

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Балахнин С.М., Овсянко Е.В., Осташевский В.А., Бакарев М.А.

ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru

Проанализировано значение эпигенетических факторов в развитии рака предстательной железы. Широкое применение теста на простатический специфический антиген привело к повышению частоты ранней диагностики рака предстательной железы. Однако в связи с низкой специфичностью и чувствительностью данного метода сохраняется актуальность поиска новых биохимических маркеров для скрининговой диагностики. Одним из направлений такого поиска является исследование нарушений механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов, в частности процесса метилирования ДНК – одного из самых значимых сигналов в клетках живого организма. Другим достаточно хорошо изученным механизмом эпигенетического контроля является модификация гистонов путем ацетилирования. Эти два процесса – метилирование ДНК и ацетилирование гистонов – могут по отдельности или совместно изменять экспрессию генов. При исследовании опухолевых клеток *in vitro* комбинированное применение ингибиторов ДНК-метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз более эффективно восстанавливало эпигенетическое блокирование транскрипции генов.

Ключевые слова: рак предстательной железы, эпигенетические факторы, метилирование ДНК, ацетилирование гистонов

EPIGENETIC MARKERS OF PROSTATE CANCER

Balakhnin S.M., Ovsyanko E.V., Ostashevskiy V.A., Bakarev M.A.

Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru

We have analyzed the significance of epigenetic factors in the development of prostate cancer. The widespread use of prostate-specific antigen test has led to an increased detection of prostate cancer at earlier stages. However, due to its lack of specificity and sensitivity, there is an urgent need for some more specific biochemical markers applicable in the early diagnosis or screening of prostate cancer. One promising direction to look for is the aberrant epigenetic regulation in cancer and its main mechanisms – DNA methylation, the key element of cell signaling, and histone acetylation – the two processes which, separately or in combination, can induce changes in gene expression. It was shown that DNA methyltransferase and histone acetylase inhibitors worked synergistically in reversing epigenetic block of gene transcription in cancer cells *in vitro*. Identification of characteristic epigenetic abnormalities in the functioning of genes, leading to the initiation of neoplastic lesions of the prostate gland, is of great importance for the development of new anticancer drugs (epigenetic modulators) capable of stopping the tumor growth in the early phases.

Keywords: prostate cancer, epigenetic factors, DNA methylation, histone acetylation

Простатический специфический антиген (PSA) был впервые обнаружен в 1960 г. и с середины 1980-х гг. применяется для скрининга рака предстательной железы (РПЖ). Однако сам по себе PSA не является специфичным биомаркером РПЖ. Этот белок, продукт гена *KLK3*, синтезируется в физиологических условиях эпителием простатических желез и является составной частью эякулята. Повышенное содержание PSA может регистрироваться в сыворотке крови при различных заболеваниях, связанных с повреждением эпителия, которое происходит как при воспалительных заболеваниях (простатитах) различной этиологии, так и при злокачественной или доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Только у 22% лиц, имеющих уровень PSA в сыворотке в пределах 4,0–9,9 нг/мл (норма 0–4,0 нг/мл), был выявлен РПЖ в ходе последующей биопсии [31]. Однако у 25% лиц с установленным РПЖ уровень этого антигена в крови не превышал допустимых значений

[34]. С возрастом риск возникновения РПЖ значительно увеличивается: в возрасте около 70 лет РПЖ гистологическим методом диагностируется у 60% мужчин, а после 80 лет – уже у 80% [6].

В связи с низкой чувствительностью и специфичностью PSA как маркера для скрининговой диагностики РПЖ поиск новых специфичных биохимических маркеров, позволяющих выявлять это злокачественное заболевание на ранних стадиях, не теряет актуальности. Одним из таких направлений является исследование нарушений эпигенетической регуляции экспрессии генов, в частности процессов метилирования ДНК – одного из самых значимых эпигенетических сигналов в клетках живого организма [30].

Модификация ДНК путем метилирования происходит в результате ковалентного присоединения CH_3 группы к цитозину в C^5 -положении, с образованием 5-метил-цитозина. При этом участки ДНК человека подвергаются метилированию в разной степени. Например, протяженные участки CpG-последовательностей, разделенные фосфатом, связывающим эти два нуклеотида, лишены метилирования [9]. Эти участки ДНК протяженностью около 1000 пар оснований, состоящие из CpG динуклеотидов, получили название CpG островков. Островки CpG (кластеры CpG) выявлены на промоторах приблизительно 60% генов человека и охватывают сайты начала их транскрипции. Гены с неметилированными CpG островками сохраняют способность отвечать на сигналы *trans*-активирующих факторов, регулирующих их экспрессию. В случае метилирования CpG островков способность гена к транскрипции блокируется.

Присоединение метильных групп к цитозиновым основаниям происходит при участии ДНК-метилтрансфераз (DNMTs): DNMT1, DNMT3A и DNMT3B. Считается, что DNMT1 обеспечивает тканеспецифическое метилирование в процессе клеточной репликации, а DNMT3A и DNMT3B вовлечены в поддержание метилирования ДНК и участвуют в метилировании нитей ДНК *de novo* [15]. Следует отметить, что степень метилирования ДНК может служить сигналом как позитивного, так и негативного контроля за активностью генов, поэтому изучение этого процесса имеет большое значение для понимания патогенетических механизмов канцерогенеза.

Гиперметилирование ДНК является отклонением, которое выявляется при некоторых злокачественных новообразованиях, в том числе и при РПЖ [22]. В результате гиперметилирования ДНК возникают условия, способствующие канцерогенезу, как следствие нарушения контроля клеточного цикла, гормонального ответа, клеточной адгезии. Канцерогенез рассматривается как многоступенчатый процесс, и гиперметилирование ДНК можно рассматривать как раннюю фазу на этапе инициации формирования РПЖ [23]. Гиперметилирование ДНК происходит при участии метилтрансфераз DNMT1, DNMT1b,

DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L [29].

Гиперметилирование CpG островков на промоторах приводит к блокированию экспрессии соответствующих генов, участвующих в опухолевой супрессии, репарации ДНК, а также в регулировании других важных клеточных механизмов. Наиболее изученным геном, функция которого изменяется путем метилирования при развитии РПЖ, является ген глутатион-S-трансферазы P1 – *GSTP1*. Этот ген кодирует фермент, ответственный за нейтрализацию свободных радикалов и оксидантов, вызывающих повреждения клеток и генома [21]. Гиперметилирование последовательностей, регулирующих транскрипцию гена *GSTP1*, выявляется более чем в 90% образцах РПЖ, что значительно выше процента выявления известных дефектов соматических генов. Первые сообщения об этом появились в 1994 г. [1]. Однако причины, по которым начинается процесс гиперметилирования регуляторных последовательностей гена *GSTP1*, до сих пор не известны.

Изменения функции глутатион-S-трансферазы фиксируют на 5–10% участков, поврежденных в результате так называемой пролиферативно-воспалительной атрофии, которая рассматривается как наиболее раннее предраковое состояние [27]. При интраэпителиальной неоплазии предстательной железы уже более чем в 70% поврежденных участков отсутствует активность глутатион-S-трансферазы [3].

Кроме гена *GSTP1*, выявлено еще около 40 генов, экспрессия которых блокируется эпигенетическим механизмом при РПЖ [1]. Гиперметилирование *GSTP1*, *APC*, *RASSF1a*, *COX2* и *MDR1* регистрируется как на ранних стадиях РПЖ, так и при его метастазировании. Гиперметилирование других генов (*ERα*, *hMLH1*, *p14/INK4a*) выявляется, как правило, только на поздних стадиях заболевания [38]. Гены, которые чаще других гиперметилированы при РПЖ: *GSTP1*, *RARB*, *CD44*, *RASSF1*, *MGMT*, *AR*, *ESR1,2*, *APS*, *DAB2IP*. Продукты генов *GSTP1* (глутатион-S-трансфераза) и *MGMT* (метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза) участвуют в репарации ДНК, гены *RARB*, *AR*, *ESR1,2* связаны с регуляцией гормонального ответа, гены *CD44*, *APS* связаны с метастазированием опухоли, а *RASSF1* и *DAB2IP* – с передачей сигнала [19].

Гипометилирование ДНК – другой вариант эпигенетических отклонений, выявляемых при злокачественных заболеваниях, в том числе и при РПЖ [2]. Гипометилирование происходит при участии деметилаз – группы ферментов, к которым относятся 5-метилцитозин-ДНК-гликозилаза и MBD2b. Гипометилирование ДНК может быть как общим, так и локальным. Например, при метастатическом РПЖ общий уровень метилирования ДНК значительно ниже, чем при отсутствии метастазов [2]. Локальное гипометилирование связано со специфическими участками генома, такими как промоторы онкогенов, которые в норме значительно метилированы [22].

Метилирование ДНК можно одновременно рассматривать и как защитный механизм, предотвращающий развитие рака. Например, в состоянии метилирования ДНК не происходит транскрипции онкогенов, синтеза и накопления продуктов этих генов. Однако в случае гипометилирования этот защитный механизм нарушается, что может способствовать канцерогенезу. Отдельные нарушения метилирования ДНК при злокачественных заболеваниях могут быть использованы как диагностические маркеры, которые могут быть выявлены в опухолевой ткани, сыворотке, моче и других жидкостях. Исследование эпигенетических маркеров имеет ряд преимуществ перед исследованием мутационных повреждений генома (генетических маркеров). Технически это значительно проще и позволяет проводить как качественное, так и количественное исследование с помощью ПЦР диагностики, имеющей высокую чувствительность.

Другим достаточно хорошо изученным из наиболее важных механизмов эпигенетического контроля экспрессии гена является модификация гистонов путем ацетилирования. Эти два процесса – метилирование ДНК и ацетилирование гистонов – могут по отдельности или совместно изменять экспрессию генов. Гистоны рассматриваются как важные элементы, формирующие структуру хроматина и участвующие в контроле экспрессии генов. В каждой нуклеосоме (составной части хроматина) две нити суперспирализованной ДНК окружают гистоновую сердцевину, которая представляет собой октамер, собранный из 4 гистоновых субъединиц – H3-H4 тетрамера и двух H2A-H2B димеров [25]. Гистоны состоят из глобулярного домена и более подвижного и варибельного NH₂ терминального участка, названного гистоновым «хвостом». Эти «хвосты» расположены по периферии хроматина и чувствительны к различным модификациям. Кроме того, обнаружены различные посттрансляционные модификации гистонов, включающие ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, гликозилирование и убиквитинизацию этих белковых комплексов [20]. Эти модификации получили название «гистоновый код» и являются эффективным эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии генов [14].

Ацетилирование и деацетилирование «хвостов» происходит с помощью гистоновых ацетилтрансфераз и деацетилаз (НАТ и HDAC). Ацетилирование гистонов обеспечивает транскрипционную активность гена [28]. Напротив, удаление ацетиловой группы приводит к конденсации хроматина и прекращению транскрипции гена. Обработка клеток РПЖ ингибиторами деацетилаз приводит к повышенной экспрессии генов, таких как ген карбоксипептидазы А3 (CPA3) [13] и ген белка-3, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-3) [36]. При РПЖ значительно повышена экспрессия гистоновых деацетилаз 1, 2 и 3 [11, 37], особенно при раке, резистентном к кастрации.

Влияние метилирования гистонов на функционирование хроматина зависит от

положения модифицированной аминокислоты и степени ее метилирования, т.е. от количества присоединенных метильных групп. Например, метилирование лизинов 4, 36 и 79 в гистоне 3 (H3K4me₃, H3K36me₃ и H3K79me₃) приводит к активации транскрипции, а при метилировании лизинов 9 и 27 в гистоне 3 (H3K9 и H3K27), наоборот, хроматин приобретает форму, блокирующую транскрипцию гена [12, 20]. При РПЖ метилирование гистонов H3K4me₃, H3K9me₂, H3K9me₃ и ацетилирование H3 и H4 в опухоли снижено по сравнению со здоровой тканью. Метилирование лизина 4 гистона H3 в клеточной линии LNCaP, полученной из клеток РПЖ, ассоциируется с инактивацией транскрипции гена PSA [22]. Гистоновые деметилазы в настоящее время не описаны, и считается, что метилирование гистонов является относительно стабильным и даже необратимым процессом [26].

Возможность использования эпигенетических маркеров для диагностики РПЖ интенсивно изучается, исследования показывают высокую чувствительность методов, основанных на определении метилирования определенных генов. Например, чувствительность метода определения метилирования гена *GSTP1* в качестве опухолевого маркера, в зависимости от тестируемого материала, оценивается в 72–76% при исследовании сыворотки или мочи после массажа простаты и в 90% – при исследовании непосредственно ткани опухоли. В качестве диагностических маркеров РПЖ предложено определение метилирования ряда других генов: *RARB*, *CD44*, *ECAD*, *RASSF1A*, *TIG1*, *APC* [10, 33, 35].

Установлено, что для увеличения чувствительности метода необходим подбор панелей таких метилированных маркеров [38]. Так, для исследования мочи с целью выявления РПЖ предложено две панели – *GSTP1/ARF/CDNK2A/MGMT* и *GSTP1/APC/RARB2/RASSF1A*. Для исследования образцов сыворотки крови предложена панель *GSTP1/PTGS2/RPRM/TIG1*. В последнее время в качестве генов, метилирование которых ассоциировано с РПЖ, рассматривают *PCDH17* и *TCF21* – совместное их определение при исследовании ткани предстательной железы обеспечивает чувствительность метода при выявлении рака на уровне 96% [8].

Среди изменений генома, которые накапливаются в процессе патогенеза РПЖ, только изменения метилирования ДНК регистрируются постоянно, практически во всех случаях, выявляются на стадии пренеопластических повреждений и являются потенциально обратимыми (ДНК-последовательность остается интактной). Поскольку эпигенетические процессы напрямую не повреждают последовательность генома, использование препаратов, способных изменять состояние хроматина путем метилирования, имеет перспективы для профилактики возникновения РПЖ и его лечения. Поэтому предпринимаются попытки терапевтически устранить эпигенетическое блокирование трансляции генов. Одно из направлений, которое привело к созданию новых фармакологических препаратов, это

использование ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (DNMTi), таких как 5-Azacitidine (Vidaza), Decitabine (Dacogen), Zebularine, Procainamide или Hydralazine для снижения количества метилированных $5mCpG$ динуклеотидов среди последовательностей на CpG островках в делящихся раковых клетках [7, 24, 32].

Другое направление, которое также активно изучается в клинике, – использование ингибиторов гистоновых деацетилаз (HDACi), таких как Vorinostat (Zolinza), MS-275, вальпроевой кислоты и ряда других для ограничения образования репрессивных конформаций хроматина вокруг генов, имеющих нарушения метилирования [5, 17, 18].

Однако для большинства злокачественных новообразований, включая РПЖ, вероятно, потребуются комбинированное применение эпигенетических препаратов с разным механизмом действия. При исследовании опухолевых клеток *in vitro* комбинированное применение ингибиторов ДНК-метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз более эффективно восстанавливало блокирование транскрипции генов [4]. В настоящее время проводятся клинические исследования различных групп эпигенетических средств, как по отдельности, так и в комбинациях друг с другом или с уже разрешенными противоопухолевыми препаратами. Эти исследования находятся на разных фазах клинического тестирования, и окончательные результаты, вероятно, будут известны позднее [16].

Очевидно, что дальнейшее изучение эпигенетических механизмов, связанных с инициацией канцерогенеза, позволит разработать чувствительные тест-системы, способные при биохимическом скрининге выявлять злокачественные заболевания на ранних стадиях, в том числе и РПЖ. Кроме того, характерные эпигенетические нарушения при функционировании генов, приводящие к инициации опухолевых поражений предстательной железы, могут стать мишенями для разработки новых противоопухолевых препаратов (эпигенетических модуляторов), способных останавливать развитие опухолевого процесса на ранних фазах.

Список литературы

1. Bastian P.J., Yegnasubramanian S., Palapattu G.S., Rogers C.G., Lin X., De Marzo A.M., Nelson W.G. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation // *Eur. Urol.* – 2004. – Vol. 46, № 6. – P. 698–708.
2. Bedford M.T., van Helden P.D. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate // *Cancer Res.* – 1987. – Vol. 47, № 20. – P. 5274–5276.
3. Brooks J.D., Weinstein M., Lin X., Sun Y., Pin S.S., Bova G.S., Epstein J.I., Isaacs W.B., Nelson W.G. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1998. – Vol. 7, № 6. – P. 531–536.

4. Cameron E.E., Bachman K.E., Myohanen S., Herman J.G., Baylin S.B. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol. 21, № 1 – P. 103–107.
5. Carducci M.A., Gilbert J., Bowling M.K., Noe D., Eisenberger M.A., Sinibaldi V., Zabelina Y, Chen T.L., Grochow L.B., Donehower R.C. A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on a 120-h infusion schedule // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – Vol. 7, № 10 – P. 3047–3055.
6. Catalona W.J., Smith D.S., Ratliff T.L., Dodds K.M., Coplen D.E., Yuan J.J., Petros J.A., Andriole G.L. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 324, № 17 – P. 1156-1161.
7. Cheng J.C., Matsen C.B., Gonzales F.A., Ye W., Greer S., Marquez V.E., Jones P.A., Selker E.U. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2003. – Vol. 95, № 5. – P. 399–409.
8. Costa V.L., Henrique R., Danielsen S.A., Eknaes M., Patrício P., Morais A., Oliveira J., Lothe R.A., Teixeira M.R., Lind G.E., Jerónimo C. TCF21 and PCDH17 methylation: an innovative panel of biomarkers for a simultaneous detection of urological cancers // *Epigenetics.* – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. 1120–1130.
9. Das P.M., Singal R. DNA methylation and cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 22, № 22. – P. 4632–4642.
10. Goessl C., Krause H., Müller M., Heicappell R., Schrader M., Sachsinger J., Miller K. Fluorescent methylationspecific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, № 21. – P. 5941–5945.
11. Halkidou K., Gaughan L., Cook S., Leung H.Y., Neal D.E., Robson C.N. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer // *Prostate.* – 2004. – Vol. 59, № 2. – P. 177-189.
12. Hamamoto R., Nakamura Y. Dysregulation of protein methyltransferases in human cancer: an emerging target class for anticancer therapy // *Cancer Sci.* – 2016. – Vol. 107, № 4. – P. 377–384.
13. Huang H., Reed C.P., Zhang J.S., Shridhar V., Wang L., Smith D.I. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59, № 12. – P. 2981–2988.
14. Jenuwein T., Allis C.D. Translating the histone code // *Science.* – 2001. – Vol. 293, № 5532. – P. 1074–1080.
15. Jurkowska R.Z., Jurkowski T.P., Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases // *Chembiochem.* – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 206–222.
16. Jerónimo C. and Henrique R. Epigenetic biomarkers in urological tumors: a systematic

review // *Cancer Letters*. – 2014. – Vol. 342, № 2. – P. 264–274.

17. Kelly W.K., O'Connor O.A., Krug L.M., Chiao J.H., Heaney M., Curley T., MacGregor-Cortelli B., Tong W., Secrist J.P., Schwartz L., Richardson S., Chu E., Olgac S., Marks P. A., Scher H., Richon V.M. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23, № 17. – P. 3923–3931.

18. Kelly W.K., Richon V.M., O'Connor O., Curley T., MacGregor-Curtelli B., Tong W., Klang M., Schwartz L., Richardson S., Rosa E., Drobnjak M., Cordon-Cordo C., Chiao J.H., Rifkind R., Marks P. A., Scher H. Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, № 10. – P. 3578–3588.

19. Konishi N., Nakamura M., Kishi M., Nishimine M., Ishida E., Shimada K. DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas // *Jpn. J. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 93, № 7. – P. 767–773.

20. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. – 2007. – Vol. 128, № 4. – P. 693–705.

21. Lee W.H., Morton R.A., Epstein J.I., Brooks J.D., Campbell P.A., Bova G.S., Hsieh W.S., Isaacs W.B., Nelson W.G. Cytidine methylation of regulatory sequences near the π -class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1994. – Vol. 91, № 24. – P. 11733–11737.

22. Li L.C., Carroll P.R., Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97, № 2. – P. 103–115.

23. Li L.C., Okino S.T., Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – Vol. 1704, № 2. – P. 87–102.

24. Lin X., Asgari K., Putzi M. J., Gage W. R., Yu X., Cornblatt B. S., Kumar A., Piantadosi S., DeWeese T. L., De Marzo A. M., Nelson W. G. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of π -class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, № 24. – P. 8611–8616.

25. Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. – 1997. – Vol. 389, № 6648 – 251–260.

26. Moggs J.G., Goodman J.I., Trosko J.E., Roberts R.A. Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 196, № 3. – P. 422–430.

27. Nakayama M., Bennett C.J., Hicks J.L., Epstein J.I., Platz E.A., Nelson W.G., De Marzo A.M. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase- π gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic

epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection // *Am. J. Pathol.* – 2003. – Vol. 163, № 3. – P. 923–933.

28. Peterson C.L., Laniel M.A. Histones and histone modifications // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14, № 14. – P. 546–551.

29. Robertson K.D. DNA methylation and chromatin – unraveling the tangled web // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21, № 35. – P. 5361–5379.

30. Rodenhiser D., Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications // *CMAJ.* – 2006. – Vol. 174, № 3 – P. 341–348.

31. Sakr W.A., Haas G.P., Cassin B.F., Pontes J.E., Crissman J.D. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male-patients // *J. Urol.* – 1993. – Vol. 150, № 2. – P. 2379–2385.

32. Segura-Pacheco B., Trejo-Becerril C., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L., Mariscal I., Chavez A., Acuna C., Salazar A.M., Lizano M., Duenas-Gonzalez A. Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 1596–1603.

33. Singal R., Ferdinand L., Reis I.M., Schlesselman J.J. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease // *Oncol. Rep.* – 2004. – Vol. 12, № 3. – P. 631–637.

34. Thompson I.M., Pauler D.K., Goodman P.J., Tangen C.M., Lucia M.S., Parnes H.L., Minasian L.M., Ford L.G., Lippman S.M., Crawford E.D., Crowley J.J., Coltman C.A. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $<$ or $=4.0$ ng per milliliter // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350, № 22. – P. 2239–2246.

35. Tokumaru Y., Harden S.V., Sun D.I., Yamashita K., Epstein J.I., Sidransky D. Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10, № 16. – P. 5518–5522.

36. Tsubaki J., Hwa V., Twigg S.M., Rosenfeld R.G. Differential activation of the IGF binding protein-3 promoter by butyrate in prostate cancer cells // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143, № 5. – P. 1778–1788.

37. Weichert W., Röske A., Gekeler V., Beckers T., Stephan C., Jung K., Fritzsche F. R., Niesporek S., Denkert C., Dietel M., Kristiansen G. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy // *Br. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 98, № 3. – P. 604–610.

38. Yegnasubramanian S., Kowalski J., Gonzalgo M.L., Zahurak M., Piantadosi S., Walsh P.C., Bova G.S., De Marzo A.M., Isaacs W.B., Nelson W.G. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer // *Cancer. Res.* – 2004. – Vol. 64, № 6. – P. 1975–1986.