Т.В. Кекеева, Б.Я. Алексеев, П.В. Шегай, О.А. Кузнецова, С.В. Башкатов, Р.В. Курынин, А.М. Попов, О.П. Попова, Ю.Ю. Андреева, М.Э. Еникеев, Ю.Г. Аляев, О.Б. Карякин, И.Г. Русаков, Г.А. Франк, Д.В. Залетаев // Молекулярная медицина. – Москва, 2007, № 3, стр. 43-54.
4. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor urine levels as predictors of outcome in hormone-refractory prostate cancer patients. Bok RA, Halabi S, Fei DT, et al. // Cancer Res 2001; 61: 2533-2566.
5. Анализ молекулярно-генетических изменений при раке предстательной железы. – Т.В. Кекеева, Б.Я. Алексеев, П.В. Шегай, М.В. Немцова, В.В. Стрельников, Е.Б. Кузнецова, О.В. Бабенко, М.А. Иванов, О.П. Попова, Ю.Ю. Андреева, Л.Э. Завалишина, И.Г. Русаков, Г.А. Франк, Д.В. Залетаев// Вестник НИИ молекулярной медицины. – Москва, 2007, №7, стр. 23-41.
6. False positive labeling of prostate cancer with high molecular weight cytokeratin: p63 a more specific immunomarker for basal cells. – Ali TZ, Epstein JI. Am J Surg Pathol 2008; 32: 1890-5.
7. Basal cell cocktail (34betaE12 _ p63) improves the detection of prostate basal cells. – Zhou M, Shah R, Shen R, Rubin MA. Am J Surg Pathol 2003; 27: 365-71.
8. Alpha-methylacyl-CoA racemase: A variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. – Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Am J Surg Pathol 2003; 27: 1128-33.
9. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A novel prostate cancer marker. – Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CY, et al. Urology 1997;49:857-62.). В работе (Lintula S, Stenman J, Bjartell A, Nordling S, Stenman UH. Relative concentrations of hK2/PSA mRNA in benign and malignant prostatic tissue. Prostate 2005; 63: 324-9.
10. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. – Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Moller P, et al. Hum Pathol 2007; 38: 696-701.
11. Ki-67 and outcome in clinically localized prostate cancer: Analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. – Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, Foster CS, et al. Br J Cancer 2009; 100: 888-93.
12. Androgen receptor expression is associated with prostate cancer-specific survival in castrate patients with metastatic disease. – Donovan MJ, Osman I, Khan FM, Vengrenyuk Y, Capodiceci P, Kosciuszka M, et al. BJU Int 2010; 105: 462-7.
13. Phosphatidylinositol 30-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. – Lee JT Jr, Steelman LS, McCubrey JA. Cancer Res 2004; 64: 8397-404.
14. Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer. – Leinonen KA, Tolonen TT, Bracken H, Stenman UH, Tammela TL, Saramaki OR, et al. Clin Cancer Res 2010; 16: 2845-51.