

Совместное определение экспрессии и метилирования генов для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака

Н.В. Апанович¹, В.И. Логинов^{1, 2}, П.В. Апанович¹, Д.А. Сергеев³, Т.П. Казубская³,
Б.Ш. Камолов³, Э.А. Брага^{1, 2}, В.Б. Матвеев^{3, 4}, А.В. Карпухин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴факультет фундаментальной медицины ФГБОУ 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. Светлоклеточный почечно-клеточный рак — самый частый и наиболее агрессивный рак почки. Примерно у 30 % пациентов при первичной постановке диагноза выявляют отдаленные метастазы. Это связано с тем, что рак почки на ранних стадиях протекает бессимптомно. Часто (~50 % случаев) рак почки выявляют случайно, при профилактическом осмотре или при обращении по другим причинам. В связи с этим актуально развитие новых методов ранней диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака.

Материалы и методы. Изучены уровни экспрессии матричной РНК и метилирования ряда генов в операционном материале парных образцов (нормальная ткань/опухоль почки; n = 21). Количественное определение экспрессии генов проводили 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). Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции. Метилспецифичную полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

Результаты. В результате совместного анализа уровней экспрессии и метилирования генов разработана система потенциально диагностических маркеров, включающая определение экспрессии ряда белоккодирующих генов и гиперметилирования нескольких генов микроРНК в образцах опухоли. Одновременное определение экспрессии и метилирования позволяет проводить правильную идентификацию опухолей в качестве светлоклеточного почечно-клеточного рака с чувствительностью 95,24 % (95 % доверительный интервал 76,18–99,88 %) и специфичностью 95,24 % (95 % доверительный интервал 76,18–99,88 %).

Заключение. По результатам проведенного исследования разработана система, основанная на определении уровней экспрессии генов CA9, HIG2, EGLN3, NDUF4L2 и метилирования генов MIR9-1, MIR34b/c, MIR124a-3, MIR129-2. В зависимости от требований к чувствительности, надежности определения или простоте выполнения возможны различные сочетания указанных генов.

Ключевые слова: экспрессия генов, метилирование генов, диагностика, почечно-клеточный рак, светлоклеточный рак

Для цитирования: Апанович Н.В., Логинов В.И., Апанович П.В. и др. Совместное определение экспрессии и метилирования генов для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака. Онкоурология 2018;14(4):16–21.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-4-16-21

A joint determination of gene expression and methylation for the diagnosis of clear cell renal cancer

N.V. Apanovich¹, V.I. Loginov^{1, 2}, P.V. Apanovich¹, D.A. Sergeev³, T.P. Kazubskaya³,
B.Sh. Kamolov³, E.A. Braga^{1, 2}, V.B. Matveev^{3, 4}, A.V. Karpukhin¹

¹Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

⁴Department of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University;
Build. 5, 31 Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119192, Russia

Background. Clear cell renal cell carcinoma is the most frequent and most aggressive kidney cancer. Approximately 30 % at the initial diagnosis reveal distant metastases. This is due to the fact that kidney cancer in the early stages is asymptomatic. Very often (about 50 %), kidney cancer is detected by chance, during a routine examination or during treatment for other reasons. In this regard, the development of new methods of early diagnosis of clear cell renal cell carcinoma is actual.

Materials and methods. The levels of mRNA expression and methylation of a number of genes in the surgical material of paired samples (normal kidney tissue and tumor, 21 clinical cases) were studied. Quantitative determination of gene expression was performed using real-time polymerase chain reaction on a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, USA) using TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA). High molecular DNA was isolated from tissue by phenol-chloroform extraction. Methyl-specific polymerase chain reaction was performed on a T100 Thermal Cycler amplifier (Bio-Rad, USA).

Results. As a result of joint analysis of the levels of gene expression and methylation, a system of potentially diagnostic markers has been developed, including the determination of the expression of a number of protein coding genes and the hypermethylation of several miRNA genes in tumor samples. Simultaneous determination of expression and methylation allows for the correct identification of tumors as SCRv with a sensitivity of 95.24 % (95 % confidence interval 76.18–99.88 %) and specificity of 95.24 % (95 % confidence interval 76.18–99.88 %).

Conclusion. According to the results of the study, a system was developed based on the determination of the expression levels of the CA9, HIG2, EGLN3, NDU4L2 genes and the methylation of the MIR9-1, MIR34b/c, MIR124a-3, MIR129-2. Depending on the requirements for sensitivity, reliability of determination, or ease of implementation, various combinations of these genes are possible.

Key words: gene expression, gene methylation, diagnostics, renal cell carcinoma, clear cell carcinoma

For citation: Apanovich N.V., Loginov V.I., Apanovich P.V. et al. A joint determination of gene expression and methylation for the diagnosis of clear cell renal cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(4):16–21.

Введение

Светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР) — самый частый и наиболее агрессивный рак почки [1]. Рак почки не проявляется симптоматически до поздней стадии заболевания. Более 50 % случаев рака почки выявляется случайно при проведении компьютерной томографии или при ультразвуковом обследовании по другим медицинским показаниям. Однако применяемые методы не позволяют надежно дифференцировать злокачественные опухоли и доброкачественные новообразования, особенно при малых размерах. Поэтому все чаще выполняют биопсии для верификации диагноза, что нашло отражение в рекомендациях Европейской ассоциации урологов, Американской урологической ассоциации и в других работах [2–5]. При этом точность гистологической диагностики невелика, что связывают с недостаточностью материала 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 (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) дает возможность определять экспрессию генов в малом количестве клеток в образце злокачественной опухоли. МикроРНК (миРНК) — класс коротких некодирующих РНК — участвуют в регуляции белоккодирующих генов на посттранскрипционном уровне. Гены миРНК подвержены метилированию, как и гены, кодирующие белки [6]. Гиперметилирование, инактивирующее гены супрессорных миРНК, выявлено в различных типах рака, включая скПКР, и может использоваться в качестве биомаркера для диагностики [7–9].

В настоящей работе описаны гены, дифференциальная экспрессия которых и метилирование при одновременном определении позволяют выявлять скПКР с высокой чувствительностью, специфично-

стью и надежностью. Для этого использованы результаты, полученные нами при исследовании экспрессии и метилирования отдельно [9, 10].

Материалы и методы

В работе было проведено изучение уровней экспрессии матричных РНК и метилирования ряда генов в операционном материале парных образцов (нормальная ткань почки и опухоль). Свежезамороженные образцы нормальной и опухолевой ткани, взятой при операции или биопсии в 21 клиническом случае, получены в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

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

Для анализа полученных результатов использовали встроенную программу Applied Biosystems Step One Plus, которая позволяет сравнить относительные количества целевой последовательности РНК

в опухолевой и нормальной ткани. 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 раза и более от уровня экспрессии в нормальной ткани.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции. Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР) проводили, как описано ранее [11]. Праймеры и условия МС-ПЦР для исследуемых фрагментов генов мРНК описаны в работах [12–15]. Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. ПЦР проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе: 1 цикл при температуре 95 °С 5 мин; 35 циклов – 95 °С 10 с, $T_{отж}$ 20 с, 72 °С 30 с; 1 цикл при температуре 72 °С 3 мин. Ложноположительные результаты из-за неполной бисульфитной конверсии ДНК исключали на стадии подбора праймеров по отсутствию продукта МС-ПЦР на необработанной бисульфитом ДНК. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, Thermo Scientific, США) использовали как контроль для метилированного аллеля, а препарат ДНК человека (#G1471, Promega, США) – как контроль для неметилированного аллеля. Продукты ПЦР от разных генов разделяли одновременно с использованием 2 % агарозного геля.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета стандартных программ Statistica 10.0. Для оценки различий частот использовали точный критерий Фишера. Уровень значимости для выявленных различий принимали равным <0,05.

Результаты и обсуждение

В одних и тех же образцах скПКР определили экспрессию генов *CA9* и *HIG2*, а также метилирование генов *MIR9-1*, *MIR34b/c*, *MIR124a-3*, *MIR129-2*. Каждый из указанных маркеров оказался ассоциирован с скПКР (см. таблицу), что согласуется с полученными ранее данными [9, 10].

На основании определения экспрессии 2 генов – *CA9* и *HIG2* – в качестве опухоли скПКР были идентифицированы 17 (81 %) из 21 образцов. При определении метилирования аналогичный показатель составил 16 (76 %) из 21 образцов. Полученные соотношения статистически значимо не различались ($p = 1,0$), т.е. оба метода демонстрируют одинаковую чувствительность. Сравнение результатов 2 методов по каждому образцу выявило, что совпадение наблюдается в 14 случаях (13 положительных и 1 отрицательный результат). В 7 случаях результаты не совпали. Поскольку использование каждого из методов

Ассоциация генов-маркеров экспрессии и метилирования со светлоклеточным почечно-клеточным раком

Association between expression and methylation marker genes and clear cell renal cell carcinoma

Маркер Marker	Значимость ассоциации, <i>p</i> Significance of association, <i>p</i>
<i>CA9</i>	0,00001
<i>HIG2</i>	<0,00001
<i>MIR9-1</i>	0,009
<i>MIR34b/c</i>	0,015
<i>MIR124a-3</i>	0,050
<i>MIR129-2</i>	0,021

приводит к значимой ассоциации исследуемых характеристик с скПКР ($p = 0,0001$) и значимо ассоциирован каждый из генов-маркеров, был применен подход, основанный на одновременном учете результатов определения экспрессии и метилирования. Исходя из этого принципа, положительным считается результат, полученный любым из 2 использованных методов: в качестве скПКР были идентифицированы 20 (95 %) из 21 образцов. Следовательно, одновременное определение экспрессии и метилирования позволяет существенно увеличить правильную идентификацию опухолей в качестве скПКР с чувствительностью 95,24 % (95 % доверительный интервал (ДИ) 76,18–99,88 %) и специфичностью 95,24 % (95 % ДИ 76,18–99,88 %).

Полученная система маркеров может быть упрощена без существенной потери их характеристик. Определение экспрессии генов *CA9* и *HIG2* совместно с метилированием генов *MIR9-1*, *MIR34b/c* позволяет идентифицировать опухоль скПКР с чувствительностью 90,48 % (95 % ДИ 69,62–98,83 %) и специфичностью 95,24 % (95 % ДИ 76,18–99,88 %) ($p < 0,0001$).

Однако с точки зрения практического использования маркеров имеет значение еще одна характеристика – надежность его выявления. В этом плане вероятность неправильной идентификации опухоли вследствие случайной ассоциации маркера можно значительно уменьшить, если проводить идентификацию на основании выявленной связи с опухолью нескольких маркеров одновременно. В приложении такого подхода к системе 4 генов – *CA9*, *HIG2* и *MIR9-1*, *MIR34b/c* – это может означать присутствие в образце опухоли скПКР одновременно хотя бы 2 маркеров. Соответствующий расчет на основе полученных данных показывает, что платой за повышение надежности будет некоторое снижение чувствительности до 76,19 % при слабом понижении специфичности до 90,48 %. Надежность можно дополнительно

повысить, вернувшись к большему числу применяемых маркеров и добавив определение экспрессии генов *EGLN3* и *NDUF4L2*, также связанных с скПКР [10]. Эти гены также оказались значимо высокоассоциированными с скПКР ($p = 0,0005$ и $0,0005$ соответственно). Следует отметить, что ассоциация каждого из изученных в данной работе генов с скПКР суммарно с выполненными ранее работами [9, 10] продемонстрирована на выборках, включающих 66 случаев (при определении экспрессии) и 91 случай (при определении метилирования). При анализе уже 8 генов — *CA9*, *HIG2*, *EGLN3*, *NDUF4L2* (экспрессия) и *MIR9-1*, *MIR34b/c*, *MIR124a-3*, *MIR129-2* (метилирование) — опухоль считали определенной, если это демонстрировали одновременно 4 маркера. Такой подход, существенно повышающий надежность, не повлиял на показатель чувствительности (76,19 %), но повысил специфичность до 95,24 %.

Как обнаружено при анализе, 1 образец опухоли не показал связи ни с одним маркером. Вероятность случайности такого события можно ориентировочно оценить как $(1/2)^8 = 0,004$, т.е. данный образец, скорее всего, был ошибочно отнесен к опухоли скПКР. Однако это требует гистологического подтверждения. Представленные значения чувствительности и специфичности предложенной системы могут быть уточнены в процессе дальнейшей работы.

Таким образом, разработана система потенциально диагностических маркеров, включающая определение экспрессии ряда белоккодирующих генов и гиперметилирования нескольких генов миРНК. Такая система позволяет повысить чувствительность и специфичность по отношению к определению только экспрессии или только метилирования. Формирование из 8 изученных генов подсистем с меньшим их числом позволяет в зависимости от решаемых задач получать различные свойства. Меньшее число исследуемых генов упрощает и удешевляет работу. Ориентация на 1 маркер в качестве признака скПКР дает наиболее высокую чувствительность, а признание в качестве признака одновременное наличие связанных с ним ряда маркеров обеспечивает наибольшую надежность идентификации каждого образца.

Изученные в настоящей работе гены были выбраны на основании предыдущего исследования более широкого их набора, как продемонстрировавшие наилучшие результаты в качестве диагностических маркеров [9, 10].

Известны системы, основанные на измерении уровня экспрессии миРНК, направленные на выявление опухоли скПКР. Например, система *MIR 193a-3p*,

MIR362, *MIR572*, *MIR28-5p* и *MIR378* характеризуется чувствительностью 80 % и специфичностью 71 % [16]. При использовании панели из 2 миРНК (*MIR141* и *MIR1233*) показано, что скПКР потенциально может диагностироваться с чувствительностью 100 % и специфичностью 73 % [17]. Найденная в нашей работе система, основанная только на миРНК, имеет сходные характеристики чувствительности и специфичности.

В то же время одновременное определение экспрессии генов *CA9* и *HIG2* и гиперметилирования группы из 2 или 4 генов миРНК позволяет существенно улучшить эти характеристики связи маркеров с опухолью скПКР. Найденное явление обусловлено, по-видимому, разными функциональными проявлениями изученных генов при скПКР. Гены *CA9*, *HIG2*, *EGLN3*, *NDUF4L2* при развитии скПКР активируются транскрипционным фактором HIF1A при мутации *VHL* или гипоксии и, следовательно, являются одними из начальных звеньев развития опухоли [10, 18]. Повышенная экспрессия *CA9* может быть связана с гипометилированием этого гена при скПКР. Гиперметилированные гены миРНК, наоборот, проявляют низкую активность.

Повышенная частота метилирования изученных генов миРНК может свидетельствовать об онкосупрессорной функции этих миРНК или о регуляции экспрессии онкогенов при скПКР. В частности, такую онкосупрессорную функцию *MIR9* выполняет при раке желудка [19]. Метилирование *MIR129-2* коррелирует с повышением экспрессии ряда онкогенов [20]. Метилирование генов *MIR34b/c*, *MIR124a-3* коррелирует с характеристиками прогрессии опухоли и ассоциировано со снижением их экспрессии [21, 22].

Однонаправленное действие белоккодирующих генов и генов миРНК, но осуществляющееся различными функциональными путями, может не всегда происходить одновременно, что регистрируется как реализация повышенной экспрессии или метилирования в отдельных образцах, дополняя, следовательно, друг друга в качестве маркеров.

Заключение

Разработанные системы могут быть использованы для дальнейшей характеристики на расширенных выборках образцов для создания методов ранней диагностики скПКР на основе биопсийного материала, который уже сейчас широко используется для идентификации злокачественных опухолей малых размеров при диагностике скПКР за рубежом [23]. Полученные результаты лягут в основу разработки метода неинвазивной диагностики в дальнейшем.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Muglia V.F., Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras* 2015;48(3):166–74. DOI: 10.1590/0100-3984.2013.1927. PMID: 26185343.
- Ljungberg B., Bensalah K., Bex A. et al. Guidelines on Renal Cell Carcinoma. European association of urology 2014:70. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.01.005.
- 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.
- 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(40):231–9. DOI: 10.4111/icu.2016.57.4.231. PMID: 27437532.
- 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;69:660–73. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.07.072.
- Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One* 2013;8(1):e54398. DOI: 10.1371/journal.pone.0054398. PMID: 23342147.
- Piletić K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol* 2016;90(10):2405–19. DOI: 10.1007/s00204-016-1815-7. PMID: 27557899.
- Baylin S.B., Jones P.A. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8(9):a019505. DOI: 10.1101/cshperspect.a019505. PMID: 27194046.
- Логинов В.И., Береснева Е.В., Казубская Т.П. и др. Метилирование 10 генов микроРНК при светлоклеточном раке почки и их диагностическое значение. *Онкоурология* 2017;3(13):27–33. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33. [Loginov V.I., Beresneva E.V., Kazubskaya T.R. et al. Methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their diagnostic value. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(3):27:33. (In Russ.)].
- Апанович Н.В., Петерс М.В., Коротаева А.А. и др. Молекулярно-генетическая диагностика светлоклеточного почечно-клеточного рака. *Онкоурология* 2016;12(4):14–8. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-4-16-20. [Apanovich N.V., Peters M.V., Korotaeva A.A. et al. Molecular genetic diagnostics of clear cell renal cell carcinoma. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2016;12(4):16–20. (In Russ.)].
- Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N. et al. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers. *PLoS One* 2015;10(5):e0123369. DOI: 10.1371/journal.pone.0123369. PMID: 25961819.
- Береснева Е.В., Рыков С.В., Ходырев Д.С. и др. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечноклеточном раке; связь с прогрессией рака. *Генетика* 2013;49(3):366–75. DOI: 10.1134/S1022795413030034. PMID: 23755536. [Beresneva E.V., Rykov S.V., Khodyrev D.S. et al. Methylation profile of group of miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma; involvement in cancer progression. *Genetika = Genetika* 2013;49(3): 366–75. (In Russ.)].
- Lee K.H., Lotterman C., Karikari C. et al. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2009;9(3):293–301. DOI: 10.1159/000186051. PMID: 19407485.
- Yang C., Cai J., Wang Q. et al. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. *Gynecol Oncol* 2012;124(2): 325–34. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.10.013. PMID: 22005523.
- Li H.P., Huang H.Y., Lai Y.R. et al. Silencing of miRNA-148a by hyper methylation activates the integrin-mediated signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(17):7610–24. DOI: 10.18632/oncotarget.2282. PMID: 25277193.
- Wang C., Hu J., Lu M. et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. *Sci Rep* 2015;5:7610. DOI: 10.1038/srep07610. PMID: 25556603.
- Yadav S., Khandelwal M., Seth A. et al. Serum microRNA expression profiling: potential diagnostic implications of a panel of serum microRNAs for clear cell renal cell cancer. *Urology* 2017;104:64–9. DOI: 10.1016/j.urology.2017.03.013. PMID: 28336290.
- Wykoff C.C., Beasley N.J., Watson P.H. et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;60:7075–83. PMID: 11156414.
- Meng Q., Xiang L., Fu J. et al. Transcriptome profiling reveals miR-9-3p as a novel tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget* 2017;6(8/23):37321–31. DOI: 10.18632/oncotarget.16310. PMID: 28418879.
- Пронина И.В., Климов Е.А., Бурденный А.М. и др. Метилирование генов микроРНК miR-129-2, miR-9-1, изменение их экспрессии и активация генов потенциальных мишеней этих микроРНК при раке почки. *Молекулярная биология* 2017;51(1):73–84. DOI: 10.7868/S0026898416060161. [Pronina I.V., Klimov E.A., Burdenyy A.M. et al. Methylation of the genes for the microRNAs miR-129-2 and miR-9-1, changes in their expression, and activation of their potential target genes in clear cell renal cell carcinoma. *Moleculyarnaya Biologiya = Molecular Biology* 2017;51(1):61–71. (In Russ.)].
- Cao H., Liu Z., Wang R. et al. miR-148a suppresses human renal cell carcinoma malignancy by targeting AKT2. *Oncol Rep* 2017;37(1):147–54. DOI: 10.3892/or.2016.5257. PMID: 27878305.
- Varachev V., Loginov V., Pronina I. et al. Hypermethylated tumor suppressor microRNAs as novel markers of clear cell renal cell carcinoma. *FEBS Open Bio* 2018;8(1):304–5. DOI: 10.1002/2211-5463.12453.
- 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;69:660–73. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.04.027. PMID: 27157997.

Вклад авторов

Н.В. Апанович: написание статьи, получение данных для анализа, анализ результатов;
 В.И. Логинов: получение данных для анализа;
 П.В. Апанович: статистический анализ полученных данных;
 Д.А. Сергеев: сбор и анализ образцов для исследования;
 Т.П. Казубская, Б.Ш. Камолов: клинические характеристики образцов;
 Э.А. Брага, В.Б. Матвеев: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных;
 А.В. Карпухин: разработка дизайна исследования, анализ результатов, научное редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

N.V. Apanovich: writing an article, obtaining data for analysis, analysis of results;
V.I. Loginov: data acquisition for analysis;
P.V. Apanovich: statistical analysis of the data;
D.A. Sergeev: collection and analysis of samples for research;
T.P. Kazubskaya, B.Sh. Kamolov: clinical characteristics of samples;
E.A. Braga, V.B. Matveev: review of publications on the topic of the article, data analysis;
A.V. Karpukhin: development of research design, analysis of results, scientific editing of manuscript text.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.В. Апанович/N.V. Apanovich: <https://orcid.org/0000-0003-4539-5424>
В.И. Логинов/V.I. Loginov: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>
П.В. Апанович/P.V. Apanovich: <https://orcid.org/0000-0001-8814-1331>
Д.А. Сергеев/D.A. Sergeev: <https://orcid.org/0000-0002-6047-5484>
Т.П. Казубская/T.P. Kazubskaya: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>
Б.Ш. Камолов/B.Sh. Kamolov: <https://orcid.org/0000-0003-0010-6043>
Э.А. Брага/E. A Braga: <http://orcid.org/0000-0001-5188-4094>
В.Б. Матвеев/V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
А.В. Карпукхин/A.V. Karpukhin: <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.