

Молекулярно-генетическая диагностика светлоклеточного почечно-клеточного рака

Н.В. Апанович¹, М.В. Петерс², А.А. Коротаева¹, П.В. Апанович¹, А.С. Маркова²,
Б.Ш. Камолов², В.Б. Матвеев^{2,3}, А.В. Карпухин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

³факультет фундаментальной медицины ФГОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119192 Москва, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5

Контакты: Александр Васильевич Карпухин karpukhin@med-gen.ru

Введение. По темпу прироста в России рак почки занимает 1-е место. Примерно у трети больных к моменту постановки диагноза выявляют отдаленные метастазы, и у 30–40 % возникает рецидив болезни. Рак почки не проявляется симптоматически до поздней стадии заболевания. Более чем в 50 % случаев рак почки обнаруживают случайно. В связи с этим актуально развитие методов, позволяющих быстро и эффективно диагностировать опухоль.

Материалы и методы. Было проведено изучение уровней экспрессии матричной РНК ряда генов в операционном материале парных образцов (нормальная ткань и злокачественная опухоль почки). Количественное определение экспрессии генов осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе Step One Plus (Applied Biosystems, США) с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США).

Результаты. По результатам скринингового анализа экспрессии 200 генов в парных образцах рак почки/нормальная ткань почки выбраны 5 генов, демонстрирующих наибольшую частоту повышенной экспрессии на I–III стадиях развития светлоклеточного почечно-клеточного рака: CA9, EGLN3, HIG2, NDUFA4L2, STC2.

Заключение. По результатам проведенного исследования экспрессии разработана новая панель, включающая гены CA9, HIG2 и STC2, которая дает возможность с высокой чувствительностью (96,8 %) и специфичностью (92,9 %) дифференциально диагностировать ранний светлоклеточный рак почки на основе определения уровня матричной РНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Такой подход позволяет быстро (в течение 1 дня) диагностировать светлоклеточный почечно-клеточный рак, отличая его от других типов почечно-клеточного рака. Кроме этого, он открывает возможность неинвазивной диагностики рака почки в дальнейшем.

Ключевые слова: светлоклеточный почечно-клеточный рак, молекулярно-генетическая диагностика, дифференциальная экспрессия генов

DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-4-16-20

Molecular genetic diagnostics of clear cell renal cell carcinoma

N.V. Apanovich¹, M.V. Peters², A.A. Korotaeva¹, P.V. Apanovich¹, A.S. Markova²,
B.Sh. Kamolov², V.B. Matveev^{2,3}, A.V. Karpukhin¹

¹Research Center for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia;

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

³Department of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University;
build. 5, 31 Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119192, Russia

Background. On the pace of growth in Russia, renal carcinoma takes the 1st place. Approximately one third of patients at time of diagnosis have distant metastases, and relapse of the disease occurs in 30–40 %. Renal carcinoma does not manifest until later stage of the disease. More than in 50 % of cases renal carcinoma is revealed occasionally. Therefore, development of methods for quick and efficient diagnosis of the tumor is actual.

Materials and methods. The level of messenger RNA expression for several genes was studied in the surgical material of paired samples (normal tissue and a malignant renal carcinoma). Quantification of gene expression was performed by using real-time polymerase chain reaction on Step One Plus instrument (Applied Biosystems, USA) by using TaqMan® Gene Expression Assays kits (Applied Biosystems, USA).

Results. As a result of screening analysis of 200 genes expression in paired samples of renal carcinoma/normal renal tissue we selected 5 genes showing the highest frequency of increased expression in stages I–III of the development of clear renal cell carcinoma: CA9, EGLN3, HIG2, NDUFA4L2, STC2.

Conclusion. As a result of the expression study we developed a new panel, including CA9, HIG2 and STC2 genes which has high sensitivity (96.8 %) and specificity (92.9 %) for differential diagnosis of the early clear cell renal cell carcinoma on the basis of determining the level of messenger RNA expression by real-time polymerase chain reaction. This approach allows you to diagnose clear cell renal cell carcinoma quickly (within 1 day), and differentiate it from other types of renal cell cancer. In addition, it opens the possibility of non-invasive diagnosis of renal carcinoma in the future.

Key words: clear cell renal cell carcinoma, molecular genetic diagnostics, differential gene expression

Введение

Последние 3 десятилетия заболеваемость раком почки в Европе непрерывно растет. В России по темпу прироста рак почки занимает 1-е место [1]. Примерно у трети больных к моменту постановки диагноза выявляют отдаленные метастазы, и у 30–40 % возникает рецидив болезни. Рак почки – сложное гетерогенное заболевание, которое имеет несколько подтипов: светлоклеточный (80–90 %), папиллярный (6–15 %) и хромофобный (2–5 %) [2].

Рак почки не проявляется симптоматически до поздней стадии заболевания. Более чем в 50 % случаев его выявляют случайно при проведении абдоминальной компьютерной томографии или ультразвукового исследования по другим медицинским показаниям. Однако эти методы, а также магнитно-резонансные изображения, не позволяют надежно дифференцировать злокачественные опухоли и доброкачественные новообразования. Методы лабораторной диагностики в значительной мере являются косвенными. Поэтому, для того чтобы верифицировать диагноз, все чаще выполняют биопсии, особенно в случаях рентгенологически неопределенной или малой массы почек. Подробно этот вопрос рассмотрен в рекомендациях Европейского общества урологов и других работах [2, 3]. Американская урологическая ассоциация также поддерживает проведение биопсии при малой массе опухоли [4]. При анализе результатов 5228 биопсий была показана адекватность их выполнения для диагностики злокачественной опухоли [5]. Вместе с тем при использовании для биопсии менее травматичных тонких игл точность диагностики существенно снижается, что связывают с недостаточностью материала для гистологического исследования и зависимостью от квалификации гистолога, позволяющей идентифицировать опухоль [3].

В связи с этим актуально развитие методов, позволяющих быстро и эффективно диагностировать опухоль. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) дает возможность определять экспрессию генов в малом количестве клеток в образце злокачественной опухоли. В настоящей работе выявлены гены, дифференциальная экспрессия которых позволяет обнаруживать светлоклеточный почечно-клеточный рак (ПКР) с высокой чувствительностью и специфичностью.

Материалы и методы

В работе было проведено изучение уровней экспрессии матричной РНК (мРНК) ряда генов в операционном материале парных образцов (нормальная ткань и злокачественная опухоль почки). Свежезамороженные образцы нормальной и опухолевой тканей, взятые при операции или биопсии, получены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Наличие и качество РНК проверяли, используя электрофорез в 1,8 % агарозном геле. Качественными считали образцы РНК, демонстрирующие четкие полосы 18S и 28S РНК, без детектируемой электрофоретически примеси ДНК. Концентрацию водного раствора РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, США). Перед проведением реакции обратной транскрипции концентрации РНК выравняли в контрольных и экспериментальных образцах. Количественное определение экспрессии генов осуществляли с помощью ПЦР-РВ на приборе Step One Plus (Applied Biosystems, США). Каждое измерение выполняли трижды. ПЦР-РВ проводили с использованием наборов для определения экспрессии всех исследуемых генов производства TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Для анализа полученных результатов применяли встроенную программу Applied Biosystems Step One Plus, которая позволяет сравнить относительные количества целевой последовательности РНК в опухолевой и нормальной тканях. В качестве контрольного использовали ген *GAPDH*. В результате обработки измерений получены значения уровней экспрессии генов в опухолевой ткани относительно нормальной. Повышенным или пониженным считали уровень экспрессии гена в опухоли, отличающийся в 2 и более раза от экспрессии в нормальной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета стандартных программ Statistica 10.0. Уровень значимости для выявленных различий принимали равным 0,01.

Результаты и обсуждение

По результатам скринингового анализа экспрессии 200 генов в парных образцах рак почки/нормальная ткань почки были выбраны 5 генов, демонстрирующих наибольшую частоту повышенной экспрессии на I–III стадиях развития рака почки: *CA9*, *EGLN3*, *HIG2*, *NDUFA4L2*, *STC2*. Экспрессия указанных генов была изучена среди 45 парных образцов рак почки/нормальная ткань почки. Полученные частоты повышенной по отношению к контролю экспрессии при светлоклеточном ПКР приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, все изученные гены с высоким уровнем значимости повышено экспрессируются относительно группы контроля на всех 3 стадиях развития светлоклеточного ПКР.

Ген *CA9* (carbonic anhydrase 9 – карбоксиангидраза 9) кодирует карбоксиангидразу 9, которая является

Таблица 1. Частота повышенной по отношению к контролю экспрессии генов на различных стадиях развития светлоклеточного почечно-клеточного рака, %

Table 1. Frequency rates of increased expression in relation to the control of genes at different stages of development of clear cell renal cell carcinoma, %

Ген Gene	Частота экспрессии Expression rate			
	I стадия Stage I	I + II стадии Stage I + II	III стадия Stage III	I + II + III стадии Stage I + II + III
CA9	100*	90,9*	100*	93,9*
EGLN3	93,3*	86,4*	90,9*	90,6*
HIG2	100*	90,5*	90,9*	90,6*
NDUFA4L2	93,3*	81,8*	90,9#	84,8*
STC2	76,9**	77,8***	90***	82,1*

Примечание. Уровень значимости отличия от контроля: * $p = 0,0000$; ** $p = 0,001$; *** $p = 0,0001$; # $p = 0,0003$.
 Note. Significance level of differences from control: * $p = 0.0000$; ** $p = 0.001$; *** $p = 0.0001$; # $p = 0.0003$.

трансмембранным членом семейства карбоксиангидраз. CA9 катализирует обратимое гидратирование диоксида углерода в гидрокарбонат, позволяя, таким образом, опухолевым клеткам поддерживать нейтральный уровень pH внутри клетки, закисляя при этом внеклеточное микроокружение. Карбоксиангидраза 9 функционально вовлечена в прогрессию опухоли как фактор, способствующий выживанию раковых клеток при гипоксии и ацидозе через регуляцию уровня pH, а также клеточной адгезии, и экспрессируется в опухолях при светлоклеточном ПКР [6].

Ген EGLN3 (egl nine homolog 3 – EGL-9 семейства индуцируемого гипоксией фактора 3; также называемый prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 – пролилгидроксилазы доменсодержащий белок 3, PHD3) кодирует гидроксилазу, экспрессия которой является HIF1-зависимой и способствует предупреждению апоптоза в клетках в условиях гипоксического стресса. При нормальных условиях PHD3 гидроксилирует HIF1A, который затем связывается с VHL, убиквитинируется и деградирует через протеасому. Была выявлена еще одна важная функция PHD3 – гидроксилирование и активация HIF1A – коактиватора PKM2 [7].

Ген HIG2 (hypoxia inducible gene 2 – индуцируемый гипоксией ген 2) – важный стимулирующий фактор роста опухолевых клеток. В ряде работ было показано, что HIG2 является прямой мишенью HIF1 и принимает непосредственное участие в липидном обмене в условиях гипоксии при раке [8]. Повышенная экспрессия HIG2 часто обнаруживается при светлоклеточном ПКР и коррелирует с плохим прогнозом у пациентов [9].

Ген NDUFA4L2 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2 – дегидрогеназы

(убихинон) 1-альфа подкомплекса субъединица 4-го типа) – компонент дыхательной цепи в митохондриях. Эта субъединица 1-альфа подкомплекса дыхательной цепи, локализованного на внутренней стороне митохондриальной мембраны. Данный ген имеет выраженную зависимость экспрессии от гипоксии, более того, в промоторе NDUFA4L2 обнаружены сайты связывания для HIF1 [10]. Вероятно, физиологическая роль NDUFA4L2 заключается в тонкой регуляции окислительного фосфорилирования через взаимодействия с другими субъединицами внутри комплекса, и гиперэкспрессия его при раке может коррелировать с нарушением энергетического метаболизма. Значение функционирования этого гена при ПКР мало изучено. Известно, что ген повышенно экспрессируется при светлоклеточном ПКР и коррелирует с плохим прогнозом [11, 12].

Ген STC2 (stanniocalcin 2 – станинокальцин 2) кодирует гликопротеиновый гормон, вовлеченный в почках в регуляцию транспорта кальция и фосфора. Станинокальцин 2 играет важную роль в ответе на неправильно сложенные белки. STC2 может выполнять роль положительного регулятора опухолевой прогрессии при гипоксии [13, 14].

Все изученные гены обладают существенными функциями, связанными с развитием злокачественной опухоли. На основе полученных данных была проведена оценка чувствительности и специфичности при потенциальном использовании экспрессии указанных генов в качестве диагностических маркеров светлоклеточного ПКР (табл. 2).

Полученные результаты демонстрируют хорошую чувствительность и специфичность в определении светлоклеточного ПКР для всех изученных генов на 3 начальных стадиях прогрессирования заболевания.

Таблица 2. Чувствительность и специфичность маркеров на основе определения экспрессии генов на различных стадиях развития светлоклеточного почечно-клеточного рака, %

Table 2. Sensitivity and specificity of the markers based on the level of gene expression in different stages of clear-cell renal cell carcinoma, %

Ген Gene	Чувствительность/специфичность Sensitivity/specificity			
	I стадия Stage I	I + II стадии Stage I + II	III стадия Stage III	I + II + III стадии Stage I + II + III
<i>CA9</i>	100/100	90,9/95,4	100/100	93,9/97,0
<i>EGLN3</i>	93,3/100	86,4/95,4	90,9/90,9	90,6/93,9
<i>HIG2</i>	100/100	90,5/90,5	90,9/100	90,6/93,7
<i>NDUFA4L2</i>	93,3/100	81,8/90,9	90,9/90,9	84,8/90,9
<i>STC2</i>	76,9/92,3	77,8/88,9	90,0/100	82,1/92,9

Наилучшие показатели, особенно на I стадии – наиболее важной для ранней диагностики, наблюдали для генов *CA9* и *HIG2*. Следует отметить, что показатели чувствительности и специфичности, приведенные в табл. 2, характеризуются 95 % доверительным интервалом (ДИ), составляющим для генов *CA9* и *HIG2* при I стадии светлоклеточного ПКР 78,2–100 и 76,8–100 % соответственно. Для генов *NDUFA4L2* и *EGLN3* 95 % ДИ при определении чувствительности составляет 68,0–99,8 %, специфичности – 72,2–100 %. Подобными интервалами также характеризуются чувствительность и специфичность исследуемых маркеров на других стадиях светлоклеточного ПКР.

Если для I стадии полученные чувствительность и специфичность являются максимально возможными, то для опухолей, находящихся на других стадиях, эти величины несколько ниже. В связи с этим была проведена оценка возможности повышения чувствительности при определении 2 генов. Одновременный анализ экспрессии генов *CA9* и *HIG2*, при котором в расчет берется повышенная экспрессия хотя бы одного из них, позволяет увеличить чувствительность выявления светлоклеточного ПКР до 96,8 % (95 % ДИ 81,7–99,9 %) при специфичности 92,9 % (95 % ДИ 76,5–99,1 %). Существенно, что в случае отрицательного результата теста вероятность отсутствия светлоклеточного ПКР составляет 96,3 % (95 % ДИ 81,0–99,9 %).

Хотя светлоклеточный ПКР является преобладающим, представляло интерес определить характер экспрессии изучаемых генов при других типах рака, на которые приходится 15–20 % случаев. При изучении экспрессии генов *CA9* и *HIG2* в выборке из 12 образцов, включающей папиллярный и хромофобный рак, а также онкоцитому, было найдено повышение экспрессии какого-либо из этих генов в 41,7 % случаев. При этом оказалось, что в таком же проценте случаев экспрессия *CA9* понижена. При изучении всех 5 генов отмечена наибольшая частота пониженной

экспрессии при других, чем светлоклеточный ПКР, типах опухолей для гена *STC2* – 83,3 % ($p = 0,0006$). Это означает, что ген *STC2* с высокой частотой экспрессируется пониженно относительно контроля в других, несветлоклеточных, типах опухолей почки. Характеристики его экспрессии позволяют с чувствительностью 83,3 % (95 % ДИ 51,59–97,91 %) и специфичностью 91,7 % (95 % ДИ 61,52–99,79 %) детектировать эти типы ПКР. Пониженная экспрессия гена *STC2* дает возможность дифференцировать светлоклеточный и другие типы рака ($p = 0,0002$).

Анализ панели из 3 генов – *CA9*, *HIG2* и *STC2* – показал, что при светлоклеточном ПКР одновременно повышенная экспрессия генов *CA9* или *HIG2* и пониженная экспрессия *STC2* наблюдается в 3 % случаев, при других типах ПКР был отмечен один такой случай.

Следовательно, экспрессионная панель из генов *CA9*, *HIG2* и *STC2* с высокой достоверностью позволяет диагностировать светлоклеточный ПКР, отличая его от других типов ПКР. В целом, хотя разработанная панель ориентирована на диагностику светлоклеточного ПКР, она позволяет выявлять и другие его типы. Оценочно, ПКР в среднем может быть обнаружен в 94 % случаев, исходя из долей светлоклеточного и других типов ПКР как 80 и 20 % соответственно.

Более высокая экспрессия *CA9* при светлоклеточном ПКР по отношению к папиллярному раку почки была найдена в работе [15]. Экспрессия гена *CA9* позволяет также дифференцировать доброкачественные и злокачественные кисты почки [16].

При иммуногистохимическом исследовании экспрессия гена *HIG2* была выявлена в 85 % случаев светлоклеточного ПКР [6].

Повышенная экспрессия *CA9* может быть связана с гипометилированием этого гена при светлоклеточном ПКР. Для гена *STC2* также характерны гипометилирование и повышение числа копий при светлоклеточном

ПКР [17]. Эти данные соответствуют цитогенетическим наблюдениям, указывающим на частую амплификацию хромосомы 5q, в которой находится *STC2*, при светлоклеточном ПКР и ее отсутствие при папиллярном и хромофобном раке почки [18]. Более того, при хромофобном ПКР хромосома 5 часто делетирована [19]. Приведенные результаты могут служить структурным основанием впервые выявленных нами отличий в уровне мРНК гена *STC2* между случаями светлоклеточного и других типов ПКР. Вместе с тем, для более полной характеристики экспрессии гена *STC2* при различных типах несветлоклеточного ПКР необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

Таким образом, разработана новая панель, включающая 3 гена (*CA9*, *HIG2* и *STC2*), которая дает возможность с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать ранний светлоклеточный рак почки, отличая его от других типов опухолей почки, на основе определения уровня мРНК методом ПЦР-РВ. Такой подход позволяет быстро (в течение 1 дня) диагностировать светлоклеточный ПКР. Кроме этого, он открывает возможность неинвазивной диагностики рака почки в дальнейшем с помощью определения мРНК найденных диагностических генов в плазме крови пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с. [Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2012. Eds. by: M.I. Davydov, E.M. Aksel'. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs, 2014. 226 p. (In Russ.)].
2. Ljungberg B., Bensalah K., Bex A. et al. Guidelines on renal cell carcinoma. European association of urology, 2014. 70 p.
3. Caoili E.M., Davenport M.S. Role of percutaneous needle biopsy for renal masses. *Semin Intervent Radiol* 2014;31(1):20–6. DOI: 10.1055/s-0033-1363839. PMID: 24596436.
4. Vetterlein M.W., Jindal T., Becker A. et al. Small renal masses in the elderly: Contemporary treatment approaches and comparative oncological outcomes of nonsurgical and surgical strategies. *Investig Clin Urol* 2016;57(4):231–9. DOI: 10.4111/icu.2016.57.4.231. PMID: 27437532.
5. Marconi L., Dabestani S., Lam T.B. et al. systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of percutaneous renal tumour biopsy. *Eur Urol* 2016;69(4):660–73. DOI: 10.1016/j.euro.2015.07.072. PMID: 26323946.
6. Tostain J., Li G., Gentil-Perret A., Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer* 2010;46(18):3141–8. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.07.020. PMID: 20709527.
7. Luo W., Hu H., Chang R. et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011;145(5):732–44. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.054. PMID: 21620138.
8. Gimm T., Wiese M., Teschemacher B. et al. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1 FASEB 2010;24(11):4443–58. DOI: 10.1096/fj.10-159806. PMID: 20624928.
9. Seo T., Konda R., Sugimura J. et al. Expression of hypoxia-inducible protein 2 in renal cell carcinoma: a promising candidate for molecular targeting therapy. *Oncol Lett* 2010;1(4):697–701. DOI: 10.3892/ol_00000122. PMID: 22966366.
10. Fredlund E., Ovenberger M., Borg K., Pählman S. Transcriptional adaptation of neuroblastoma cells to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366(4):1054–60. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.074. PMID: 18155155.
11. Apanovich N.V., Poyarkov S.V., Peters M.V. et al. The differential gene expression in clear cell renal cell carcinoma and biomarker development. *Eur Hum Gen* 2015;23(Suppl 1):446.
12. Minton D.R., Fu L., Mongan N.P. et al. Role of NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Alpha Subcomplex 4-Like 2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2016;22(11):2791–801. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1511. PMID: 26783287.
13. Law A.Y., Wong C.K. Stanniocalcin-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasiveness in hypoxic human ovarian cancer cells. *Exp Cell Res* 2010;316(20):3425–34. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.06.026. PMID: 20619259.
14. Yeung B.H., Law A.Y., Wong C.K. Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 2012;349(2):272–80. DOI: 10.1016/j.mce.2011.11.007. PMID: 22115958.
15. Fisher K.E., Yin-Goen Q., Alexis D. et al. Gene expression profiling of clear cell papillary renal cell carcinoma: comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 2014;27(2):222–30. DOI: 10.1038/modpathol.2013.140. PMID: 23887297.
16. Li G., Bilal I., Gentil-Perret A. et al. CA9 as a molecular marker for differential diagnosis of cystic renal tumors. *Urol Oncol* 2012;30(4):463–8. DOI: 10.1016/j.urolonc.2010.04.014. PMID: 20822935.
17. Girgis A.H., Iakovlev V.V., Beheshti B. et al. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2012;72(20):273–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0656. PMID: 22926558.
18. The Principles of Clinical Cytogenetics Eds. by: S.L. Gersen, M.B. Keagle. NY: Springer, 2013. Pp. 380–381.
19. Davis C.F., Ricketts C.J., Wang M. et al. The somatic genomic landscape of chromosome renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2014;26(3):319–30. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.014. PMID: 25155756.