

## Клиническое значение молекулярно-генетических изменений в клетках уротелия при раке мочевого пузыря

С.В.Башкатов<sup>1</sup>, М.В.Немцова<sup>2,3</sup>, О.Б.Карякин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГУ МРНЦ РАМН, Обнинск; <sup>2</sup>НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова;

<sup>3</sup>Медико-генетический научный центр РАМН

Ежегодно в России раком мочевого пузыря (РМП) заболевают 12,5 тыс. человек, что составляет 2,7% всех случаев злокачественных опухолей в Российской Федерации. Доля больных с I–II стадией РМП на 2003 г. в нашей стране составила 50,8% [1]. По данным зарубежных авторов, наиболее распространенной клинической формой заболевания является поверхностный РМП (70–80% больных).

Классификация переходноклеточного РМП по системе TNM, предложенная Международным противораковым союзом, не позволяет объективно прогнозировать течение заболевания. Доказано, что ведущую роль в определении выживаемости больных играют глубина инвазии новообразования, степень дифференцировки опухолевых клеток, поражение региональных лимфоузлов, наличие карциномы *in situ* (CIS) уротелия, размер и количество первичных новообразований, а также продолжительность безрецидивного периода. Отдаленные результаты лечения пациентов с новообразованиями, составляющими одну классификационную подгруппу, существенно различаются, что особенно заметно у больных поверхностным РМП, поэтому в последние годы предпринимаются попытки выявить дополнительные прогностические факторы, которые позволили бы отличать опухоли с высоким риском рецидивирования и прогрессирования от менее агрессивных новообразований и применять дифференцированный лечебный подход.

Поверхностный РМП является гетерогенной группой злокачественных новообразований, которая включает [2]:

- папиллярные новообразования, ограниченные слизистой мочевого пузыря (Ta);
- опухоли, прорастающие в подслизистый слой или собственную пластинку слизистой (T1);
- интраэпителиальные новообразования с низкой степенью дифференцировки (CIS).

Из всех поверхностных опухолей мочевого пузыря 70% составляют новообразования, находящиеся в стадии Ta, и 30% — новообразования в стадии T1 [3]. Общая 5-летняя выживаемость больных РМП составляет более 70% [4].

В связи с этим было предложено деление поверхностных переходноклеточных карцином на три группы риска [5]. К первой группе относятся опухоли с низким риском рецидивирования, единичные,

Ta, G1, менее 3 см в диаметре. Ко второй группе можно отнести опухоли с высоким риском рецидивирования, T1, G3, мультифокальные или часто рецидивизирующие, имеющие сопутствующую CIS уротелия. Третью группу составляют опухоли с промежуточным риском: Ta, T1, G1-2, мультифокальные, более 3 см в диаметре.

Под прогрессированием поверхностного РМП понимают развитие инвазивного рецидива опухоли (критерий T), возрастание степени клеточной анаплазии (критерий G) или наличие метастатического процесса (критерий M) [6, 7].

Высокодифференцированные опухоли pTa обладают меньшим потенциалом к прогрессированию, чем pT1, вероятность мышечной инвазии 9 и 18% соответственно. Опухоли G1 прогрессируют в 6% случаев, в то время как у G2 потенциал прогрессирования в 5 раз больше и составляет 30% [8].

По данным зарубежных и отечественных исследователей, частота рецидивов поверхностного РМП после ТУР 60–90% [9]. Помимо высокой частоты рецидивов отмечается риск возможного прогрессирования заболевания в виде инвазивного роста опухоли (T) или снижения степени ее дифференцировки (G), что является неблагоприятным прогностическим признаком развития РМП. В целом частота прогрессирования в течение 3–5 лет после различных видов лечения для стадии Ta составляет 2–4%, T1 — 29–30%, для CIS около 54% [10].

В странах Западной Европы цитологическое исследование мочи является наиболее часто используемым методом совместно с цистоскопией для диагностики новых опухолей мочевого пузыря и рецидивов. Сочетание этих методов является «золотым стандартом». Цитологическое исследование мочи имеет ряд недостатков: при высокой чувствительности в определении низкокодифференцированных опухолей (G3) и опухолей высоких стадий (pT1–T4) — 94,7 и 90,4% соответственно, чувствительность для обнаружения высококодифференцированных опухолей составляет 25%, результаты исследования находятся в зависимости от квалификации цитолога [11].

В России выполняется преимущественно гистологическое исследование опухолевого материала, которое позволяет сделать заключение о степени клеточной анаплазии, глубине прорастания, лимфогенной инвазии.

Эти неудовлетворительные данные послужили предпосылками для разработки новых методов и новых систем маркеров для диагностики РМП.

Данные молекулярной биологии убедительно доказывают роль генетических факторов в инициации злокачественного процесса и развития опухоли. Однако закономерности функционирования генома раковой клетки далеки от понимания [12].

Возникновение опухолевой клетки происходит в результате накопления в наследственном аппарате нормальной клетки некоторого количества молекулярных событий, приводящих к активации или инактивации генов, контролирующих клеточный цикл. Каждое такое событие само по себе не ведет к необратимым повреждениям клетки, но их накопление может нарушать регуляцию клеточного цикла и, как следствие, приводить к образованию устойчивого патологического клеточного клона с такими свойствами, как неконтролируемый рост, независимость от регулирующих воздействий клеточного окружения, способность к инвазивному росту, метастазированию.

На каждом этапе развития опухоли в геноме клетки происходят различные молекулярные нарушения, которые могут свидетельствовать о стадии заболевания, определять скорость злокачественного процесса, инвазивность и метастатический потенциал опухоли, возможность рецидивирования и эффективность лечения. Подобные нарушения можно назвать «маркерами злокачественной трансформации» и использовать для характеристики опухолевого процесса. Среди них можно выделить несколько групп, имеющих различную диагностическую ценность. Маркерами канцерогенеза могут служить хромосомные аномалии: делеции хромосомных районов, содержащих гены-супрессоры, вплоть до потери целой хромосомы (моносомии) или, наоборот, увеличение копийности хромосомных районов, т. е. гиперамплификация протоонкогенов. Это крупные повреждения генетического аппарата клетки, которые связывают с генерализованным развитым необратимым опухолевым процессом. Подобные изменения проявляются обычно на последних стадиях развития опухоли или свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе заболевания. Также маркерами злокачественной трансформации могут служить точечные мутации в определенных генах, приводящие к изменению или отсутствию их белкового продукта или, наоборот, к их активации и гиперэкспрессии, а также микросателлитная нестабильность. Делеции и мутации связаны с изменением нуклеотидной последовательности гена, поэтому их относят к структурным необратимым молекулярно-генетическим повреждениям. Однако в последнее время в опухоли выявлены изменения, которые не приводят к повре-

ждению последовательности ДНК, но значительно влияют на его экспрессию гена, вплоть до полного отсутствия белкового продукта. Такие изменения называют эпигенетическими, они считаются обратимыми и определяются на ранних стадиях развития опухоли. Механизмом подобных изменений является обратимое присоединение метильной группы к цитозину в СG-динуклеотидах, расположенных в регуляторных участках генов. Это явление получило название аномального метилирования генов в опухоли. Анализ современной литературы показывает, что практически все варианты молекулярной патологии задействованы в генезе РМП.

Основным структурным повреждением, определяемым в опухолях мочевого пузыря, можно считать потерю гетерозиготности, при которой происходит потеря одной из родительских копий гена. Возможности молекулярной генетики для выявления подобных повреждений в настоящее время велики. Потерю гетерозиготности можно определять с помощью ДНК-анализа микросателлитных повторов или используя гибридизацию *in situ*.

При РМП выявлены потери разных хромосомных локусов 13q, 3p, 4, 5q, 8, 14q, 18q [13–15]. Однако одним из самых распространенных событий при инвазивном РМП является потеря материала хромосомы 9. На сегодня известны две области хромосомы 9p21 и 9q, которые преимущественно теряются при РМП, что может рассматриваться как ключевое событие для развития опухоли [16]. В области 9p21 располагается кластер генов-супрессоров опухолевого роста p14(ARF), p15, p16. Инактивация этих генов в результате делеции приводит к нарушению регуляторных путей RB1-p16-cyclinD и ARF-MDM2-p53, в результате чего клетка получает способность к злокачественному росту. Показано, что примерно 50% опухолей мочевого пузыря имеют гомозиготные делеции локуса 9p21, приводящие к полной потере генов p16 и p14(ARF) на обеих хромосомах [17]. Другой распространенной аллельной потерей при инвазивном РМП считается 17p, где располагается ген-супрессор p53. Инактивация этого гена приводит к нарушению регуляторного пути ARF-MDM2-p53. Делеции хромосом 9 и 17 являются наиболее частыми при РМП, они и определяют прогноз заболевания [18].

Второй группой структурных маркеров, характерных для злокачественных опухолей, являются мутации. Мутации можно разделить на две группы – активирующие и инактивирующие. Активирующие имеют место в онкогенах или их рецепторах и приводят к увеличению генной экспрессии. Инактивирующие обнаруживаются в генах, негативно регулирующих клеточный цикл, в супрессорах опухолевого роста, в генах, отвечающих за систему репарации.

Такие мутации приводят к изменению или отсутствию белкового продукта.

Для большинства типов клеток в целом, и уротелиальных в частности, наиболее мощными стимуляторами размножения являются цитокины, принадлежащие к группе факторов роста (фактор роста фибробластов – FGF, эпителиальный – EGF, инсулиноподобный – IGF, сосудистоэндотелиальный – VEGF и др.). Их связывание со специфическими рецепторами индуцирует каскадные механизмы, повышает активность циклинзависимых киназ, в результате инициируются синтез ДНК и деление клетки. Опухолевые клетки сами приобретают способность генерировать пролиферативные сигналы, которые в норме исходят извне. Это происходит в результате генетических изменений, способствующих повышению секреции факторов роста самими злокачественными клетками, либо при резком увеличении количества рецепторов для факторов роста. Нарушение структуры и усиление функции рецепторных тирозинкиназ является характерным молекулярным изменением для РМП.

Активирующие мутации в 7 и 10 экзонах гена FGFR3, кодирующего рецептор FGF, показаны для РМП, причем такие мутации редки для низкодифференцированных и инвазивных форм РМП [19]. В.В. van Rhijn и соавт. [19] изучили ген FGFR3 у 72 пациентов. Мутации обнаружены у 34 из 53 пациентов со стадией pTa. Частота встречаемости мутаций для неинвазивных папиллярных карцином составила 64%, остальные 19 больных с более высокой стадией заболевания и менее дифференцированными опухолями указанной мутации не имели ( $p < 0,0001$ ). При дальнейшем наблюдении в течение 12 мес было установлено, что рецидивы чаще возникают у пациентов с нормальным FGFR3. Авторы предположили, что статус FGFR3 являлся более значимым предиктором рецидива, чем клинико-морфологические характеристики. Другая группа ученых исследовала мутации FGFR3 в 132 опухолях мочевого пузыря разной стадии злокачественности, частота мутаций оказалась наибольшей в неинвазивных папиллярных опухолях pTa (74%), причем в CIS-подобных мутаций вообще не нашли. В результате этих исследований был сделан вывод о различных путях прогрессии неинвазивных папиллярных опухолей и CIS [20].

В качестве примера инактивирующих мутаций можно рассмотреть мутации гена p53. Белок p53 играет важную роль хранителя генома, в ответ на повреждение ДНК он запускает механизмы, блокирующие клеточный цикл, и механизмы апоптоза для удаления поврежденной клетки. Высокий уровень экспрессии этого белка удерживает клетку в G0/G1-фазе клеточного цикла до исправления поврежде-

ния ДНК с помощью систем репарации. Благодаря этому значительно уменьшается вероятность накопления в организме потенциально опасных клеток, способных сформировать злокачественную опухоль. Мутации этого гена присутствуют примерно в 50% всех опухолей человека.

D. Esrig и соавт. [21] оценили статус гена p53 в опухолевых образцах 243 пациентов с инвазивным РМП, полученных в результате радикальной цистэктомии. Пациенты с поврежденным геном p53 имели значительно больший риск рецидивирования заболевания и характеризовались снижением общей выживаемости. Эта взаимосвязь была наиболее отчетливой у пациентов, опухоль которых ограничивалась органом (pT1, pT2, pT3a) [21]. Существует ряд других работ, в которых уровень мутантного p53 определяется иммуногистохимически, причем накопление измененного белка происходит в ядре клетки. В случае ядерной локализации белка мутации в гене подтверждались секвенированием, т.е. определением нуклеотидной последовательности [3, 22]. Показано, что увеличение концентрации мутантного белка такой локализации ассоциировано с опухолевой прогрессией, увеличением частоты рецидивирования, уменьшением общей выживаемости, ухудшением ответа на химиотерапию [21]. Таким образом, определение мутации в гене p53 является важным прогностическим маркером прогрессирования РМП [21, 23, 24].

Высокая частота встречаемости мутаций гена FGFR3 при поверхностном папиллярном раке, а гена p53 в инвазивном РМП позволила A. Bakka и соавт. [25] изучить эти мутации у пациентов с впервые диагностированным РМП всех стадий и степеней дифференцировки, чтобы использовать полученные данные для молекулярной классификации опухолей. Было определено, что сочетание мутаций FGFR3 и p53 у одного пациента встречается крайне редко. Мутации FGFR3 были характерны для поверхностных опухолей pTa (71%) и достоверно реже встречались при pT2–T4 (5%;  $p < 0,0001$ ). Мутации же p53, наоборот, достоверно чаще обнаружены при pT2–T4 (47%;  $p < 0,003$ ). Полученные результаты позволили разделить опухоли на две группы с различным злокачественным потенциалом [25].

Проведенные исследования позволили использовать данные о молекулярно-генетических повреждениях в клетках уротелия в качестве системы молекулярных маркеров. Исследуя делеции хромосомы 9 и мутации и делеции гена p53 в опухолях мочевого пузыря, A. Hartmann и соавт. [26] предложили схему развития опухолей мочевого пузыря с учетом молекулярно-генетических повреждений. Авторы предположили, что развитие папиллярного рака с низким злокачественным потенциа-

лом происходит при появлении и накоплении в клетках делеций 9p/9q. Если в процессе развития опухоли, на стадии гиперплазии или дисплазии произойдет повреждение гена p53 в результате делеции 17p или мутации, то в этом случае опухоль трансформируется в CIS или приобретет более высокую степень злокачественности [26].

К эпигенетическим маркерам злокачественного роста сегодня относят аномальное метилирование регуляторных районов генов-супрессоров. Считается, что эпигенетические нарушения являются наиболее ранними и могут иметь место задолго до клинической манифестации заболевания [27]. Инактивация генов, регулирующих клеточный цикл, посредством аномального метилирования широко представлена при РМП. Для многих генов-супрессоров показано аномальное метилирование в опухоли мочевого пузыря, но с различной интенсивностью. Интересно, однако, что при РМП достаточно редко происходит аномальное метилирование гена p16, его инактивация в опухоли этого типа чаще результат потери фрагмента 9p21 [28].

Клетки уротелия, как и другие клетки организма, находятся в клеточном пласте, каждый элемент которого занимает определенное положение. Клетки контактируют между собой и межклеточным матриксом с помощью адгезивных молекул — кадгеринов. Е-кадгерин, представитель этого семейства, обеспечивает образование адгезионных межклеточных контактов в эпителиальных клетках. Для злокачественных опухолей характерна потеря экспрессии Е-кадгерина, что связывают с эпителиально-мезенхимальным переходом, обеспечивающим инвазивный рост опухоли. Прогрессирование РМП отчасти можно объяснить способностью опухолевых клеток терять межклеточную адгезию и проникать в окружающие ткани. Снижение уровня Е-кадгерина приводит к трансформации поверхностных переходноклеточных карцином мочевого пузыря в инвазивный рак, что подтверждает гипотезу о значимости гена CDH1, кодирующего этот белок, в канцерогенезе РМП [29]. S.F. Shariat и соавт. [30] обнаружили связь между уровнем экспрессии Е-кадгерина, определенного иммуногистохимически, и степенью дифференцировки опухоли. Наиболее низкое содержание белка в клетке обнаруживается у больных с CIS, что определяет потерю межклеточных связей и объясняет высокую частоту обнаружения злокачественных клеток при цитологическом исследовании мочи у больных этой группы [30]. Изменение количества белка напрямую связано с инактивацией гена CDH1 в результате его аномального метилирования. Однако другие гены-супрессоры опухолевого роста также демонстрируют гиперметилирование в опухолях мочевого пузыря. W.Y. Michael и соавт. [31] про-

анализировали 7 генов (RAR $\beta$ , DAPK, CDH1, p16, p15, GSTP1, MGMT), участвующих в канцерогенезе, в 98 опухолях мочевого пузыря. Оказалось, что частота метилирования генов RAR $\beta$ , DAPK, CDH1 в опухолях очень высока — 87, 60 и 63% соответственно. Это позволило использовать метилирование этих генов в качестве системы маркеров для диагностики опухолевых клеток в моче. Используя набор из 4 генов (DAPK, RAR $\beta$ , CDH1, p16), авторы выявили, что метилирование хотя бы одного из них можно определить в моче пациентов в 90,9% случаев, в то время как цитология мочи при этом была информативна только в 45,5%. Таким образом, сочетание применения двух методов повышает точность диагностики, особенно для высокодифференцированных опухолей [31]. Кроме указанных генов высокий уровень гиперметилирования при РМП отмечен для гена p14(ARF). Аномальное метилирование этого гена достоверно связано с большим размером опухоли, наличием мышечной инвазии и более высокой стадией развития опухоли, что позволяет рассматривать эпигенетические изменения этого гена как маркер плохого прогноза [32].

Из представленного обзора литературы становится ясно, что молекулярно-генетические исследования играют центральную роль в изучении механизмов канцерогенеза при РМП. Существуют три основных направления клинического использования полученных данных.

1. Использование генетических маркеров в качестве прогностических факторов.

2. Разработка и применение систем для ранней неинвазивной диагностики РМП, мониторинга эффективности проводимой противоопухолевой терапии. Ярким примером служат тест-системы «UroVysion», «ImmunoCyt+» и др.

3. Самым перспективным и клинически важным направлением является разработка «таргетных» лекарственных препаратов, для которых характерно воздействие на определенный механизм канцерогенеза. Для лечения метастатического рака почки в настоящее время применяются сорафениб, сунитиниб, бевацизумаб, которые доказали свою эффективность у больных, считавшихся ранее инкурабельными. Указанные препараты блокируют цитоплазматическую часть рецепторов к факторам роста, снижают пролиферативную активность опухолевых клеток. Бевацизумаб является человеческим рекомбинантным антителом против VEGF, подавляет образование сети капилляров, которые кровоснабжают вторичные опухолевые очаги.

РМП является распространенным заболеванием. Продолжительность жизни больных с отдаленными метастазами составляет около 12 мес. Достижения в области молекулярной биологии

имеют не только фундаментальное, но и практическое значение для создания противоопухолевых препаратов, эффективных при диссеминирован-

ных злокачественных процессах, что в конечном итоге улучшит перспективы выживания больных этими формами РМП.

### Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2003 г. М.; 2005.
2. Millan-Rodriguez F., Chechile-Toniolo R. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000; 163:68–7.
3. Vet J.A., Bringuier P.P., Schaafsma H.E. et al. Comparison of P53 protein overexpression with P53 mutation in bladder cancer: clinical and biologic aspects. *Lab Invest* 1995;73(6):837–43.
4. Лопаткин Н.А., Мартов Б.М. и соавт. Современные подходы в лечении поверхностного рака мочевого пузыря. В кн.: Рак мочевого пузыря. Материалы 4-й Всероссийской научной конференции с участием стран СНГ. М.; 2002. с. 50–1.
5. Allard P., Bernard P., Fradet Y. et al. The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer. *Europ Urol* 1998;8(1):692–8.
6. Fleming F. et al. Urinary bladder. In: Cancer staging manual. Philadelphia, Lippincot-Raven;1997. p. 241–24.
7. Malmstrom P., Busch C., Norlen B.J. Recurrences, progression and survival in bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol* 1987;21(2):185.
8. Kurt K. et al. The nature history and prognosis of tread superficial bladder cancer. EORTC GU Group. *Prog Clin Biol Res* 1992;378:1.
9. Holmang S., Hedelin H., Anderstrom C., Johansson S.L. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 1995;153(16):1823–6; discussion 1826–7.
10. Witjes J.A., Kiemeny L.A., Schaafsma H.E., Debruyn F.M. The influence of review pathology on study outcome of a randomized multicentre superficial bladder cancer trial. Members of the Dutch Sought East cooperative Urological Group. *Br J Urol* 1994; 73(2): 172–6.
11. Placer J. et al. Clinical utility of a multiprobe FISH assay in voided urine specimens for detection of bladder cancer and its recurrences, compared with urinary cytology. *Eur Urol* 2002;42:547–52.
12. Vogelstein B., Kinzler K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 2004; 10: 789–99.
13. Spruk C.H. 3 rd., Ohneseit P.F., Gonzalez-Zulueta M. et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54(3):784–8.
14. Dalbagni S., Presti J.C. Jr., Reuter V.E. et al. Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. *Diagn Mol Pathol* 1993; 2(1):4–13.
15. von Knobloch R. et al. Allelic imbalance at chromosomes 5q,8p and 17p as progression markers for bladder cancer. *Aktuel Urol* 2000, 31: 83–6.
16. Vogelstein B., Kinzler K.W. The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2002. p. 697–702.
17. Cairns P., Polascic T.J., Eby Y. et al. Frequency of homozygous deletions at p16/CDKN2 in primary human tumors. *Nat Genet* 1995;11(2):210–2.
18. Prat E., Bernues M., Caballin M.R. et al. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 2001; 57(5):986–92.
19. van Rhijn B.W. Lurkin I., Radvanyi F. et al. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 2001; 61(14),1265–8.
20. Billerey C., Chopin D., Aubriot-Lorton M.H. et al. Frequent FGFR3 mutation in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001;158(6):1955–9.
21. Esrig D., Elmajian D., Groshen S. et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994;331(19):1259–64.
22. Esrig D., Spruck C.H. 3 rd., Nichols P.W. et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutation in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993;143(5):1389–97.
23. Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Saez G.T. et al. P53 mutation in human bladder cancer: Genotypic vs phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56(3):347–53.
24. Sarkis A.S., Dalbagni G., Cordon-Cardo C. et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: A marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(1): 53–9.
25. Bakkar A., Wallerand H., Radvanyi F. et al. FGFR3 and TP53 gene mutation two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003; 63(23):8108–12.
26. Hartmann A., Schlake G., Zaak D. et al. Occurrence of chromosome 9 and p53 alteration in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res* 2002;62:809–18.
27. Belinsky S.A., Nikula K.J., Palmisano W.A. et al. Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11891–6.
28. Obermann E.C., Meyer S., Hellge D. et al. Fluorescence in situ hybridization detects frequent chromosome 9 deletions and aneuploidy in histologically normal urothelium of bladder cancer patients. *Oncol Rep* 2004; 11(4): 745–51.
29. Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U. et al. A casual role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392(6672):190–3.
30. Shariat S.F., Matsumoto K., Casella R. et al. Urinary levels of soluble e-cadherin in the detection of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 2005;48(1):69–76.
31. Michael W.Y. et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8:464–70.
32. Domingues G. et al. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8:980–5.