

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Цой Лариса Валерьевна

**Роль молекулярных маркеров в диагностике
почечно-клеточного рака и рака предстательной железы**

14.03.02 - Патологическая анатомия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Варшавский Владимир Анатольевич

Научный консультант:

доктор биологических наук, доцент
Замятнин Андрей Александрович

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	11
1.1. Эпидемиология почечно-клеточного рака	11
1.2. Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика разных гистологических типов ПКР	12
1.3. Эпидемиология рака предстательной железы.....	17
1.4. Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика РПЖ	19
1.5. Молекулярные маркеры	21
1.5.1. Молекулярные маркеры, применяемые в ИГХ диагностике ПКР	24
1.6.2. Молекулярные маркеры, применяемые в ИГХ диагностике РПЖ.....	29
1.5.3. Раково-сетчаточные антигены.....	31
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	36
2.1. Материалы исследования	36
2.2. Морфологическое исследование	36
2.3. Иммуногистохимическое исследование.....	37
2.4. Электронная микроскопия	41
2.5. Иммунологическое исследование сыворотки крови	41
2.6. Генетическое исследование	42
2.7. Статистическая обработка	44
ГЛАВА 3. Результаты исследования и их обсуждение	48
3.1. Морфологическая характеристика.....	48
3.1.1. Опухоли почки.....	48
3.1.2. Опухоли предстательной железы	56
3.2. Иммуногистохимическая характеристика.....	60
3.2.1. Исследование опухолей почек.....	60

3.2.2. Исследование опухолей предстательной железы	112
3.3. Электронномикроскопическая характеристика	115
3.4. Анализ сыворотки крови пациентов	119
3.5. Анализ статуса метилирования ДНК	124
ГЛАВА 4. Общее заключение и выводы	130
Практические рекомендации.....	147
Список сокращений	148
Список литературы.....	150

Введение

Актуальность темы

Во всем мире почечно-клеточный рак (ПКР) является наиболее диагностируемым злокачественным эпителиальным новообразованием почек, и занимает 6-е место у мужчин и 10-е у женщин, что составляет 5% и 3% от всех онкологических заболеваний, соответственно[188].

Согласно последним данным, предоставленным Всемирной организацией здравоохранения, ежегодно происходит более 140 000 смертей, связанных с ПКР, при этом заболевание занимает 13-е место в списке самых распространенных причин смерти от рака в мире [68].

За 2017 г. в России было зарегистрировано 24,8 тыс. больных раком почки, и составило, в структуре нашей страны 4,8% у мужчин и 3,3 у женщин. Средний возраст заболевших, приблизительно 63 года (61 год среди мужчин и 64,1 года среди женщин) [13].

За последние годы выявляемость ПКР в большинстве развитых стран возрастает, что в какой-то степени связано с широким внедрением неинвазивных методов диагностики, позволяющих обнаруживать небольшие бессимптомные опухоли.

Рак предстательной железы (РПЖ), на сегодняшний день, занимает второе место по частоте встречаемости среди злокачественных новообразований у мужчин и пятое место как причина смерти от онкологических заболеваний во всем мире [172].

Заболеваемость РПЖ и показатели смертности тесно связаны с возрастом – самая высокая частота заболевания регистрируется у пожилых мужчин (>65 лет). Кроме возрастных особенностей следует отметить региональную зависимость заболеваемости мужского населения. По данным мировой статистики чаще всего РПЖ диагностируется в Австралии, США и Канаде и меньше всего в африканских и азиатских странах [68].

Доля рака предстательной железы в структуре заболеваемости мужского населения России также неуклонно возрастает. В настоящее время в России РПЖ

занимает 2-е место среди всех онкологических заболеваний у мужчин, уступая лишь раку легких, что делает его важной проблемой здравоохранения. В последние годы данное новообразование выходит на первое место по величине прироста, который за последние 5 лет составил 21-43%[13].

Таким образом, диагностика и лечение данных заболеваний является актуальной. С помощью молекулярных маркеров возможна более ранняя диагностика РПЖ и ПКР. В настоящее время большое значение для диагностики имеет разработка новых маркеров, что поможет идентифицировать наличие опухолевого процесса на ранних стадиях развития и назначить своевременное лечение.

Для разработки новых маркеров ПКР и РПЖ наиболее перспективным является использование с этой целью паранеопластических антигенов (ПНА) — белков, эктопически продуцируемых опухолевыми клетками. [10].

К антигенам, которые могут аберрантно экспрессироваться в почечной ткани при ее злокачественной трансформации, относятся белки, синтезируемые преимущественно в иммунотолерантных тканях (например, нервной или ткани сетчатки глаза). Такие антигены подразделяются на два подтипа: онконевральные антигены и раково-сетчаточные антигены (cancer-retina antigen — CRA) в зависимости от их происхождения. Большинство CRA представляют собой фоторецепторные белки, участвующие в визуальной трансдукции. Их аберрантная экспрессия была отмечена в разных видах злокачественных новообразований, таких как рак желудка, рак легких, колоректальный рак и др. [60][168]. Чаще всего CRA обнаруживались в меланоме, которая экспрессирует такие фоторецепторные белки, как родопсин, трансдуцин, цГМФ-фосфодиэстераза 6, цГМФ-зависимые каналы, гуанилилциклаза, родопсинкиназа, рековерин и зрительный аррестин [22]. Так как CRA происходят из иммунопривилегированной зоны, они чужды иммунной системе и могут проявлять высокую иммуногенность. Действительно, аберрантная экспрессия CRA в злокачественных опухолях, локализованных за пределами сетчатки, способна вызывать ответ иммунной системы, проявляющийся в выработке специфических антител и Т-клеток. Подобные изменения в

функционировании иммунной системы могут приводить к развитию паранеопластических синдромов, отягощающих ход основного заболевания.

Ретинальная дегенерация, как паранеопластический синдром, встречается примерно у 6 % больных раком почки. Некоторые виды CRA были признаны опухолеспецифическими антигенами [22].

Аррестин 1 (Arr-1) также известный как зрительный аррестин, S-антиген, 48 кДа протеин, является фоторецепторным белком, входящим в подсемейство зрительных/сенсорных аррестинов семейства зрительных/бета-аррестинов, которые вместе с альфа-аррестинами составляют большую группу регулирующих белков, разделяющих общую аррестиновую нишу [81][164].

Поскольку Arr-1 обычно сегрегируется гемато-ретиальным барьером, аберрантная экспрессия этого белка является высокоиммуногенной. Так, например, экспрессия Arr-1 в клетках меланомы вызывает выраженную генерацию соответствующих аутоантител, запускающих меланома-ассоциированную ретинопатию (MAR) [170]. Arr-1 может быть классифицирован как CRA.

Рековерин (Rec) - Ca^{2+} -связывающий белок позвоночных животных с молекулярной массой 23,3 кДа, состоящий из 201 аминокислотного остатка [59][114]. В норме рековерин локализован в фоторецепторных клетках сетчатки глаза, где Ca^{2+} -зависимым образом регулирует фосфорилирование родопсина, ингибируя активность родопсинкиназы.

Известно, что при паранеопластической дегенерации сетчатки, ассоциированной с мелкоклеточной карциномой легких, в крови пациентов присутствует высокий титр аутоантител против рековерина, а в опухоли экспрессируется рековерин. В то же время остается неизвестным, экспрессируется ли рековерин в опухолях при немелкоклеточной карциноме легких, а также при опухолях другой локализации.

В представленном исследовании предпринята попытка выяснить происходит ли экспрессия аррестина-1 и рековерина в опухолях предстательной железы и некоторых опухолях почек, таких как онкоцитомы, светлоклеточный, папиллярный и хромофобный ПКР.

Цель исследования

Оценить возможность применения раково-сетчаточных антигенов в диагностике почечно-клеточного рака и рака предстательной железы.

Задачи исследования

1. Изучить экспрессию аррестина-1 и рековерна при почечно-клеточном раке и раке предстательной железы.
2. Изучить продукцию аутоантител против аррестина-1 и рековерина.
3. Изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе экспрессии аррестина-1 и рековерина при злокачественных опухолях почек и предстательной железы.
4. Сопоставить результаты молекулярно-биологического исследования почечно-клеточного рака и рака предстательной железы с клинико-лабораторными данными.
5. Провести корреляционный анализ на основании изучения молекулярно-биологических маркеров почечно-клеточного рака и рака предстательной железы и морфологических форм злокачественных новообразований.

Новизна полученных результатов

1. Впервые была изучена экспрессия аррестина-1 и рековерина при ПКР и РПЖ.
2. Впервые проведено сопоставление экспрессии новых молекулярно-биологических маркеров с известными и широко используемыми для диагностики ПКР и РПЖ маркерами.
3. Впервые получены данные для обоснования теоретической базы использования предлагаемых маркеров для диагностики и последующей разработки лечения названных заболеваний.

Практическая значимость

Полученные результаты способствуют улучшению морфологической диагностики и дают новые возможности для дифференциальной диагностики типов ПКР. Также полученные данные позволяют обосновать прогноз заболевания и возможность использования новых методов терапии названных заболеваний.

Положения, выносимые на защиту.

1. Аррестин-1 и рековерин могут быть использованы в диагностике почечно-клеточных опухолей, однако их применение не целесообразно при раке предстательной железы.
2. AAA-1 и AAR являются сывороточными маркерами опухолей почки.
3. Экспрессия аррестина-1 и рековерина коррелирует с морфологией опухоли, степенью дифференцировки, наличием гематогенных метастазов и коэкспрессией CD10, виментина и CK7.
4. Аберрантная экспрессия аррестина-1 и рековерина в опухолях почки не зависит от изменения статуса метилирования генов SAG и RCVRN.

Связь работы с научными программами, планами, темами.

Представленная диссертационная работа выполнена в соответствии с научно-исследовательской программой на кафедре патологической анатомии им. академика А.И. Струкова лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), также в рамках реализации Гранта РФФИ 16-54-53115 ГФЕН а «Исследование эффектов и механизмов регуляции метастазирования клеточными факторами при раке почки» (грантополучатель А. А. Замятнин)¹.

Внедрение результатов исследования в практику.

Результаты диссертационного исследования используются в работе Централизованного патологоанатомического отделения клинического центра Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, также применяются в учебном процессе кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Представленная на защиту научно-исследовательская работа выполнена с соблюдением этических норм и принципов доказательной медицины. Методология

¹ Выражаю благодарность коллегам за совместную работу.

диссертационной работы предусматривала разработку дизайна исследования, определение объема выборки для обеспечения ее репрезентативности, подбор математических и программных средств статистической обработки полученных данных. Для проведения исследовательской работы использованы современные морфологические и морфометрические методы диагностики.

Результаты исследования докладывались и обсуждались на международной конференции «Актуальные проблемы и перспективы использования молекулярно-генетических маркеров в диагностике и лечении онкоурологических заболеваний» (Москва, 2014), на международной конференции «6th China-Russia International Conference on Medicine, Kharbin, China, June, 2-3» (Китай, Харбин, 2014), на международной конференции «Российско-китайский фестиваль ВУЗовской науки» (Краснодар, 2015), на международной Конференции «2nd European Meeting on Phototransduction» (Швейцария, Аскона, 2016), на научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, 2019).

Диссертация апробирована на заседании кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова ИКМ им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 1 от 24 августа 2020 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – патологическая анатомия, области исследований: «Распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных морфологических исследований при использовании современных технических возможностей патологической анатомии», «Прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания», «Исследование патогенетических механизмов

развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, индексируемых международной базой SCOPUS, 2 публикации в зарубежных изданиях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста, включает 26 рисунков, 43 таблицы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, общего заключения и выводов, списка литературы, содержащего 244 источников, из них 6 отечественных и 238 иностранных.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Эпидемиология почечно-клеточного рака

Согласно последним опубликованным данным, почечно-клеточный рак является одним из наиболее часто диагностируемых злокачественных эпителиальных новообразований. Во всем мире у мужчин занимает 6-е ранговое место и у женщин 10-е, что составляет 5% и 3% всех онкологических диагнозов, соответственно [189].

Несмотря на улучшение диагностики и лечения почечно-клеточного рака, наблюдаемое в течение последних 2 десятилетий, данная патология остается одной из самых летальных злокачественных опухолей в структуре урологических новообразований. С расширением рутинной визуализации, такой, как ультразвуковая диагностика, мультиспиральная компьютерная и магнитнорезонансная томография, применяемой при многих расстройствах, мы наблюдаем все большее число пациентов, у которых ПКР является случайной находкой.

Ежегодно в мире регистрируют более 400 тыс. новых случаев ПКР (2 % среди всех злокачественных новообразований, 15-е ранговое место) и более 140 тыс. смертей от данной патологии (2 % среди всех умерших).

В России, по утверждению Аксель Е. М. и соавторов, в 2017 г. было зарегистрировано 24,8 тыс. новых больных ПКР, в США – 61,6 тыс., в Англии – 12,5 тыс., в Европе – 115,0 тыс. (3 % среди всех злокачественных новообразований, 7-е ранговое место). В структуре заболевших в РФ ПКР в 2017 г. составлял 4,8 % у мужчин и 3,3 % у женщин (в 1990 г. – 2,1 и 1,7 % соответственно). За период с 2012 по 2017 г. стандартизованные показатели заболеваемости в России увеличились на 13,8 % у мужчин (с 12,3 до 14,0 на 100 тыс. населения, мировой стандарт) и на 16,4 % у женщин (6,7 и 7,8 на 100 тыс. населения) [13].

Ежегодно в нашей стране регистрируется 8,4 тыс. смертей от ПКР. В структуре умерших от рака его доля составляла 3,3 % у мужчин и 2,4 % у женщин. В динамике с 2012 по 2017 г. стандартизованные показатели смертности от ПКР в

России снизились у мужчин на 8,8 % (6,1 и 5,5 на 100 тыс. населения, мировой стандарт) и у женщин на 10,0 % (2,0 и 1,8 на 100 тыс. населения) [13].

Почечно-клеточный рак является наиболее распространенным солидным новообразованием, на долю которого приходится около 90% всех злокачественных опухолей почек. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), наиболее частыми гистологическими типами почечно-клеточных опухолей являются светлоклеточный, папиллярный и хромофобный почечно-клеточный рак, а так же онкоцитома и папиллярная аденома [141]. Однако, встречаются и редкие формы, такие как мультилокулярная кистозная опухоль почки низкой степени злокачественности, почечно-клеточный рак, ассоциированный с наследственным лейомиоматозом, карцинома из собирательных трубочек Беллини, медуллярный, почечно-клеточные рак с МiТ-транслокацией, сукцинатдегидрогеназа-дефицитный, муцинозный тубулярный и веретенноклеточный рак, тубулокистозный, почечно-клеточный рак, ассоциированный с кистозной болезнью почек и, имеющая неопределенный злокачественный потенциал - светлоклеточно-папиллярная почечно-клеточная карцинома.

Большинство исследователей не выявляют существенных различий, при анализе срока выживаемости пациентов с разными гистологическими вариантами ПКР. Тем не менее, несмотря на отсутствие корреляции типа опухоли и прогноза заболевания, выделение гистологических типов ПКР считается обязательным, так как каждому типу опухоли присущи определенные молекулярные и генетические изменения, что может повлиять на исход заболевания, а также выбор тактики лечения [56].

1.2. Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика разных гистологических типов ПКР

Светлоклеточный ПКР – злокачественная опухоль, происходящая из канальцевого эпителия. Макроскопически опухоль обычно представлена солитарным узлом, размер которого может варьировать в широких пределах, на разрезе золотисто-желтого, охряно-желтого или серовато-желтого цвета. Оттенки желтого цвета обусловлены наличием в опухолевых клетках значительного

количества липидов, гликогена. Гистологически данный вид опухоли построен клетками со светлой или эозинофильной цитоплазмой, образующих в основном солидные или ацинарные структуры. Помимо типичных солидных и ацинарных структур в светлоклеточном ПКР могут наблюдаться или даже преобладать кистозное, тубулярное, псевдопапиллярное строение. Диагноз обычно не вызывает затруднений в случаях первичной опухоли почки, но, нередко могут возникнуть проблемы в диагностике метастазов, так как клетки многих эпителиальных новообразований и реже сарком могут иметь светлую цитоплазму.

В светлоклеточном ПКР наблюдается коэкспрессия CK 8, 18, 19, эпителиального мембранного антигена (EMA), RCC, PAX2/8, CAIX, а также виментина (Vim), что позволяет отличить его от адренокортикального рака. Кроме того, отмечается положительная реакция с антителами к N-cadherin и негативная с антителами к E-cadherin.

Потеря гетерозиготности, метилирование или мутация в области короткого плеча хромосомы 3 (3p) являются наиболее частыми и характерными генетическими изменениями при светлоклеточном ПКР, обнаруживаются в 91% случаев [206].

В 3 хромосоме расположен ген VHL (von Hippel-Lindau) – один из первых генов, чья связь с развитием светлоклеточного ПКР была определена; является геном-супрессором опухолей, расположенным в области 3p25. Полагают, что изменения гена VHL ассоциированы исключительно с развитием светлоклеточного ПКР, но группа исследователей во главе с van Houwelingen обнаружили мутации гена VHL в 15% случаев с другими видами ПКР в когорте пациентов со спорадическим ПКР. Хотя мутации гена VHL играют значительную роль в развитии светлоклеточного ПКР, это не единственная aberrация в области короткого плеча 3 хромосомы. В случаях скПКР с делецией короткого плеча 3 хромосомы в сочетании с изменениями гена VHL или без них, роль в канцерогенезе, по-видимому, играет инактивация генов-супрессоров опухолей в 3p12-p21 [88].

Многочисленные исследования проводились с целью идентифицировать в этой области потенциальные гены-супрессоры опухолей. Одним из них является ген непрочной гистидиновой триады -FHIT, расположенный в области 3p14. Данная хромосомная транслокация t(3;8)(p14.2;q24) была впервые описана при наследственном ПКР, позже участок потери 3 хромосомы был обнаружен при спорадическом светлоклеточном ПКР [64][121][191][194]. Ген FHIT был обнаружен в этом локусе и при некоторых других злокачественных новообразованиях, включая рак легких, шейки матки, желудка, молочных желез [35][91][205][218][236].

Другим геном в области короткого плеча 3 хромосомы, ассоциированным со светлоклеточным ПКР, является RASSF1A, расположенный в 3p21.3. Белок RASS1A регулирует образование микротрубочек, контролирует клеточный цикл и процесс апоптоза [63].

Папиллярный ПКР – злокачественная эпителиальная опухоль папиллярного и тубулопапиллярного строения, также происходящая из эпителия канальцев почки. Является вторым по частоте видом ПКР, составляя примерно 18 % всех случаев. Опухолевый узел округлой формы, светло-серого цвета с зернистой поверхностью, и хорошо отграничен от окружающих тканей посредством фиброзной псевдокапсулы. В 1997г. В. Delahunt и J.N. Eble предложили деление папиллярного ПКР на две гистологические группы, тип 1 и тип 2 [55]. Тип 1 характеризуется наличием мелких клеток с небольшим количеством цитоплазмы и мелкими ядрами, при типе 2 опухоль состоит из крупных клеток с большим количеством эозинофильной цитоплазмы, крупными сферическими ядрами. Характерным признаком для папиллярных ПКР, является наличие пенистых или ксантомных клеток в опухолевой ткани. Папиллярны рак 2 типа обычно отличаются более агрессивным характером роста, чаще прогрессируют и имеют более низкую дифференцировку, чем опухоли 1 типа [55][166].

Ключевыми иммуногистохимическими маркерами, позволяющими проводить дифференциальную диагностику папиллярного и светлоклеточного

рака, являются виментин, AE1/AE3 (МСК) и Альфа-Метил-КоА-рацемаза (АМАСР), не экспрессирующаяся в других опухолях почки.

При папиллярном ПКР часто отмечается дупликация 7 и 17 хромосом [7][18][52]. По данным ранних исследований, полисомия 7 хромосомы ассоциирована с прогрессированием процесса и более низкой степенью дифференцировки [7]. Прогностическая ценность полисомии 17 хромосомы при папиллярном ПКР неоднозначна. Так I. Balint et al. не обнаружили существенной связи между дупликацией 17 хромосомы и размером опухоли или степенью дифференцировки [18]. Напротив, B. Gunawan et al. и T. Klatte et al. считают, что наличие полисомии 17 хромосомы ассоциировано с меньшим вовлечением лимфатических узлов, менее частым появлением отдаленных метастазов, более благоприятным прогнозом [79][104].

Хромофобный ПКР составляет примерно 5% от злокачественных эпителиальных новообразований почки. Может быть спорадическим и наследственным. Макроскопически опухоль представлена солидным узлом округлой формы, на разрезе коричневатого цвета. Образование кистозных структур для этого типа рака не типично. Гистологически опухоль построена двумя типами клеток: крупными хромофобными клетками полигональной формы с четко-выраженной клеточной мембраной и светлой цитоплазмой; более мелкие клетки с меньшим количеством цитоплазмы.

При сравнении с другими подтипами ПКР, хромофобный ПКР имеет лучший прогноз, так как статистически метастазирует гораздо реже, примерно в 2,5–2,8% случаев [27][171]. Прогрессирование заболевания после хирургического лечения происходит в 4,1–16,3% случаев [9][171].

Иммуногистохимический профиль хромофобного ПКР имеет ряд особенностей, что позволяет дифференцировать его с другими типами опухолей почек. Выявляют положительную реакцию на МСК, коэкспрессию СК 8,18, а также СК 19, E-cadherin и ЕМА, при этом практически всегда отсутствует экспрессия виментина, N-cadherina, RCC маркера и CD 10.

Наследственный хромофобный ПКР обнаруживается у пациентов с синдромом Birt-Hogg-Dube (BHD). В отличие от мутации гена VHL при светлоклеточном ПКР, мутация гена BHD, кодирующего белок фолликулин, редко выявляется при спорадических опухолях почек; поэтому роль фолликулина в спорадическом ПКР неясна [146][149]. Однако, S. Gad et al. отметили мутации гена BHD в 10.9% случаев хромофобного ПКР и в 5,6% случаев онкоцитомы при исследовании 92 спорадических опухолей почки [70].

Частым генетическим изменением при спорадическом хромофобном ПКР является потеря гетерозиготности в 1,2,6,10,13,17 и 21 хромосомах [33][148][184][241]. Нет различий в мутациях при эозинофильном и классическом вариантах хромофобного ПКР [34]. Геном, часто подвергающимся мутациям при спорадическом хромофобном ПКР, является TP53, расположенный в коротком плече 17 хромосомы [48][53][70]. Типичные изменения при FISH реакции – моносомия 17 хромосомы: 1 красный сигнал в области 17 хромосомы.

Онкоцитома. Доброкачественная опухоль, составляющая около 3-5% образований почки. Чаще всего опухоль представлена узлом округлой формы, красно-коричневого цвета, имеющим четкую границу с окружающей тканью. Для данного типа опухоли характерны кровоизлияния, образование кист. Гистологически опухоль имеет ацинарное, солидное или трабекулярное, реже кистозное строение. Представлена преимущественно округлыми или полигональными круглыми клетками с плотной зернистой эозинофильной цитоплазмой, мономорфными ядрами. Строма может быть гиалинизированной или миксоидно-измененной.

В многочисленных исследованиях [3][43][122][132][136][176][185][240][242] авторы пытались определить маркеры, которые могли бы помочь в дифференциальной диагностике онкоцитомы и хромофобного ПКР. Тем не менее, результаты безуспешны. Сложность состоит, прежде всего в том, что онкоцитома показывает сходный иммунный профиль с хромофобным ПКР — это может быть обусловлено родственным происхождением этих опухолей. Также есть множество примеров, которые позволяют предположить, что некоторые опухоли могут

обладать особенностями онкоцитомы и хромофобного ПКР (так называемая гибридная опухоль).

Необходимо учитывать, что при ИГХ отмечается положительная реакция наблюдается с антителами к СК 8, 18, E-cadherin, ЕМА, S100А. Данный вид опухоли является виментин-негативным, что так же характерно для хромофобного ПКР и существенно затрудняет дифференциальную диагностику.

Подобно хромофобному ПКР, синдром VHD предрасполагает к развитию онкоцитомы, но мутация гена VHD редко обнаруживается при спорадических формах [149]. Другими характерными для онкоцитомы генетическими изменениями являются потеря 1,14 и Y хромосом, а также перестройка генов в 11q13 [32][69][94][165][241].

1.3. Эпидемиология рака предстательной железы

Основываясь на оценке GLOBOCAN, в 2018 году во всем мире было зарегистрировано более 1 млн новых случаев рака простаты. Таким образом данное заболевание является вторым по частоте встречаемости среди злокачественных новообразований у мужчин, и в то же время выходит на пятое место, как причина смерти от онкологических заболеваний во всем мире. [68].

Заболеваемость РПЖ и показатели смертности тесно связаны с возрастом – самая высокая частота встречаемости заболевания регистрируется у пожилых мужчин (>65 лет). Кроме возрастных особенностей следует отметить региональную зависимость заболеваемости мужского населения. Стандартизованный возрастной показатель наиболее высокий был в Австралии, США и Канаде и составил 79,1 на 100000 человек. В африканских и азиатских странах показатели заболеваемости, наоборот, оказались ниже (26,6 и 11,5 на 100000 человек соответственно), чем в странах Европы что связано, прежде всего с качеством оказания медицинской помощи и своевременной диагностикой [68].

Международные показатели смертности от РПЖ значительно различаются по всему миру. К 2018 году самые высокие показатели были зафиксированы в центральной части Америки (10,7 на 100000 населения), второе и третье места занимают Австралия и Новая Зеландия (10,2) а также Западная Европа (10,1). Тем

временем самый низкий показатель фиксировался в Азиатских странах, и находился в промежутке 5,4-3,3 на 100тыс человек. Более половины смертей от рака простаты приходятся на лиц, старше 65 лет [68].

Несмотря на высокую заболеваемость, большинство выявленных случаев РПЖ, преимущественно диагностируются при локализованных стадиях заболевания, в связи с чем, наблюдается достаточно высокий процент пятилетней выживаемости, а именно: около 98% в США, до 83% в Западной Европе по данным проекта EUROCARE-5 [172].

По состоянию на 2017 г. в России РПЖ занимает 2-е место среди всех онкологических заболеваний у мужчин, уступая лишь раку легких. В последние годы это новообразование выходит на первое место по величине прироста (за последние 5 лет составил 21-43%). Абсолютное число заболевших увеличилось почти в 2 раза по сравнению с показателями за 2007г.: с 20,2 тыс. до 40,8 тыс. Стандартизированный показатель заболеваемости в России в 2017г. составил 40,5 на 100 тыс. Ежегодно в России от данного заболевания умирает 12,6 тыс, что составило 8,1% среди всех умерших от рака мужчин, занимая 3 ранговое место после рака легкого и желудка [13].

Профилактика и ранняя диагностика заболеваний предстательной железы является одной из важных задач здравоохранения. В современном мире большое внимание уделяется прижизненной гистологической диагностике патологических процессов в ткани предстательной железы, выявляемых. Так, в среднем у 20-40% пациентов, поступающих на обследование по поводу заболеваний предстательной железы, с различными клиническими проявлениями, в т.ч. нарушением мочеиспускания, при проведении пункционной биопсии и дальнейшем изучении гистологического материала, выявляют рак.

РПЖ чаще возникает в периферической зоне (68%), тогда как в центральной и транзиторной он встречается лишь в 8% случаев. Гистологически опухоли предстательной железы чаще всего представлены аденокарциномой, в большинстве случаев – ацинарной аденокарциномой. Однако, существуют и другие варианты строения РПЖ, встречающиеся очень редко: внутримочевниковая

карцинома, протоковая аденокарцинома, уротелиальный рак, аденоплоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак, базальноклеточный рак.

1.4. Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика РПЖ

При макроскопическом исследовании предстательной железы выявить пораженные фрагменты часто не представляется возможным. Поэтому основной акцент в диагностике РПЖ делается на результаты гистологического исследования. При оценке морфологических признаков рака предстательной железы следует обратить внимание, в первую очередь на гистоархитектонику опухоли. Опухолевые железы, в отличие от нормальной ткани, меньше в размерах, плотно прилегают друг к другу, имеют относительно одинаковую форму, а также неровные контуры. Может определяться формирование гломерулоидных структур, образование щелей вокруг опухолевых желез. Характерно наличие признаков инвазивного роста, возможно обнаружение сливающихся желез, тяжей и одиночных клеток. Со стороны ядер отмечается их увеличение, гиперхроматоз, ядрышки, как правило, отчётливо выражены.

При иммуногистохимическом исследовании определяют отсутствие слоя базальных клеток при реакции с антителами к p63, наблюдается положительная экспрессия AMACR, PSA, PSAP.

Обширные исследования генома при раке простаты выявили изменения количества копий и хромосомные перестройки, ассоциированные с канцерогенезом простаты. В частности, увеличение или потеря участков хромосом, включая увеличение в 8q и потери в 3p, 8p, 10q, 13q и 17p [62][118][201]. Некоторые из этих изменений также были обнаружены при ПИН и пролиферативной воспалительной атрофии, что подтверждает их роль в качестве предшественников рака простаты и подчеркивает их значение в прогрессировании рака. Также, несколько ключевых регуляторных генов, подвергающихся изменению числа копий, было картировано в этих хромосомных регионах, включая NKX3.1 в 8p21, PTEN в 10q23 и MYC в 8q24. Соматические точечные мутации при

раке простаты встречаются относительно нечасто, в то время как гены-супрессоры опухолей, такие как TP53, претерпевают изменения в количестве копий [201].

Полагают, что эпигенетические изменения также являются важным фактором в канцерогенезе простаты и могут служить биомаркерами прогрессирования заболевания [123][153][152]. Например, метилирование ДНК участвует в подавлении активности генов (например, GSTP1), участвующих в сигнальной трансдукции, гормональном ответе (MDR1), контроле клеточного цикла (APC, RASSF) и ответе на оксидативные повреждения. Более того, при наличии опухоли простаты обнаруживают глобальные изменения в модификации хроматина, что также выявляется при прогрессировании рака [101][106]; это, скорее всего, приводит к существенным изменениям в экспрессии генов опухолевыми клетками. Одна из ключевых модификаций, ассоциированных с канцерогенезом простаты, это триметилирование 27-ого лизинового остатка гистона H3 (H3K27-me3), которое осуществляется с помощью гистоновой метилтрансферазы Ezh2, ключевого фактора при прогрессировании заболевания и метастазировании [217].

В недавних исследованиях были идентифицированы хромосомные перестройки, которые активируют транскрипционные факторы семейства ETS (ERG, ETV1 и ETV4) в большинстве случаев карцином простаты [89][93][137][143][178][179][207][208]. Наиболее частая перестройка приводит к образованию гена TMPRSS2-ERG, что ведет к экспрессии процессированного белка ERG под контролем чувствительного к андрогену промотора TMPRSS2 [47][93][163][208][224]. Так как TMPRSS2 и ERG расположены на расстоянии около 3 мб в области 21q, то эта перестройка осуществляется посредством либо интерстициальной делеции, что является более частым событием, либо несбалансированной межхромосомной транслокации [93][163]. Частота подобных слияний TMPRSS2-ERG составляет около 15% в случае ПИН высокой степени и около 50% при раке простаты [4][46][144], указывая на то, что эта перестройка происходит после инициации рака или, напротив, соответствует раннему событию, которое предрасполагает к клиническому прогрессированию.

Результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствуют об определенной стадийности генетических изменений при РПЖ: на поздних стадиях прогрессии наблюдаются изменения генов, которые не обнаруживаются на ранних этапах развития опухоли. Так, делеции 6q (ген IGF2R) и 8p (ген NKX3-1) появляются на ранних стадиях РПЖ, в то время как делеции 10q (ген PTEN), 13q (ген RB1), 17p (ген TP53) и амплификации - в ходе прогрессии, главным образом в метастатических и гормоннезависимых опухолях. Для метастатического и гормонрезистентного РПЖ характерны соматические мутации в гене AR [200].

1.5. Молекулярные маркеры

Одними из первых исследователей в мире представивших доказательства антигенных отличий опухолевых клеток от нормальных были Л.А. Зильбер, Г.И. Абелев. Проведенная интенсивная работа в этой области уже к 1965 г. позволила обобщить типичные изменения нормальных клеточных антигенов, связанные с опухолевой трансформацией.

Злокачественная трансформация нормальных клеток сопровождается большими изменениями в структуре и функционировании молекулярных механизмов, более того, нормальные клетки без злокачественной трансформации зачастую начинают продуцировать белок или группу белков, которые в норме не встречаются в данных тканях [6][77]. Исследования, проводимые с целью выявления опухолевых антигенов и их идентификации, облегчают изучение клеточных и молекулярных механизмов опухолевой трансформации, прогрессии опухоли и механизмов уклонения опухоли от иммунного ответа. Таким образом, определение опухолевых антигенов является основным методом в иммунодиагностике злокачественных образований. Также в настоящее время активно развиваются иммунопрофилактика и иммунотерапия некоторых видов опухолей, которые напрямую связаны с увеличением числа идентифицированных опухолевых антигенов [204].

Иммунотерапия опухолей предполагает активацию иммунной системы онкологических больных, с целью разрушения злокачественного новообразования и предотвращения рецидива заболевания. Ключевую роль в противоопухолевом

иммунитете играют цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры), которые распознают и уничтожают опухолевые клетки. Тактика лечения, основанная на активации Т-киллеров, представляется перспективной для развития выраженного и длительного противоопухолевого ответа. В настоящее время, сделан значительный прорыв в развитии противоопухолевой иммунотерапии, благодаря применению адаптивной Т-клеточной терапии и использованию чекпойнт-ингибиторов (моноклональные антитела, блокирующие CTLA-4 и PD1 протеины) [211][86][119][175][210][211][212]. Тем не менее, при обоих видах лечения, наблюдается развитие тяжелых аутоиммунных осложнений, которые, скорее всего, являются следствием нарушения толерантности к собственным антигенам в нормальных тканях.

На сегодняшний день, обнаружено большое число антигенов, распознаваемых противоопухолевыми Т-киллерами. Для удобства, эти антигены были классифицированы следующим образом [29][51][219]:

- Антигены с высокой опухолевой специфичностью.

Антигены 3 классов могут вызвать опухолеспецифический Т-клеточный ответ: вирусные антигены, мутантные антигены и гетероорганные антигены.

- Антигены с низкой опухолевой специфичностью.

В эту категорию антигенов можно отнести дифференцировочные антигены и антигены, полученные в результате гиперэкспрессии генов в клетках опухоли [51].

В исследованиях по состоянию на 2011 год было установлено более 20 антигенов, которые служат опухолевыми маркерами и могут быть выявлены в крови, моче или в тканях онкологических больных. Количество встречающихся в научных трудах опухолевых антигенов гораздо больше.

Гетероорганные антигены

Феномен антигенной дивергенции (появление в злокачественных клетках антигенов, свойственных нормальным тканям, не соответствующим опухоли), впервые был описан в 1965г. Day E. D. [54]. В клетках гепатом крыс автором были обнаружены антигены, которые встречаются только в нормальных тканях почки и селезенки. С тех пор данная тема продолжала изучаться и позже, антигены,

которые обуславливают антигенную дивергенцию, были названы гетероорганными, то есть присущими тканям, не соответствующим опухоли.

Среди данной группы антигенов наиболее изученными оказались те, которые проявили иммуногенность, и вызывали ряд характерных клинических симптомов. К таким антигенам можно отнести онкофетальные антигены, а также **раково-сетчаточные антигенов**. Эти антигены являются нейрональными белками, эктопически синтезируемыми клетками некоторых опухолей (мелкоклеточный рак легких, тимома, гинекологические опухоли, нейробластома) и могут вызывать специфические неврологические нарушения – паранеопластические синдромы. Примером таких синдромов являются: паранеопластическая дегенерация мозжечка при раке молочной железы или яичников; опухолеассоциированная ретинопатия (cancer-associated retinopathy – CAR) у пациентов с мелкоклеточным раком легкого; опсоклонус-миоклонус синдром у больных со злокачественными опухолями молочной железы, фаллопиевых труб или с мелкоклеточным раком легкого. Кроме перечисленных синдромов есть еще 2 нарушения, вызываемых взаимодействием аутоантител с нервно-мышечными синапсами – миастения и миастенический синдром Ламберта-Итона, часто ассоциированные со злокачественной опухолью.

Другим важным источником опухолеспецифических антигенов является группа раково-тестикулярных генов. Включает в себя гены, кодирующие антигены меланомы (MAGE), 25 функциональных генов, расположенных в 3 регионах X хромосомы: MAGEA, MAGEB, and MAGEC [44][127][129]. Также в X хромосоме имеются еще гены BAGE [28], GAGE [15][67], LAGE/NY-ESO1 [42][120], и SSX [80][216], относящиеся к группе раково-тестикулярных.

Наличие уникальных опухолеспецифических антигенов, как правило, ассоциировано с благоприятным прогнозом течения заболевания [20][98][156].

Дифференцировочные антигены

Дифференцировочные антигены представлены протеинами, селективно экспрессируемыми определенным типом опухоли и соответствующей ей здоровой тканью. Большинство маркеров, используемых в диагностике новообразований, являются дифференцировочными антигенами.

На практике, по таким антигенам возможно установление стадии дифференцировки клетки-предшественницы, давшей начало тому или иному типу гемобластоза. Так как при этом заболевании опухолевые клетки остаются на определенной стадии своей дифференцировки. К данному типу антигенов также относятся и серологические маркеры плазмцитомы: белок Бенс-Джонса и моноклональные иммуноглобулины (mIg).

Наибольшее количество идентифицированных антигенов присутствует в клетках меланомы, в которых соответствующий белок часто участвует в биосинтезе меланина. Экспрессия соответствующих генов зависит от MITF (microphthalmia associated transcription factor) [87]. Интересно, что спонтанные иммунные ответы на пептиды, полученные из белков, таких как тирозиназа [31][231], gp100 / pmel17 [99][220][243], Melan-A / MART-1 [50][100], gp75 / TRP1 [226], или TRP2 [225] часто встречается у пациентов с меланомой и здоровых доноров [167][221], что свидетельствует о неполноценной центральной толерантности иммунной системы к этим антигенам. Т-клеточный ответ к данным антигенам, может привести к развитию витилиго, что часто наблюдается у пациентов с меланомой [177][239].

Также стоит упомянуть такие антигены как PSA PSAP, два белка, экспрессируемые в нормальной и опухолевой ткани предстательной железы [49][159]. И наконец, карциноэмбриональный антиген (CEA) часто высоко экспрессируется при колоректальном раке и других эпителиальных опухолях, но также присутствует на более низком уровне в различных нормальных эпителиальных клетках кишечного тракта [82].

1.5.1. Молекулярные маркеры, применяемые в ИГХ диагностике ПКР

В диагностике опухолей почки используется большое разнообразие молекулярных маркеров, наиболее часто применяемые будут представлены в данном обзоре.

Цитокератины

Белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. В процессе злокачественной трансформации клеток обычно повышается экспрессия

СК. Изучение экспрессии СК широкого спектра и специфических СК успешно используется в диагностике опухолей почки [192]. Все основные типы ПКР экспрессируют СК 18. Все ПКР отрицательны к СК 20, что учитывается при дифференциальной диагностике ПКР с другими СК 20-позитивными аденокарциномами [3][5][8][11][14][26][83][126][138][157][192] [227][237]. Другой диагностической важностью обладает тот факт, что СК 5\6 позитивен в 70% случаев уротелиальной карциномы и в 15% рака собирательных трубочек, но не в других опухолях.

СК 7 положителен в большинстве папиллярных ПКР, раке собирательных трубочек и в уротелиальной карциноме, но негативен в большинстве светлоклеточных ПКР [5][26][105][192], он также позитивен в значительном проценте других опухолей. Эти наблюдения указывают на некоторые диагностические особенности при использовании цитокератинов в исследовании почечных новообразований.

При использовании материала в ограниченных условиях тонкоигольной аспирационной биопсии чаще возникает необходимость в подтверждении злокачественности опухоли, а не в установлении типа ПКР. Использование СК хорошо отвечает на поставленные задачи, и их экспрессия варьирует в диапазоне СК широкого спектра, наиболее популярным, возможно, является МСК [83]. Таким образом, чтобы точно определить злокачественную природу первичных или метастатических опухолей почки, нужно использовать целый набор антиСК антител, включая СК широкого спектра, низкомолекулярные и высокомолекулярные СК.

Виментин

Широко известный мезенхимальный маркер виментин, экспрессируется большинством типов ПКР [5][26][85][90][192][198]. Только несколько других карцином коэкспрессируют виментин (рак эндометрия, щитовидной железы и коры надпочечников). Это может быть полезным в дифференциальной диагностике метастазов ПКР. Среди первичных почечных опухолевых образований дифференциальная иммунная реактивность может облегчить типирование

опухоли, так как виментин экспрессируется в большинстве светлоклеточных ПКР (87% – 100%) и в папиллярных ПКР, но очень редко в хромофобных ПКР и онкоцитомах. Однако, в изучении 234 онкоцитом Hes O. и соавторы [85] отметили локальное окрашивание виментином в 73% случаев, хотя характер окрашивания отличался от других почечных новообразований. Авторы сделали вывод, что виментин можно использовать в дифференциальной диагностике различных типов ПКР, но положительное окрашивание виментина не исключает возможности наличия онкоцитомы, особенно в маленьких образцах.

RCC Маркер

RCC является коммерческим названием (Vector Laboratories Inc, Burlingame, California) моноклональных антител против гликопротеина, определяющегося в щеточной каемке здоровых проксимальных канальцев почки [5][11][12][17][136].

Позитивен почти во всех случаях низкодифференцированного светлоклеточного ПКР и папиллярного ПКР, но, обычно, отрицательны в хромофобном ПКР, онкоцитоме и раке собирательных трубочек [12][17][136][223]. Ранние исследования показали, что RCC маркер специфичен для рака почечного происхождения, тем не менее слабая экспрессия была обнаружена в различных других новообразованиях, таких как протоковый рак молочной железы, эмбриональный рак яичка, опухоли паращитовидной железы [17][36]. Недавние исследования предполагают более широкую экспрессию маркера (17% – 100%) в опухолях коры надпочечника, толстой кишки, молочной железы, простаты, яичника, меланомы, легких и паращитовидных желез [17], и в злокачественной мезотелиоме [36].

CD10

CD10 является поверхностным клеточным гликопротеином большинства здоровых клеток, несет функцию энзима, который гидролизует пептидные связи, таким образом снижая клеточный ответ на местные пептидные гормоны. В здоровой почке CD10 экспрессируется подоцитами и клетками щеточной каемки проксимальных канальцев. Экспрессия CD10 аналогична экспрессии RCC маркера, и почти все светлоклеточные ПКР и папиллярные ПКР положительно реагируют с

антителами к CD10, в то время как остальные типы ПКР не реагируют [12][116][160][190].

Широкая экспрессия CD 10 в здоровых тканях сопровождается его экспрессией в растущем списке новообразований, включая новообразования придатков кожи [16], злокачественную мезотелиому [36], эпителиоидную гемангиоэндотелиому [229], светлоклеточный рак яичника [157], уротелиальную карциному [45], рак простаты, аденокарциному поджелудочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, аденокарциному толстой кишки, злокачественную меланому, веретноклеточную саркому, рак легких, эндометриальную стромальную саркому и панкреатическую солидную псевдопапиллярную опухоль [45]. Эти исследования предполагают осторожное использования CD10 в случаях метастазов ПКР.

E-cadherin и почечно-специфический кадгерин

Кальций зависимый белок, играющий ключевую роль в клеточном взаимодействии и в эмбриогенезе. В норме экспрессируется клетками канальцев почки и многими другими типами клеток. Хотя почти все хромофобные ПКР и онкоцитомы экспрессируют E-cadherin, его экспрессия была также описана в других эпителиальных опухолях почки. В то время, как почечноспецифический кадгерин показывает высокую экспрессию в хромофобном раке и онкоцитоме, но почти всегда негативный в светлоклеточном ПКР и папиллярном ПКР [2][5][117][185].

E-cadherin был отмечен в других опухолях обычно в высоком проценте случаев (26%-100%), включая аденокарциному легкого, эпителиальную мезотелиому, уротелиальную карциному и протоковый рак молочной железы. Экспрессия почечноспецифического кадгерина наблюдается только в опухолях почки.

α -Метилацил Коэнзим А Рацемаза [5][105][125][142][213]

Митохондриальный фермент – медиатор окисления жирных кислот, обычно выделяется в нормальных гепатоцитах, эпителии проксимальных канальцев почки, в бронхах и в стенке желчного пузыря [95][142].

AMACR экспрессируется в большинстве папиллярных ПКР [213] и недавно он был обнаружен во многих муцинозных тубулярных и веретенчатых ПКР [110][186], тубулокистозных ПКР [8][14][142][237], ПКР обусловленной транслокацией хромосомы Хр 11 [37], до 68% светлоклеточного ПКР, но реже встречается в хромофобных ПКР или онкоцитомах [5][125][142].

AMACR считается позитивным маркером рака простаты и был описан в различных опухолях (от 7 –92%), включая рак печени и мочевого пузыря, легких, кишечника, желудка, яичника, молочной железы и эндометрия, а также в нейроэндокринных карциномах [95][125][195][213].

PAX2/8

PAX-8 и PAX-2 относятся к группе *paired box* (PAX) генов, кодирующих ключевые в органогенезе щитовидной железы, почки и Мюллеровой системы транскрипционные факторы [30][115][150][169]. В почке взрослого человека PAX8 обнаруживается в эпителиальных клетках канальцев почки и в капсуле Боумана-Шумлянского [209]. Считается специфическим маркером ПКР.

Также экспрессия PAX8 наблюдается в раке щитовидной железы, нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы, раке яичников.

Карбоангидраза IX (CAIX)

CAIX представитель большого семейства металлоферментов цинка, катализирующих обратимую гидратацию углекислого газа и воды до бикарбоната и протона. CAIX трансмембранный белок, впервые обнаруженный в клетках рака шейки матки [162]. В условиях гипоксии ген CAIX индуцируется его регулятором транскрипции - гипоксией-индуцируемым фактором (HIF-1). Способствует локальному повышению кислотности, что приводит к росту опухоли и метастазированию. Другой механизм, регулирующий повышенную экспрессию CAIX в тканях опухоли – это мутации опухолесупрессирующего гена VHL.

Экспрессируется в основном в скПКР, кишечнике, также уровень эктопически повышается во многих типах опухолей, таких как немелкоклеточный рак легких, рак молочной железы и рак шейки матки.

S100A1

Представитель группы белков S100, кодируемый генами в 1q21. Является Ca^{2+} связывающим белком, участвующим в межклеточном взаимодействии, регуляции клеточного цикла и дифференцировке клеток. В норме присутствует в клетках миокарда, скелетной мускулатуры, гладкомышечных клетках, коже, головном мозге, адипоцитах и почках. Применяется в диагностике ПКР [202], меланомы [196].

1.6.2. Молекулярные маркеры, применяемые в ИГХ диагностике РПЖ

На данный момент выявлено большое количество молекулярных маркеров РПЖ, которые можно условно разделить на 2 группы:

- маркеры, используемые для диагностики РПЖ
- маркеры, определяющие потенциал злокачественности РПЖ.

В первую группу можно отнести цитокератины, определяемые в базальном эпителии (панцитокератин, СК 5/6, высокомолекулярный СК) и маркер p63, который является функциональным гомологом p53.

p63 – ядерный белок, экспрессируется в ткани предстательной железы только в базальном слое эпителия, играет важную роль в его формировании. При РПЖ экспрессия p63 значительно снижается, но определяется в базальном слое доброкачественных структур. Данный белок также выявляется в миоэпителиальных клетках молочной железы и бронхов, плаценте, герминативных центрах фолликулов, плоскоклеточной карциноме легкого.

α -Метилацил Коэнзим А Рацемаза (AMACR)

Начиная с 2000 г. AMACR рассматривается в качестве онкомаркера. Методом ДНК-микроматриц было выявлено повышение его экспрессии при РПЖ. Данный маркер позитивен в 80-100% случаев РПЖ. Однако, по данным различной литературы рацемаза выявляется в 15-20% случаев простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) и в 15% при атипической аденоматозной гиперплазии, и даже в нормальных железах простаты, и в эпителии семенных пузырьков. В последнее время рекомендуется использовать ПИН-коктейль,

включающий AMACR и p63. Что способствует правильной постановке диагноза [96][151].

Простатический специфический антиген

Простатический специфический антиген (PSA) кодируется геном, расположенным в 19 хромосоме, и синтезируется секреторным эпителием предстательной железы. По функциям PSA – протеолитический фермент из семейства каликреинов. Основным субстратом для PSA являются белки, содержащиеся в эякуляте и обуславливающие его гелеобразную консистенцию. PSA расщепляет эти белки, способствуя разжижению спермы, благоприятно влияя на подвижность сперматозоидов. В сыворотке крови находится в свободном и связанном с белками состоянии. Лабораторно определяется уровень как общего, так и свободного PSA.

PSA локализуется в цитоплазме неопухолевых glandулярных клеток, расположенных во всех зонах предстательной железы. Его экспрессия отсутствует в базальных клетках, клетках семенных пузырьков и протоков, а также в уротелии. Данный белок экспрессируется во всех аденокарциномах простаты [65][72][147], и в опухолях других локализаций (зрелая тератома, аденокарцинома из парауретральных желез у женщин, виллезная аденома и аденокарцинома мочевого пузыря, экстрамаммарная болезнь Педжета, плеоморфная аденома и аденокарцинома слюнной железы у мужчин).

Простатическая специфическая кислая фосфатаза

Экспрессия простатической специфической кислой фосфатазы (PSAP) весьма близка к экспрессии PSA. Оба маркера используются в дифференциальной диагностике РПЖ с опухолями другого происхождения. PSAP присутствует в нормальных структурах и в гиперплазии лишь в апикальной части эпителиальных клеток, отмечается повышение ее экспрессии в структурах ПИН высокой степени и значительное повышение в высокодифференцированных аденокарциномах, но она не всегда обнаруживается в низкодифференцированном РПЖ. Кроме того, этот маркер не считается органоспецифичным, выявляется в ряде других тканей: уретра, парауретральные железы, мочевого пузыря, островковые клетки поджелудочной

железы, каналы почки, нейроэндокринные клетки толстой кишки, париетальные клетки желудка, гепатоциты, протоки молочной железы, анус и анальные железы мужчин. Экспрессируются в опухолях непростатического происхождения: зрелая тератома, аденокарцинома мочевого пузыря, карциноид прямой кишки и др. гастроинтестинальные карциноиды, протоковая карцинома молочной железы, плеоморфная аденома, аденокарцинома слюнной железы (только у мужчин) [65][72][147].

Ki-67

Ki-67 относится к белкам регуляторам, появляется при вступлении клетки в митоз. Данный факт позволяет использовать его в качестве универсального маркера пролиферации при оценке роста злокачественных опухолей, в том числе РПЖ. Данный индекс является независимым показателем прогноза рецидива и выживаемости больных с РПЖ [145][158][197].

Общим свойством большинства вышеописанных маркеров является их экспрессия как в опухолях, так и в нормальной почечной ткани. В настоящее время появляется все больше данных о другом типе потенциальных биомаркеров опухоли - онконевроальных антигенах, нейрональных белках, аберрантно экспрессирующихся в опухолевых клетках. Их уникальными особенностями являются специфичность для соответствующих раковых клеток, а также иммуногенная активность, приводящая к образованию аутоантител в сыворотке. Эти особенности способствуют применению онконевроальных антигенов в диагностике и, кроме того, в иммунотерапевтических методах, направленных на стимулирование иммунного ответа против раковых клеток различных опухолей.

1.5.3. Раково-сетчаточные антигены

Группа фоторецепторных белков, специфичных для сетчатки глаза, аберрантная экспрессия которых наблюдается в злокачественных опухолях (раково-сетчаточные антигены). Примером таких белков являются реCOVERин, родопсин, трансдуцин, фосфодиэстераза 6, cGMP-зависимая гуанилилциклаза 1, родопсинкиназа и аррестин 1. Их наличие было выявлено в клетках меланомы [25].

Аберрантная экспрессия этих белков тканями меланомы может вызывать иммунную реакцию у пациентов.

Аррестин 1 (Arr-1) также известный как зрительный аррестин, S-антиген (SAG), 48 кДа протеин, кодируется геном SAG, является фоторецепторным белком, входящим в подсемейство зрительных/сенсорных аррестинов семейства зрительных/бета-аррестинов, которые вместе с альфа-аррестинами составляют большую группу регулирующих белков, разделяющих общую аррестиновую нишу [81][164]. Еще в 70-е годы прошлого века было установлено, что введение кролику водорастворимой фракции, полученной из сетчатки, индуцирует аутоиммунный увеит. Фактор, вызывающий аутоиммунный увеит, был назван S-антиген. Позже было установлено, что S антиген и аррестин-1 это один и тот же белок. Дальнейшие исследования показали, что у многих животных, включая приматов, вызванный S-антигеном экспериментальный увеит по своим клиническим проявлениям и гистологически похож на некоторые формы увеита у людей.

Альфа и бета-аррестины — это повсеместно распространенные белки, экспрессируемые в каждой здоровой ткани, тогда как экспрессия зрительных/сенсорных аррестинов ограничена сетчаткой глаза. Хотя мРНК Arr-1 была обнаружена в некоторых иммунопривилегированных тканях, таких как головной мозг, костный мозг и плацента, в здоровых тканях, отличных от сетчатки, не было обнаружено данного белка [25]. Поскольку Arr-1 обычно сегрегируется гемато-ретиальным барьером, аберрантная экспрессия этого белка является высокоиммуногенной. Так, например, экспрессия Arr-1 в клетках меланомы вызывает выраженную генерацию соответствующих аутоантител, запускающих MAR [170]. Arr-1 может быть классифицирован как раково-сетчаточный антиген, недавно обнаруженная группа белков сетчатки, аберрантная экспрессия которой является феноменом, который может быть перспективно использован для диагностики и лечения рака [76]. Существуют доказательства, того, что Arr-1 может относиться к раково-сетчаточным антигенам, большинство из которых связаны с меланомой [21]. Например, аутоантитела против Arr-1 (AAA-1) были обнаружены у пациентов с MAR. Между тем, только несколько работ показывают,

что аберрантная экспрессия Arr-1 связана с другими злокачественными новообразованиями. Присутствие AAA-1 было обнаружено в образцах сыворотки, полученных от пациентов с раком молочной железы [140] и тератомой яичника [215]. Тем не менее, все данные, касающиеся Arr-1 при злокачественной опухоли, основаны на обнаружении AAA-1 только у пациентов с диагностированной CAR. Насколько нам известно, нет никакого другого злокачественного заболевания, кроме меланомы, где аберрантная экспрессия Arr-1 была обнаружена прямо, но не косвенно, посредством обнаружения AAA-1.

РеCOVERIN является типичным представителем семейства нейрональных Ca^{2+} -сенсоров, высокоспецифичный для фоторецепторных клеток сетчатки. Функция реCOVERина в фоторецепторной клетке заключается в Ca^{2+} -зависимой регуляции десенситизации фотоактивированного рецептора (родопсина) путём его фосфорилирования, катализируемого ферментом родопсинкиназой. При высокой концентрации ионов кальция реCOVERин находится в комплексе с фоторецепторной мембраной и взаимодействует с родопсинкиназой, что приводит к ингибированию фермента.

Впервые был найден в сетчатке глаза быка [61][114], в дальнейшем также был выявлен в сетчатке глаза человека [107][139][230]. РеCOVERин выступил в роли паранеопластического антигена после того, как была обнаружена его экспрессия злокачественной опухолью [1], доказана его способность вызывать аутоиммунную реакцию организма, вследствие чего у некоторых пациентов с онкологическими заболеваниями развивалась CAR [203].

В 1976 году рядом авторов были обследованы пациенты с резким ухудшением зрения и последующим развитием рака легких [183]. В дальнейшем появились предположения об аутоиммунной природе развития ретинопатии [102], что было подтверждено экспериментальным путем: сыворотка крови пациентов с CAR-синдромом окрашивала срезы сетчатки и клетки в культуре мелкоклеточного рака легких [78][109][108]. В проводимых позже исследованиях было показано, что в роли CAR-антигена может выступать белок с молекулярной массой 23 кДа [203].

Этот белок был получен и изучен: его первичная структура оказалась идентичной структуре рековерина [61][168].

Впервые, экспрессия рековерина в ткани мелкоклеточного рака легких была показана у пациентов с CAR-синдромом [134][133][168][234]. В этой же работе авторы утверждали, что экспрессия рековерина злокачественными новообразованиями может быть выявлена только при наличии ретинопатии и высокого титра антител против рековерина (AAR) [168].

Однако, Maeda et al. [130] в дальнейших исследованиях выявили, что рековерин может экспрессироваться в клеточных линиях опухолей различного происхождения и места расположения: в клетках рака легких, рака шейки матки, эндометрия, желудка, молочной железы, пищевода, ротовой полости. В следующих исследованиях этими же авторами был обнаружен рековерин и его мРНК в тканях различных опухолей у пациентов без развития CAR-синдрома [131].

Российскими авторами также был описан случай появления антител против рековерина в сыворотке крови пациентов без развития паранеопластической дегенерации сетчатки [181].

ПКР и РПЖ до сих пор считаются одними из самых неблагоприятных злокачественных урологических заболеваний с точки зрения прогноза. Кроме того, отсутствие симптомов, характеризующих ранние стадии рака, делает его выявление и диагностику сложной проблемой. Несмотря на то, что, проведено множество исследований, в результате которых определены более 80 различных биомаркеров для ПКР и РПЖ, проблема их эффективности до сих пор не решена. Таким образом, надежных биомаркеров для раннего выявления опухолей все еще не существует, поскольку доступные антигены недостаточно чувствительны и/или специфичны. Напротив, несколько комбинаций маркеров предлагаются для различных диагностических целей, таких как дифференциальная диагностика подтипов ПКР. Кроме того, большое количество прогностических и диагностических биомаркеров делает возможным мониторинг и прогноз клинко-патологических характеристик заболевания (таких как вероятность рецидива и метастазирования, выживаемость, эффективность терапии и т.д.) до лечения, после

операции или во время химиотерапии, включая введение новых таргетных препаратов. Тем не менее, несмотря на некоторый прогресс в этой области, необходимы дальнейшие исследования, направленные на сбор большего количества клинических данных для существующих маркеров ПКР и РПЖ, поиск новых антигенов и выявление новых корреляций для получения более точных диагностических воздействий. Кроме того, выяснение роли идентифицированных белков биомаркеров в патогенезе ПКР и РПЖ представляется перспективным направлением исследований, поскольку эти данные могут быть полезны не только для диагностики, но и для разработки новых стратегий лечения этих заболеваний.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Материалы исследования

В исследование включены послеоперационный материал и сыворотка крови 137 пациентов, проходивших лечение в институте уронефрологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (директор клиники - д.м.н., профессор Леонид Михайлович Раппопорт). Из них у 121 пациента был установлен диагноз «опухоль почки» и у 16 – «опухоль простаты». Все пациенты проходили дополнительное офтальмологическое исследование, для исключения патологического процесса в сетчатке глаза. Таким образом, в группу исследования были включены пациенты без развития CAR. Работу проводили на базе биопсийной лаборатории и лаборатории электронной микроскопии и иммуногистохимии централизованного патологоанатомического отделения Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (заведующий ЦПАО к.м.н. Нина Борисовна Парамонова), а также на базе института молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (директор института д.б.н., профессор Андрей Александрович Замятнин). Клинические данные получены из историй болезней и направлений на гистологическое исследование материала.

Изучение материала проводили с помощью комплекса методов: гистологическое, иммуногистохимическое, электронномикроскопическое, генетическое исследование, исследование сыворотки крови на наличие аутоантител, а также статистический анализ данных.

Из выборки были исключены опухоли с массивными очагами распада, некроза и кровоизлияниями в связи с низкой репрезентативностью при изучении экспрессии новых антигенов.

2.2. Морфологическое исследование

Фрагменты ткани опухоли почки и предстательной железы размером 1,0x1,0x0,4 см фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Далее осуществлялась проводка материала по стандартной методике и заливка в парафин. На микротоме с парафиновых блоков готовились

срезы толщиной 3-4 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, трихром по Масону, выполнялась PAS реакция.

При световой микроскопии проводилась верификация диагноза опухолей почек и простаты: светлоклеточный ПКР, папиллярный ПКР, хромофобный ПКР, онкоцитома, а также ацинарная аденокарцинома предстательной железы [141]. Степень дифференцировки ПКР (G) оценивалась только в случаях светлоклеточного и папиллярного типа ПКР, в соответствии с рекомендациями ВОЗ и международного общества уропатологов (ISUP) от G1 до G4.

Степень дифференцировки рака простаты (G) оценивалась согласно общепринятой шкале по D. Gleason, пересмотренной в 2015г [66] от G1 до G4, где G1 соответствует сумме баллов по Gleason ≤ 6 , G2 – 7 баллов, G3 – 8 баллов, G4 – ≥ 9 баллам.

TNM стадию заболевания определяли в соответствии с классификацией злокачественных опухолей мочеполовой системы [141].

2.3. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование с набором антител (таблица 1) проведено по стандартной методике, описанной в протоколе фирмы-производителя, при помощи автоматизированного иммуногистостейнера Leica Bond Max (Германия).

Таблица 1. Характеристика первичных антител.

Название	Метка	Клон	Производитель	Каталожный номер	Рабочее разведение
RCC	М ² ,Ц ³	PN-15	DCS	RI749R06	1:100
Vimentin	Ц	SP20	DCS	VI686R06	1:200
CD10	М	56C6	DCS	CI804R06	1:50
PAX8	Я ⁴	4H7B3	Diagnostic BioSystems	PDM180	RTU ⁵
CK7	Ц	CAM 5.2	DCS	CI035R06	RTU
EMA	М, Ц	E29	DCS	EI947R06	1:300
E-cadherin	М	IHC564	DCS	EI159R06	1:200
S100A	Ц	4C4.9	DCS	SI075R06	1:200
AMACR (P504S)	Ц	SFI-4	DCS	PI858R06	1:100
p63	Я	SFI-6	DCS	PI006R06	1:200
PSA	Ц	IHC654	DCS	PI178R06	1:200
PSAP	Ц	PASE/4LJ	Diagnostic BioSystems	Mob 085	1:100
Arrestin-1	Ц, Я	C-1	Santa cruz biotechnology	sc-271159	1:100

Антитела к реоверину были предоставлены д.б.н., профессором, заведующим отделом сигнальных путей клетки П.П. Филипповым (МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского)⁶. Для антител к реоверину и характерно цитоплазматическое окрашивание, рабочее разведение 1:100. В качестве положительного контроля использовалась ткань сетчатки глаза (рисунок 1а, б), а

² М – мембранное окрашивание

³ Ц – цитоплазматическое окрашивание

⁴ Я – ядерное окрашивание

⁵ Ready-to-use – готовый к применению

⁶ Выражаю благодарность д.б.н., профессору Павлу Павловичу Филиппову за помощь в работе.

для отрицательного контроля использовались образцы ткани почки пациентов с диагнозом мочекаменная болезнь (рисунок 1в, г).

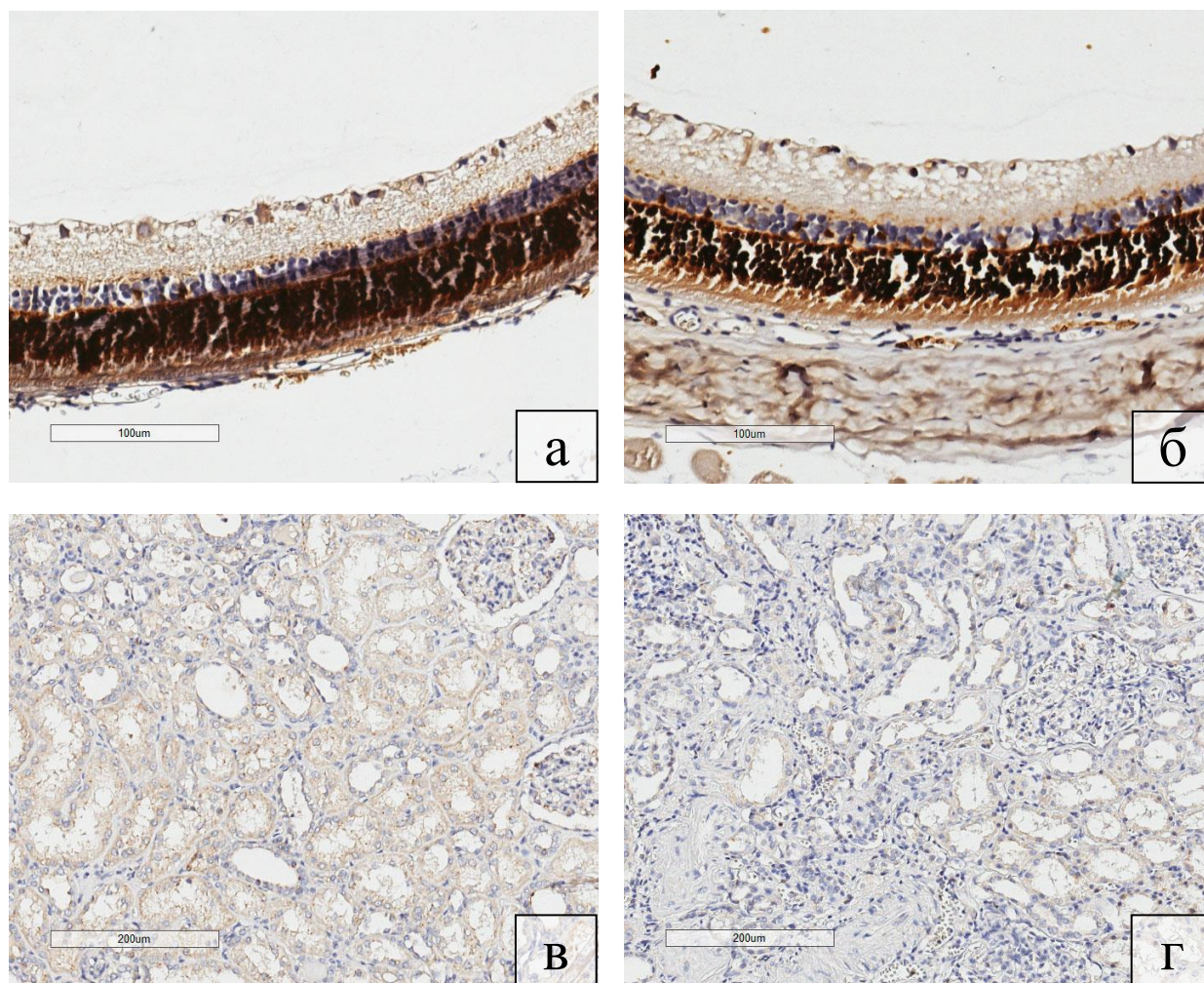


Рисунок 1. Положительная реакция в ткани сетчатки глаза с антителами к аррестину-1 (а) и рековерину (б) x400; Отрицательный контроль с тканью почки с антителами к аррестину-1 (в) и рековерину (г) x200.

Иммуногистохимическое исследование с антителами к аррестину-1 и рековерину проводилось вручную иммунопероксидазным методом с системой детекции Super SensitiveTM* IHC Detection Systems BioGenex (США).

Срезы толщиной 3 мкм монтировали на адгезивные стекла с полилизинным покрытием Menzel-Glaser Thermo Scientific (Германия). Далее проводилось:

- депарафинация в ксилоле, проводка в спиртах нисходящей концентрации (96°-70°) до воды;
- демаскировка антигенов в цитратном буфере в течение 30 мин на водяной бане ($t^{\circ}=98^{\circ}\text{C}$). Остывание в буфере PBS (20 минут);

- ополаскивание в 2 сменах PBS и промывание в течение 5 минут в 2 сменах PBS;
- нанесение 3% водного раствора перекиси водорода на 15 минут;
- промывание в PBS (3 смены по 1-2 минуты);
- инкубация с первичными антителами (таблица 1) в течение 30 минут;
- ополаскивание в 2 сменах PBS и промывание в течение 5 минут в 2 сменах PBS;
- применение системы детекции Super Sensitive™* IHC Detection Systems BioGenex (США) в соответствии с прилагаемой инструкцией;
- ополаскивание в 2 сменах PBS и промывание в течение 5 минут в 2 сменах PBS;
- нанесение DAB (3,3'-диаминобензидин) на 1,5-3 минуты;
- промывание в дистиллированной воде (3 смены по 2 минуты);
- окрашивание срезов гематоксилином;
- промывание в дистиллированной воде (3 смены по 2 минуте);
- обезвоживание в спиртах восходящей концентрации;
- выдерживание в 3 сменах ксилола по 5-7 минут;
- заключение в синтетическую смолу.

При анализе иммуногистохимической реакции с антителами к RCC, Vimentin, CD10, PAX8, CK7, EMA, E-cadherin, S100A, AMACR (P504S), p63, PSA, PSAP учитывался процент окрашенных клеток (на 100 клеток опухоли). Позитивной экспрессия считалась при окрашивании 10% клеток.

Результаты иммуногистохимического исследования с антителами к Rec и Arg-1 оценивали количественным методом, с помощью программы «QuPath v0.1.2» [280] при увеличении x200 в 20 полях зрения. Полученные результаты переводились в балльный эквивалент:

0 – менее 50 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (экспрессия отсутствует);

1 – от 51 до 100 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (слабая экспрессия);

2 – от 101 до 300 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (умеренная экспрессия);

3 – от 301 до 500 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (выраженная экспрессия).

Изучение препаратов проводилось на световом микроскопе Leica DM2000. Цифровые изображения гистологических срезов получали посредством сканирования на Aperio ScanScope CS2 с объективом x20, разрешением 0,50 мкм/пикс.

2.4. Электронная микроскопия

Образцы опухоли фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в 0,25 М фосфатном буфере, pH 7,4. Дофиксацию материала проводили в забуференном 1% растворе осмиевой кислоты на какодилатном буфере, pH 7,2. Ткань обезвоживали в спиртах последовательно увеличивающейся концентрации (от 40% до 96%), затем выдерживали в ацетоне в течение 30 мин. Далее фрагменты опухоли выдерживали в растворе ацетона и смолы аралдита (1:1) в течение 2-3 часов, после этого в чистом аралдите, при комнатной температуре на протяжении 24 часов. Затем исследуемые образцы помещали в желатиновые капсулы, заливали смолой и полимеризовали в термостате при температуре 56-60°C в течение 40 часов. На ультрамикротоме получали полутонкие и ультратонкие срезы. С полутонких срезов удаляли смолу в растворе насыщенного едкого натра в метиловом спирте и окрашивали по Романовскому – Гимзе и основным фуксином. Ультратонкие срезы дополнительно контрастировали насыщенными растворами уранилацетата и цитратом свинца. Изучение готовых препаратов выполнялось на электронном микроскопе Philips TECNAI 12 Bio Twin D-265 (FEI Company, Голландия).

2.5. Иммунологическое исследование сыворотки крови

Данный раздел работы проводился на базе института молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Получение сыворотки крови пациентов проводилось по стандартной методике. Далее выделились ААА-1 и ААР при помощи Western blot.

В первую очередь проводился электрофорез антигенов к аррестину-1 и рековерину в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS по методу Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) при концентрациях разделяющего и концентрирующего гелей равных соответственно 12,5 и 4%. После электрофореза, гель, содержащий образцы аррестина-1 и рековерина в количестве 1,5 мкг каждого белка, помещали на нитроцеллюлозную мембрану «Hybond-C extra» и осуществляли перенос белков из геля на мембрану в буфере 1 (25мМТрис, pH=7,5, 19,5мМ глицин, 20% этанол) при постоянной силе тока 300 мА в течение часа, после чего белки, связавшиеся с нитроцеллюлозной мембраной, окрашивали Ponceau S. Далее мембраны инкубировали в 5% растворе сухого обезжиренного молока в 20 мМ Трис-HCl буфере (pH=7,5), содержащем 500 мМ NaCl и 0,05% Tween 20 (буфер 2) в течение 1,5 часа. После чего мембраны инкубировали в присутствии сыворотки крови при начальном разведении 1:20 в течение 12 часов, затем мембраны отмывали от несвязавшихся антител. Окрашивание проводили при помощи вторичных антител, полученных против иммуноглобулинов человека, ковалентно связанных с пероксидазой хрена. Для этого мембрану инкубировали в растворе вторичных антител (разведение 1:1000 в буфере 2), после чего промывали буфером 2 для удаления несвязавшихся белков. Окрашивание белков, связавших меченые иммуноглобулины, проводили в буфере 2, содержащем 20 мкл 30% перекиси водорода и диаминобензидина [214].

2.6. Генетическое исследование

Данный раздел работы проводился на базе института молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Обработка ДНК бисульфитом натрия проводилась по методу описанному ранее [113]. Геномная ДНК была денатурирована с 0,3 М NaOH при $t^{\circ}=65^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут и затем обработана 2 М бисульфитом натрия и 0,5 М гидрохиноном при $t^{\circ}=55^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов. Модифицированная ДНК была очищена с использованием Wizard DNA Clean-System (Promega, США) согласно

рекомендациям производителя. Праймеры для бисульфитного секвенирования были разработаны с использованием Meth Primer software package [124].

Аmplification ДНК проводили, используя специфические праймеры SAG1, а также RCVRNb1s1, RCVRNb1s3 и RCVRNb1s4. Смесь для бисульфитной ПЦР (25 мл) содержала 2,5 мл 10 ПЦР-буфера (50 мМ KCl, 10 мМ Трис-НCl, pH 8,4), 2-4 мМ MgCl₂, 200 мМ каждого dNTP, 20-50 нг конвертированной в ДНК и 1 U термофильной ДНК полимеразы. Смесь нагревали при t°=96°C в течение 6 минут, затем проводили 34 цикла ПЦР в следующем режиме: t°=95°C в течение 40 с, t°=55°C в течение 30 с и t°=72°C в течение 40 с. Финальная элонгация при t°=72°C в течение 7 мин. Условия амплификации, размеры фрагментов и последовательность праймеров указаны в таблице 2.

Таблица 2. Праймеры для бисульфитного секвенирования, нуклеотидная последовательность, условия амплификации и размеры фрагментов.

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Условия амплификации		
		t° отжига, °C	MgCl ₂ , mM	Длина ампликона, bp
SAG1-F	TTAGTTTGGGAGATAGAGTAAGAT	55	2	441
SAG1-R	AAAACCAACAATAATAA AAACTACT			
RCVRNb1sF1	5'- TAAGGTTGGTGTGAGTTGAA GAT-3'	59	2	238
RCVRNb1sR1	5'- ACTCTAAAAATTCCAACCTC CTATC-3'			
RCVRNb1sF3	5'- GAAGGTTTATTTTAGTTTTTG GTTGG-3'	62	4	224
RCVRNb1sR3	5'- ACCAATCCTTCCTAAAAAAC TATCC-3'			
RCVRNb1sF4	5'- GGATTTTTTTGGATAGGGTT TTATT-3'	62	2	142
RCVRNb1sR4	5'- ATCTTCAACTCACCAACC TTAA-3'			

Продукты ПЦР секвенировали с помощью ABI Prism 3500 Genetic Analyser kits (Thermo Fisher Scientific, США), согласно протоколу производителя [75].

2.7. Статистическая обработка

Статистическая обработка полученных данных выполнялась при помощи компьютерной программы IBM SPSS, версии 22.0.

Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных признаков в виде процентных долей, для количественных – в виде средних арифметических (M) и стандартных отклонений (σ). В случае отсутствия нормального распределения переменных, в описательной статистике использовались медиана (Me) и квартили (Q_{25} , Q_{75}).

Проверка характера распределения значений количественных переменных в группах наблюдения проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка.

При подтверждении нормального распределения количественных переменных, проверку статистической значимости различий проводили при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок при парных сравнениях.

Для межгрупповых сравнений количественных переменных при отсутствии нормального распределения использовался непараметрический критерий Манна-Уитни для парных сравнений.

Статистическую значимость различий категориальных и порядковых признаков при множественных и парных сравнениях оценивали при помощи критерия χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность. При ожидаемой частоте встречаемости признака 5 и менее в четырехпольных таблицах использовался точный критерий Фишера.

Различия между группами наблюдения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для анализа корреляционной связи между исследуемыми признаками применялся коэффициент корреляции Пирсона (для нормально распределенных переменных) и коэффициент корреляции Спирмена (если распределение переменных отличалось от нормального).

Для оценки силы связи между категориальными переменными использовался критерий V Крамера. Критерии, оценивающие силу связи между категориальными переменными, могут принимать значения от 0 до 1.

Таблица 3. Интерпретация значений критерия V Крамера согласно рекомендациям Rea & Parker

Значение критериев ϕ и V Крамера	Сила взаимосвязи
<0,1	Несущественная
0,1 – <0,2	Слабая
0,2 – <0,4	Средняя
0,4 – <0,6	Относительно сильная
0,6 – <0,8	Сильная
0,8 – 1,0	Очень сильная

Для оценки степени влияния факторных признаков на результативные производили оценку отношения шансов с расчетом доверительных интервалов (ДИ). Расчет данного показателя производился по классической методике в таблицах сопряженности 2х2:

Оценка отношения шансов

	Результат «+»	Результат «-»
Фактор «+»	a	b
Фактор «-»	c	d

$$\text{Отношение шансов (ОШ)} = (a/b) / (c/d).$$

В каждом случае для отношения шансов производился расчет доверительных интервалов.

Формула для верхней границы ДИ 95% отношения шансов:

$$e^{\ln(RR)+1,96\sqrt{\frac{1}{A}+\frac{1}{B}+\frac{1}{C}+\frac{1}{D}}}$$

Формула расчета нижней границы ДИ 95%:

$$e^{\ln(RR)-1,96\sqrt{\frac{1}{A}+\frac{1}{B}+\frac{1}{C}+\frac{1}{D}}}$$

где, e – основание натурального логарифма, равное 2,71, $\ln$ – знак натурального логарифма, RR – относительный риск, A, B, C, D – поля четырехпольной таблицы (таблица 4).

Статистически значимыми считали шансы в том случае, если в доверительный интервал не попадала единица.

Для определения предикторов экспрессии аррестина-1 и рековерина в тканях опухоли почки использован метод множественного логистического регрессионного анализа.

В качестве возможных предикторов рассматривались степень дифференцировки (злокачественности) опухоли, размеры и распространение опухоли (pT), экспрессия RCC, Vim, CD10, EMA, Ecadherin, AMACR, PAX8, S100A, CK7, морфология опухоли (категории: 1 - онкоцитома, 2- светлоклеточный ПКР, 3 - папиллярный ПКР, 4 - хромофобный ПКР).

Модель логистической регрессии представляет собой зависимость логарифма шанса наступления прогнозируемого события (логита) от линейной комбинации факторных переменных.

$$\ln \frac{p}{1-p} = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$$

Соответственно, вероятность наступления прогнозируемого события можно рассчитать при помощи следующего уравнения:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)}}$$

где,

p – вероятность прогнозируемого события,

e – математическая константа 2,72,

b_0 – константа модели,

b_n – коэффициент при предикторной переменной x_n , показывающий изменение логарифмических шансов, вызванное единичным изменением соответствующей независимой переменной,

n – порядковый номер предиктора, включенного в уравнение (1...n).

Построение логистической регрессионной модели осуществлялось методами пошагового включения прогностических факторов с определением с оценкой значения коэффициента детерминации (R^2), показывающего долю влияния всех предикторов, включенных в модель на дисперсию зависимой переменной.

Проверка статистической значимости модели осуществлялась при помощи критерия χ^2 Вальда. При значении $p < 0,05$, нулевая гипотеза о незначимости модели отвергалась.

Соответствие модели использованным данным характеризовали с помощью критерия согласия Хосмера-Лемешева. При $p > 0,05$ принималась гипотеза о согласованности модели.

Интерпретация параметров логистической регрессии производилась на основе величины $\exp(b)$, соответствующей отношению шансов вероятности наступления прогнозируемого события к вероятности его отсутствия (OR, odds ratio). При положительном коэффициенте b , значение OR превышает 1 и шансы наступления прогнозируемого события возрастают. Отрицательный коэффициент b и величина $OR < 1$ указывают на снижение шансов. Отношение шансов оценивают, как статистически значимое, если в его доверительный интервал не попадает единица.

Чувствительность и специфичность предикторов оценивалась при помощи ROC-анализа. Количественная интерпретация результатов проводилась при помощи построения ROC-кривых с оценкой величины показателя AUC (Area under ROC curve – площадь под ROC-кривой). При условии 100% процентной вероятности наступления прогнозируемого события значение AUC соответствует единице. Чем больше значение площади, тем лучше модель. Значение площади от 0,9 до 1 соответствует отличному качеству модели, от 0,8-0,9 – очень хорошему, 0,7-0,8 – хорошему, 0,6-0,7 – среднему, 0,5-0,6 – неудовлетворительному.

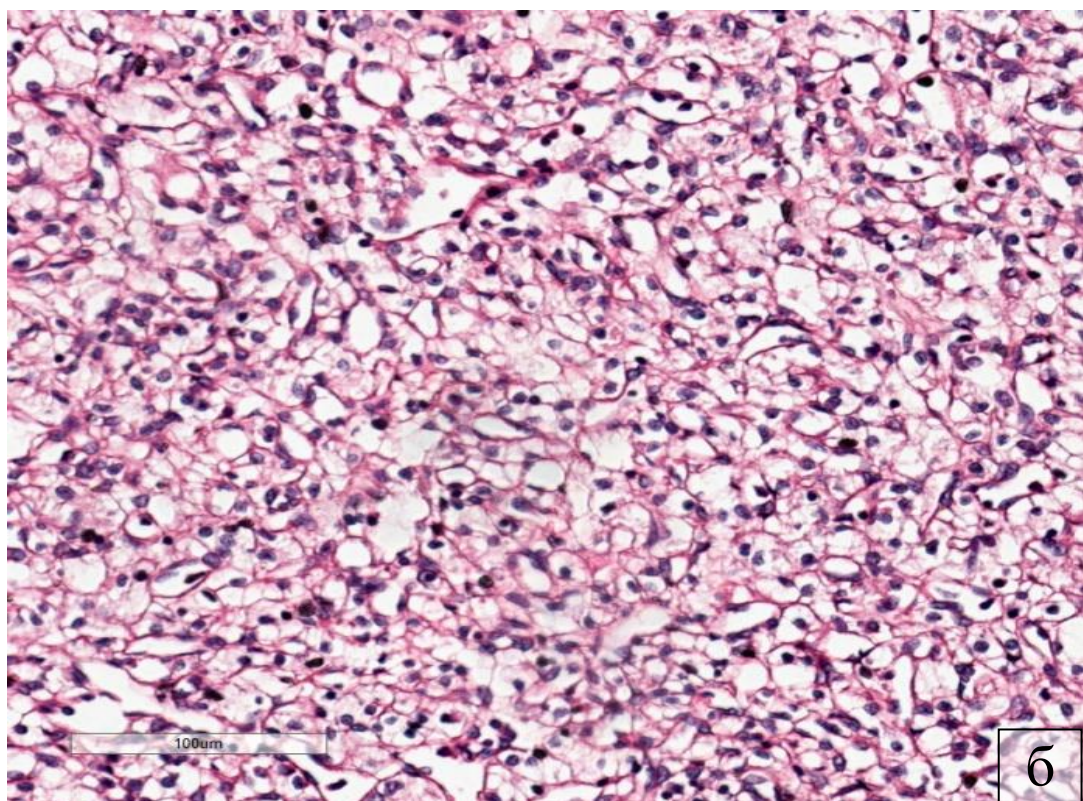
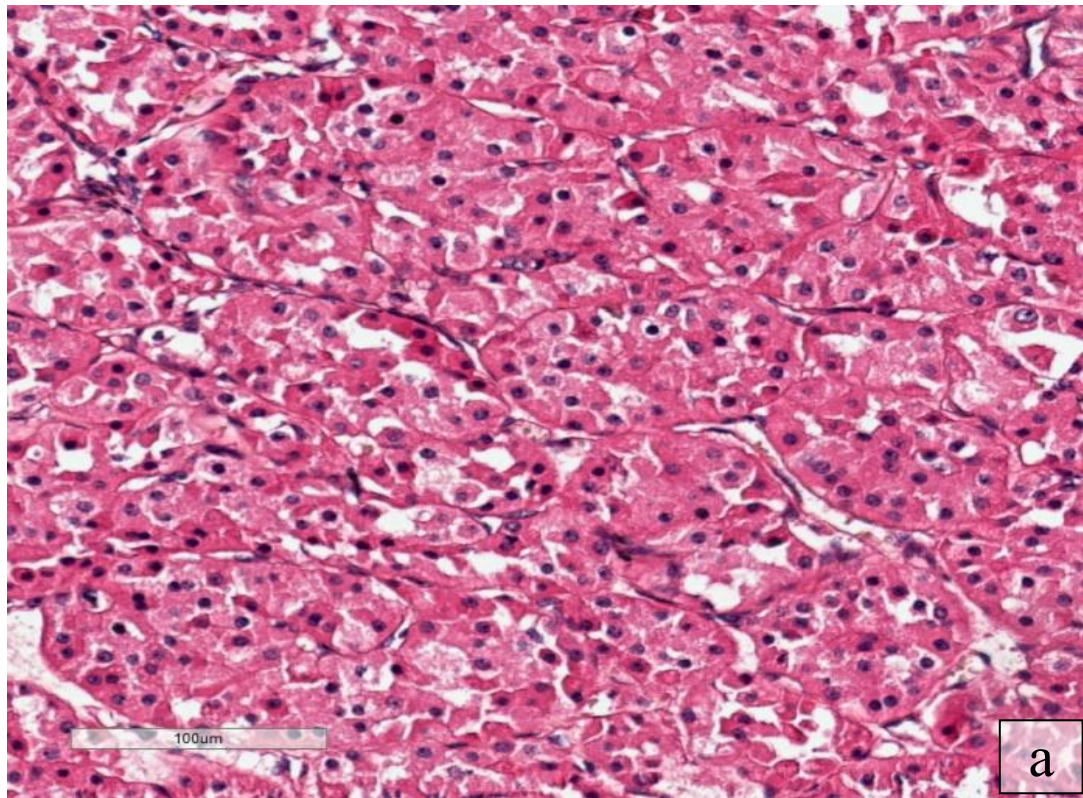
ГЛАВА 3. Результаты исследования и их обсуждение

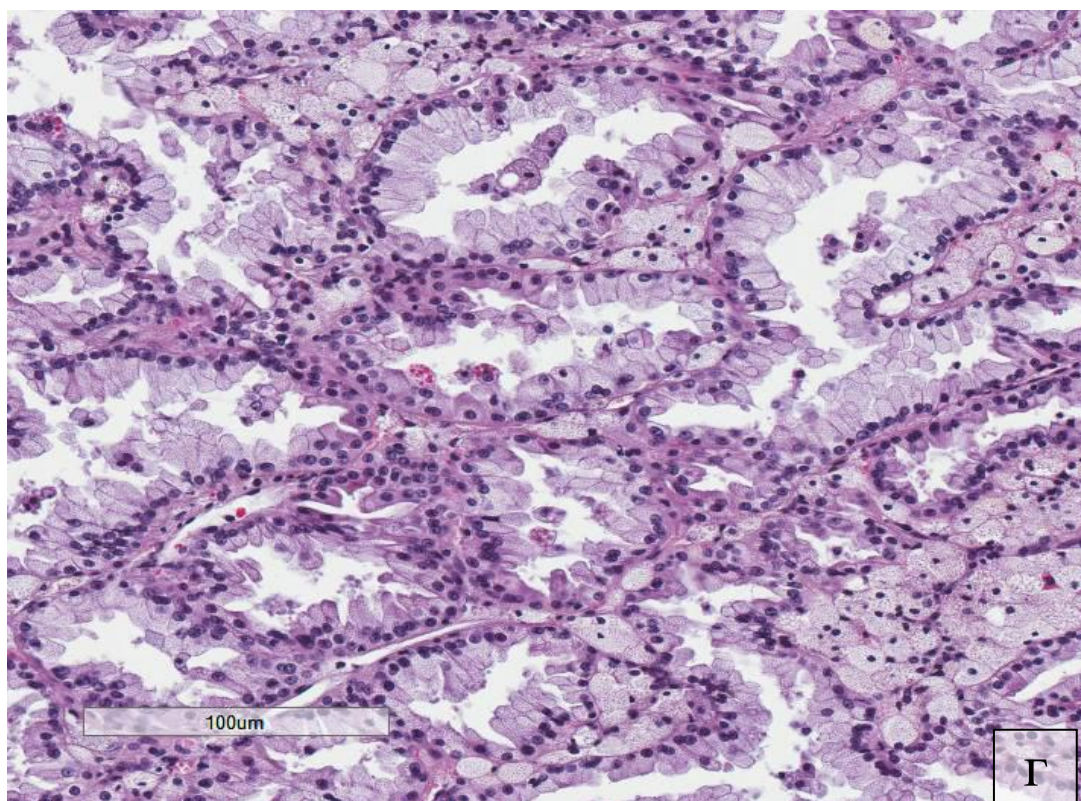
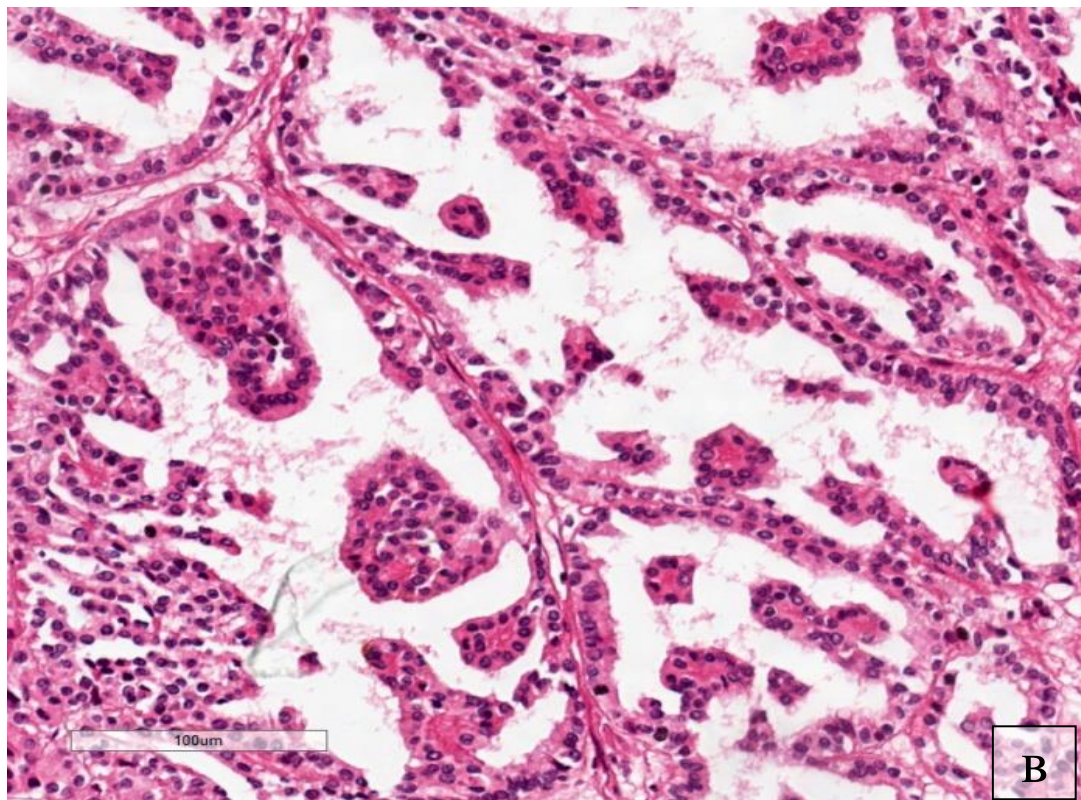
Исследовано 121 опухолей почек после радикальной нефрэктомии и 16 опухолей предстательной железы после радикальной простатэктомии. Также было получено по 1,5 мл сыворотки крови от каждого пациента, до момента хирургического удаления опухоли. Средний возраст больных с опухолью почек составил $58,78 \pm 11,114$ лет (от 25 до 86 лет), мужчин с опухолью простаты – $64,31 \pm 6,69$ лет (от 51 до 76 лет). Средний возраст пациентов с РПЖ не противоречит литературным данным, чаще всего данное заболевание диагностирует у лиц старше 60 лет и лишь 1% встречается у мужчин моложе 50 лет. Среди пациентов с опухолью почек 64 мужчин и 57 женщин, что составило 52,9% и 47,1% соответственно, в то время как, по данным различных литературных источников [188], частота встречаемости опухолей почек в мире почти в 2 раза выше у мужчин, чем у женщин.

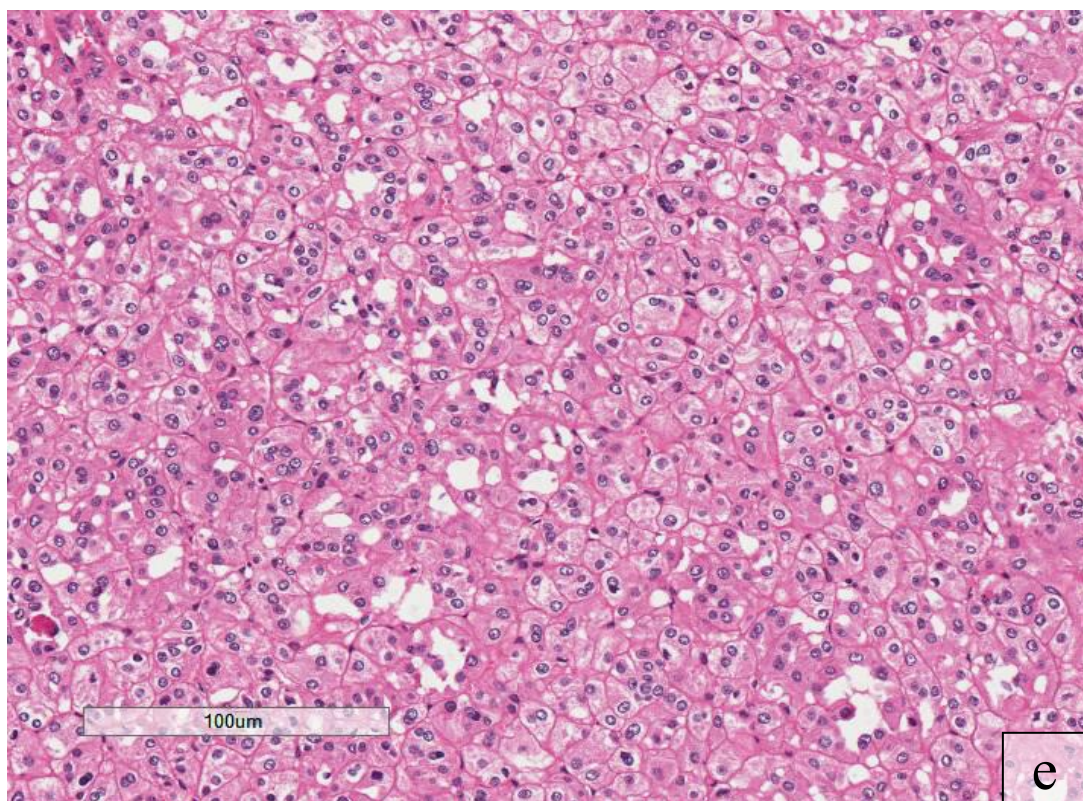
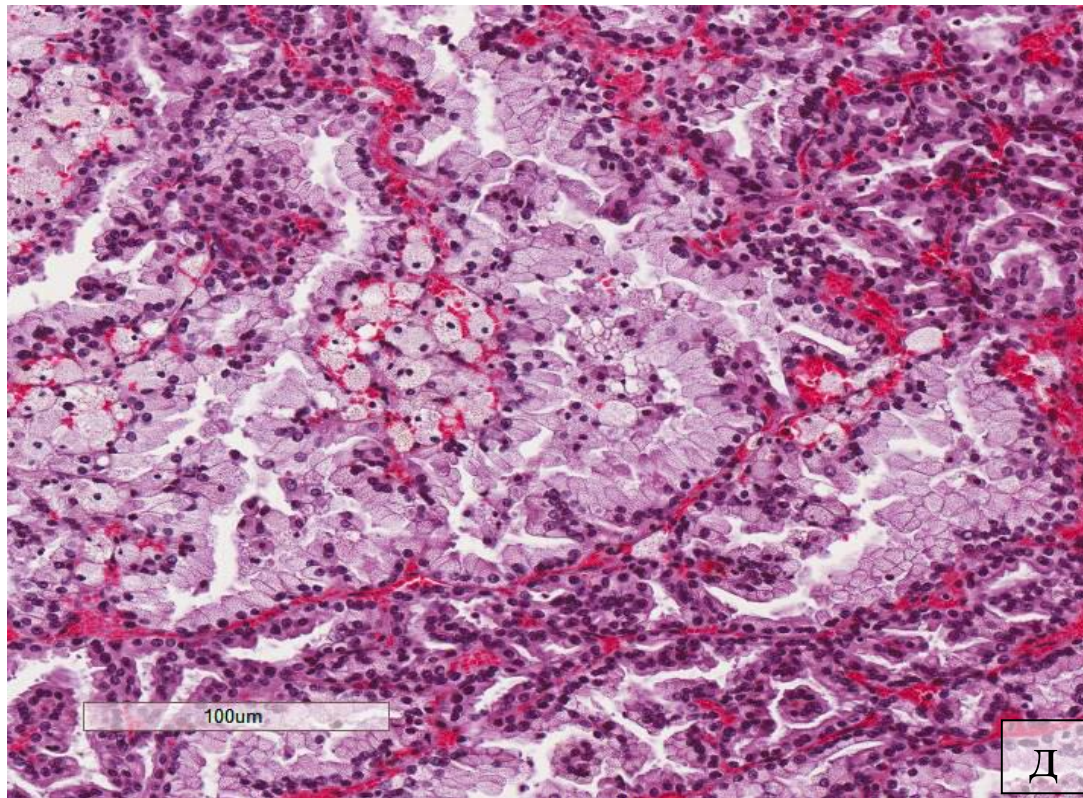
3.1. Морфологическая характеристика

3.1.1. Опухоли почки

При светооптическом исследовании опухолей почек ($n=121$, 100%) были диагностированы следующие гистологические варианты (рисунок 2): онкоцитома ($n=17$, 14%); светлоклеточный ПКР ($n=70$, 57,9%); папиллярный ПКР ($n=18$, 14,8%), в котором выделяли 1 тип ($n=9$, 7,4%), 2 тип ($n=4$, 3,3%) и смешанный тип ($n=5$, 4,1%); хромофобный ПКР ($n=16$, 13,2%) с его вариантами: классический ($n=9$, 7,4%) и эозинофильный ($n=7$, 5,8%).







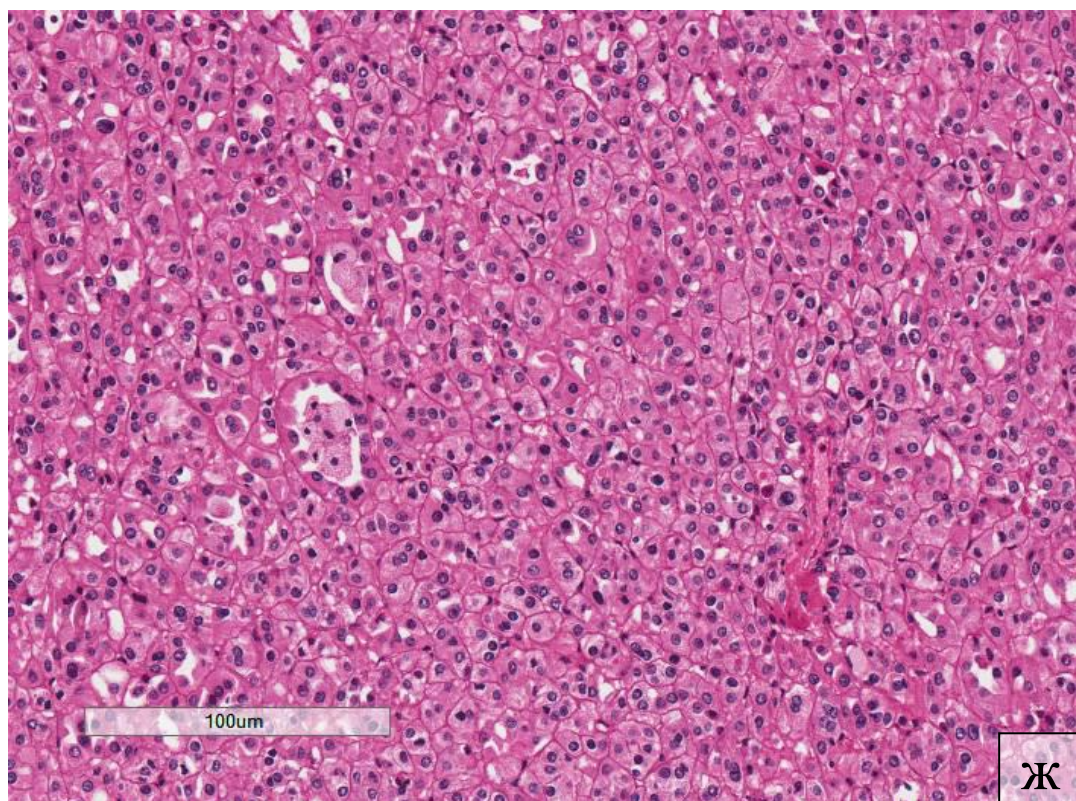


Рисунок 2. Гистологические варианты опухолей почек: а – онкоцитомы; б – светлоклеточный ПКР; в – папиллярный ПКР 1 типа; г – папиллярный ПКР 2 типа, д – папиллярный ПКР смешанного типа; е – хромофобный ПКР классический вариант; ж – хромофобный ПКР эозинофильный вариант. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

У пациентов со злокачественными новообразованиями почек (n=104, 100%) размеры и распространение первичной опухоли характеризовались следующим образом: у 17 пациентов выявлена стадия pT1a, что составило 16,3%, у 10 пациентов – pT1b (9,6%), у 9 пациентов – pT2a (8,7%), у 17 пациентов – pT2b (16,3%). В процентном соотношении довольно большое количество приходится на стадию pT3 (n=51, 49%), из которого стадия pT3a диагностирована в 33 случаях, стадия pT3b – в 18 случаях, что составляет 31,7% и 17,3% соответственно. Стадия pT4 среди пациентов с опухолью почек не определялась. Из представленных данных, становится очевидно, что у большинства пациентов диагноз опухоль почки был установлен в основном на стадии pT3 и pT2, данная закономерность вполне ожидаема, учитывая тот факт, что опухоль почки в начальных стадиях

может иметь бессимптомное течение и часто является случайной находкой при плановом обследовании [38].

В случаях с диагнозом светлоклеточный и папиллярный ПКР (n=88) проводили оценку степени злокачественности опухоли (G). Так у пациентов со светлоклеточным ПКР (n=70, 100%) при стадии pT1a во всех случаях (n=11, 15,7%) определялась вторая степень злокачественности (G2), при стадии pT1b выявлялись как G2 так и G3 стадии (n=3, 4,2% и n=4, 5,7% соответственно). Светлоклеточные опухоли со стадией pT2a характеризовались высокой степенью дифференцировки (G1), но диагностированы они были лишь у 2 пациентов (2,8%). В 11 случаях светлоклеточного ПКР определялась стадия pT2b, из них в 9 опухолях (12,8%) градация была оценена как G2 и в 2 опухолях (2,8%) – G3. Наибольшее количество светлоклеточного ПКР приходится на стадию pT3 (pT3a и степень злокачественности G2 у 17 человек (24,2%), G3 у 5 человек (7,1%), pT3b в сочетании со степенью злокачественности G2 – 11 человек (15,7%) и G3 – 6 человек (8,5%)).

Частота встречаемости папиллярных ПКР значительно меньше (n=18, 100%), по сравнению со светлоклеточными ПКР, следовательно, соотношение стадий и степени злокачественности несколько иное: стадия pT1a и степень злокачественности G1 выявлена у 1 человека (5,5%), G2 – у 3 (16,6%); стадия pT2a и G1 в 1 случае (5,5%), G2 в 2 случаях (11,1%) и G3 в 1 случае (5,5%); стадия pT2b и G2 диагностированы у 3 пациентов (16,6%); стадия pT3a и G2 – у 4 пациентов (22,2%), G3 – у 3 пациентов (16,6%).

Низкодифференцированные почечноклеточные опухоли, имеющие градацию G4, в исследуемом материале не встречались. Градация степени злокачественности не применялась для оценки хромофобного ПКР в соответствии с рекомендациями ВОЗ и ISUP.

У 11 пациентов с ПКР диагностировано метастатическое поражение (в том числе и множественное) лимфатических узлов (n=2), надпочечников (n=3), головного мозга (n=4), легких (n=2), костей (n=2) и кожи (n=1), при этом у 10 больных был верифицирован диагноз светлоклеточного ПКР, и только у 1-го –

хромофобная почечноклеточная карцинома. Таким образом, количество гематогенных метастазов превалирует над лимфогенными, что также подтверждается литературными данными, об особенностях поведения ПКР, распространении опухоли по венозному синусу, почечной вене и нижней полой вене. Для ПКР более характерны гематогенные метастазы в легкие (75%), печень (40%), кости (40%), надпочечники (22%), кожу (4%), при этом лимфогенные метастазы встречаются реже (60%) [141].

Подробная морфологическая характеристика всех опухолей почек представлена в таблицах 4-6.

Таблица 4. Морфологическая характеристика опухолей почек (pT).

			Светлоклеточный ПКР	Папиллярный ПКР	Хромофобный ПКР	Итого
pT	1a	N	11	4	2	17
		%	15,7%	22,2%	12,5%	16,3%
	1b	N	7	0	3	10
		%	10,0%	0,0%	18,8%	9,6%
	2a	N	2	4	3	9
		%	2,9%	22,2%	18,8%	8,7%
	2b	N	11	3	3	17
		%	15,7%	16,7%	18,8%	16,3%
	3a	N	22	7	4	33
		%	31,4%	38,9%	25,0%	31,7%
	3b	N	17	0	1	18
		%	24,3%	0,0%	6,3%	17,3%
Итого		N	70	18	16	104
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 5. Морфологическая характеристика опухолей почек (G).

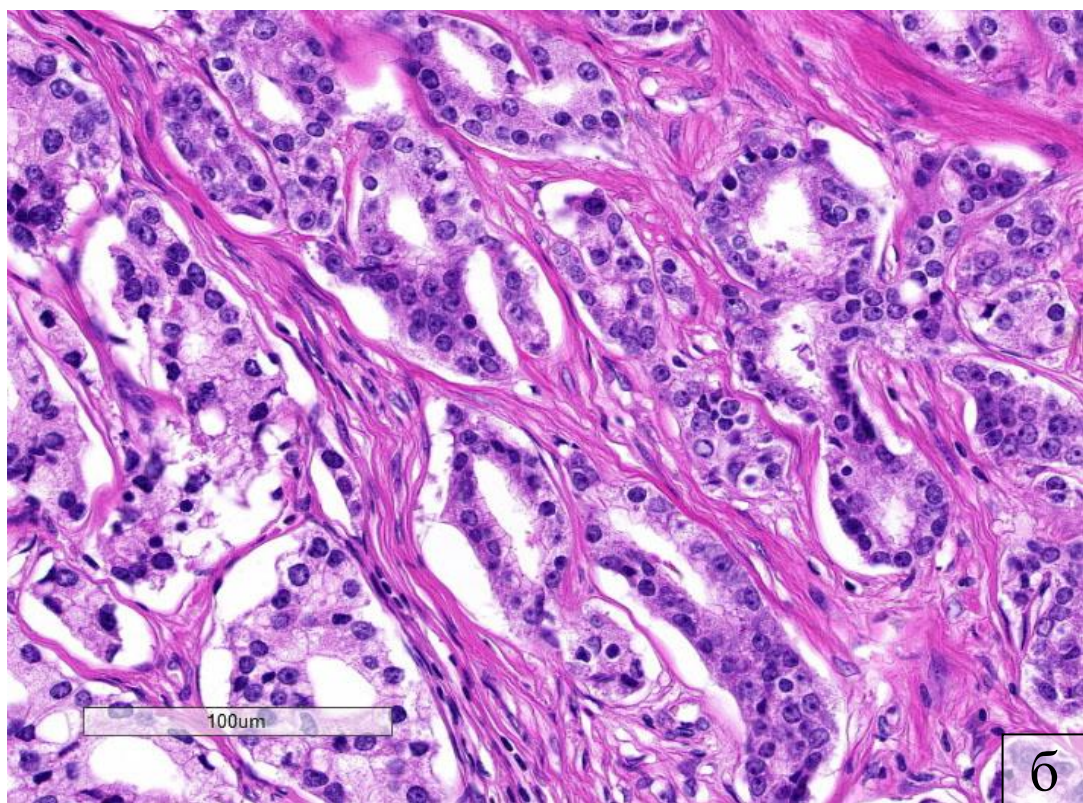
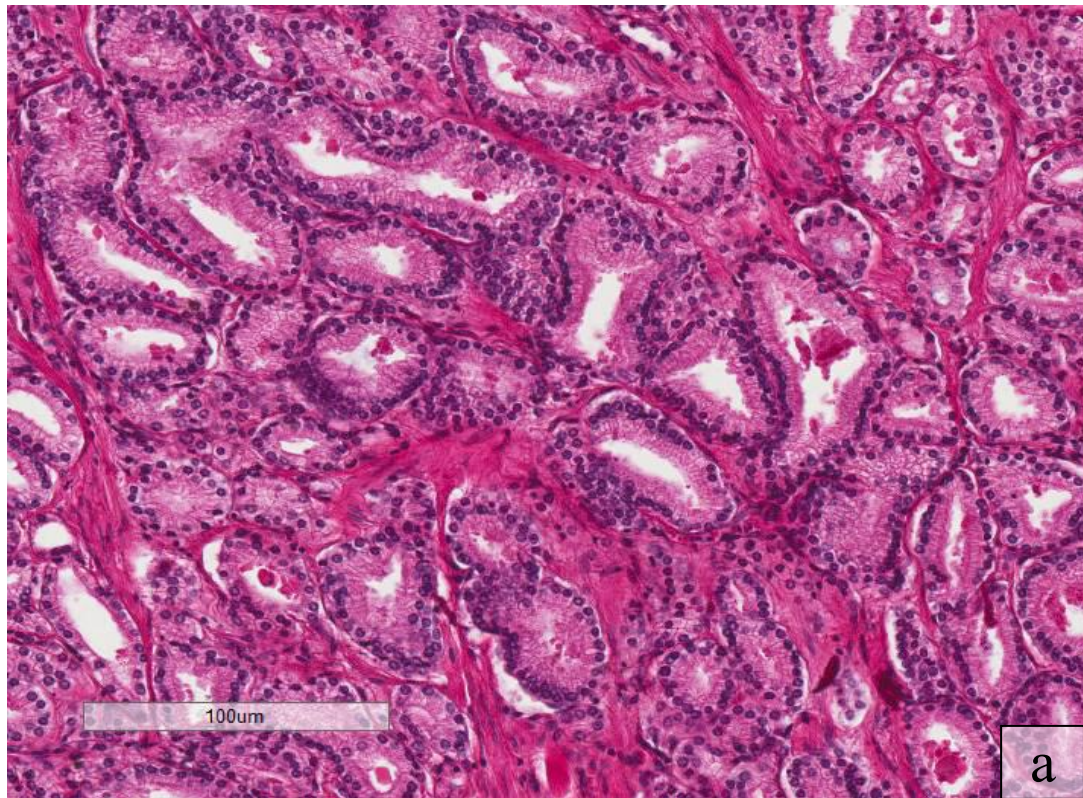
			Светлоклеточный ПКР	Папиллярный ПКР	Итого
Grade	G1	N	2a	2a	4
		%	2,9%	11,1%	4,5%
	G2	N	51a	12a	63
		%	72,9%	66,7%	71,6%
	G3	N	17a	4a	21
		%	24,3%	22,2%	23,9%
Итого		N	70	18	88
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Таблица 6. Обнаружение метастазов у пациентов с ПКР.

Локализация метастаза		Морфология			Итого
		Светлоклеточный ПКР	Папиллярный ПКР	Хромофобный ПКР	
Отсутствие метастазов	N	60	18	15	110
	%	85,7%	100,0%	93,8%	90,9%
Головной мозг	N	2	0	0	2
	%	2,9%	0,0%	0,0%	1,7%
Кожа, головной мозг	N	1	0	0	1
	%	1,4%	0,0%	0,0%	0,8%
Кости	N	2	0	0	2
	%	2,9%	0,0%	0,0%	1,7%
Легкие	N	1	0	0	1
	%	1,4%	0,0%	0,0%	0,8%
Лимфатические узлы, головной мозг	N	1	0	0	1
	%	1,4%	0,0%	0,0%	0,8%
Лимфатические узлы, легкие	N	0	0	1	1
	%	0,0%	0,0%	6,3%	0,8%
Надпочечник	N	3	0	0	3
	%	4,3%	0,0%	0,0%	2,5%
Итого	N	70	18	16	121
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

3.1.2. Опухоли предстательной железы

Все опухоли предстательной железы (n=16, 100%) были представлены ацинарной аденокарциномой (рисунок 3).



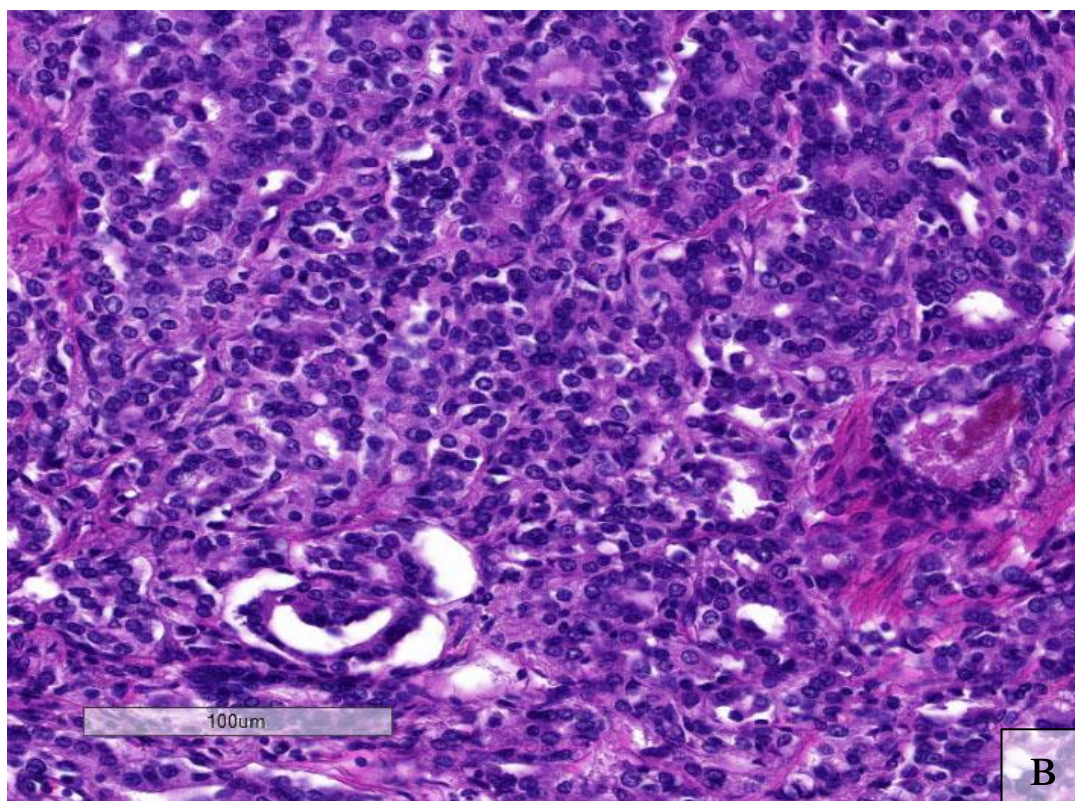


Рисунок 3. Ацинарная аденокарцинома предстательной железы: а – G1 (6 баллов по Глисон); б – G2 (7 баллов по Глисон); в – G3 (8 баллов по Глисон). Окраска гематоксилином и эозином, x200

Сравнивая полученные результаты с литературными данными, следует отметить, что частота встречаемости разных гистологических типов опухолей почки значительно различается. Так, по данным ВОЗ, на долю онкоцитомы приходится около 5-9% всех ренальных опухолей. Наибольшее количество, а именно, 65-70% всех злокачественных новообразований почки приходится на светлоклеточную почечноклеточную карциному, что ставит это образование на первое место по частоте встречаемости. Папиллярный ПКР диагностируется практически в три раза реже светлоклеточной карциномы, на его долю приходится 18,5%. Наиболее редким вариантом злокачественной эпителиальной опухоли почки является хромофобный ПКР, данный диагноз регистрируется только в 5-7% случаев [141]. Данные различия могут быть объяснены особенностями выборки пациентов: исключение низкодифференцированных опухолей с массивными очагами некроза из исследования, а также длительным наблюдением и сбором материала.

В отношении РПЖ значительных различий с другими опубликованными работами выявлено не было. Рак простаты у пациентов, вошедших в исследование, гистологически представлен ацинарной аденокарциномой [92].

Среди 16 мужчин с раком простаты у большинства ($n = 14$) диагностирована стадия pT2c (87,5%) и по 1 случаю pT2b и pT3b, что составило по 6,3%. Стадия pT1 и pT4 у исследованных пациентов не определялась, так как стадия pT1 диагностируется при помощи игольной биопсией, проводимой при повышении уровня PSA.

При анализе, представленных в работе данных, отмечено, что РПЖ чаще диагностируется на ранних стадиях. Связано это с постоянным прицельным скринингом лиц старше 50 лет, возможностью малоинвазивного исследования сыворотки крови, для оценки уровня PSA, а также с особенностями локализации опухоли и ранними клиническими проявлениями.

При оценке степени градации большинство опухолей представлены умереннодифференцированной аденокарциномой G2 при сумме Глисона 7 ($n=13$; 81,3%) (рисунок 3б), 2 случая – 12,5% высокодифференцированной аденокарциномы G1 (≤ 6 баллов) (рисунок 3а) и 1 случай – 6,3% низкодифференцированной аденокарциномы G3 (8 баллов) (рисунок 3в), при этом недифференцированные аденокарциномы G4 с суммой баллов ≥ 9 не встречались. Четкой корреляции между стадией pT и степенью злокачественности G не было выявлено, что можно объяснить малым количеством пациентов.

У 2 пациентов были диагностированы метастазы в регионарные лимфатические узлы, при этом отдаленные гематогенные метастазы найдены не были. Описанная морфологическая характеристика РПЖ отображена в таблицах 7 и 8.

Такие результаты, прежде всего, связаны с небольшим количеством материала, выбранного для исследования. Отсутствие отдаленных гематогенных метастазов, так же можно объяснить тем, что основная часть пациентов имели клиническую, а после исследования операционного материала, и патоморфологическую стадию pT2c, кроме того, опухоли простаты в основном

были представлены умереннодифференцированной ацинарной аденокарциномой, G2.

Таблица 7. Морфологическая характеристика опухолей простаты (pT).

		N	%
pT	2b	1	6,3
	2c	14	87,5
	3b	1	6,3
	Итого	16	100,0

Таблица 8. Морфологическая характеристика опухолей простаты (G).

		N	%
Grade	1	2	12,5
	2	13	81,3
	3	1	6,3
	Итого	16	100,0

3.2. Иммуногистохимическая характеристика

3.2.1. Исследование опухолей почек

Иммуногистохимическое исследование было проведено на образцах онкоцитомы (n=17), светлоклеточного ПКР (n=70), папиллярного ПКР (n=18), хромофобного ПКР (n=16). При изучении каждого гистологического типа отдельно, среди папиллярных ПКР 1 типа, 2 типа и смешанных, а также среди классических и эозинофильных вариантов хромофобного ПКР достоверных различий не было выявлено. Поэтому все варианты папиллярного и хромофобного ПКР были объединены в группы папиллярного и хромофобного ПКР соответственно.

Экспрессия CRA

Для оценки наличия aberrантной экспрессии Arr-1 и Res в опухолевых клетках были проанализированы образцы как различных гистологических вариантов ПКР, так и онкоцитом.

Аррестин – 1

При изучении экспрессии аррестина-1 установили, что в группах с одинаковым гистологическим типом опухолей почек есть как позитивные, так и негативные опухоли. В экспериментальных условиях Arr-1 выявлялся в виде цитоплазматического «dot-like» окрашивания опухолевых клеток.

Положительная экспрессия Arr-1 наблюдалась в 53,7% всех типов опухолей почки. Относительное количество Arr1-положительных образцов онкоцитомы составило 76,5%, что было выше, чем соответствующее значение для всех других образцов ПКР, которое составляло 50%. Количество Arr1-положительных образцов каждого оцениваемого подтипа ПКР составляло 40% для светлоклеточного ПКР, 66,7% для папиллярного ПКР, 75,0% для хромофобного ПКР (таблица 9).

Таблица 9. Экспрессия Arr-1 различной степени выраженности в опухолях почек.

Выраженность экспрессии	Гистологические варианты					p
	Онкоцитома (n=17)	Светлоклеточный ПКР (n=70)	Папиллярный ПКР (n=18)	Хромофобный ПКР (n=16)	Всего (n=121)	
0	4 (23,5%)	42 (60%)	6 (33,3%)	4 (25%)	56 (46,2%)	p=0,503
1	3 (17,6%)	4 (5,7%)	2 (11,1%)	3 (18,7%)	12 (9,9%)	
2	10 (58,8%)	16 (22,8%)	8 (44,4%)	7 (43,7%)	41 (33,9%)	
3	0	8 (11,4%)	2 (11,1%)	2 (12,5%)	12 (9,9%)	
Всего положительных	13 (76,5%)	28 (40,0%)	12 (66,7%)	12 (75,0%)	65 (53,7%)	

При оценке корреляционной связи было отмечено снижение количества Arr-1-положительных образцов при диагнозе светлоклеточный ПКР и повышение при диагнозе онкоцитоме ($p=0,005$; V Крамера 0,327) (таблица 10).

Таблица 10. Корреляционная связь между морфологией опухоли и экспрессии Arr-1.

	Группы наблюдения		p	Cramer's V
	Есть arr1 (n=65)	Нет arr1 (n=56)		
Онкоцитоме	13 (20,0%)	4 (7,1%) ⁷	$p=0,005$	0,327 $p=0,005$
Светлоклеточный ПКР	28 (43,1%)	42 (75,0%) ⁵		
Папиллярный ПКР	12 (18,5%)	6 (10,7%)		
Хромофобный ПКР	12(18,5%)	4 (7,1%)		

⁷ статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно первой группы

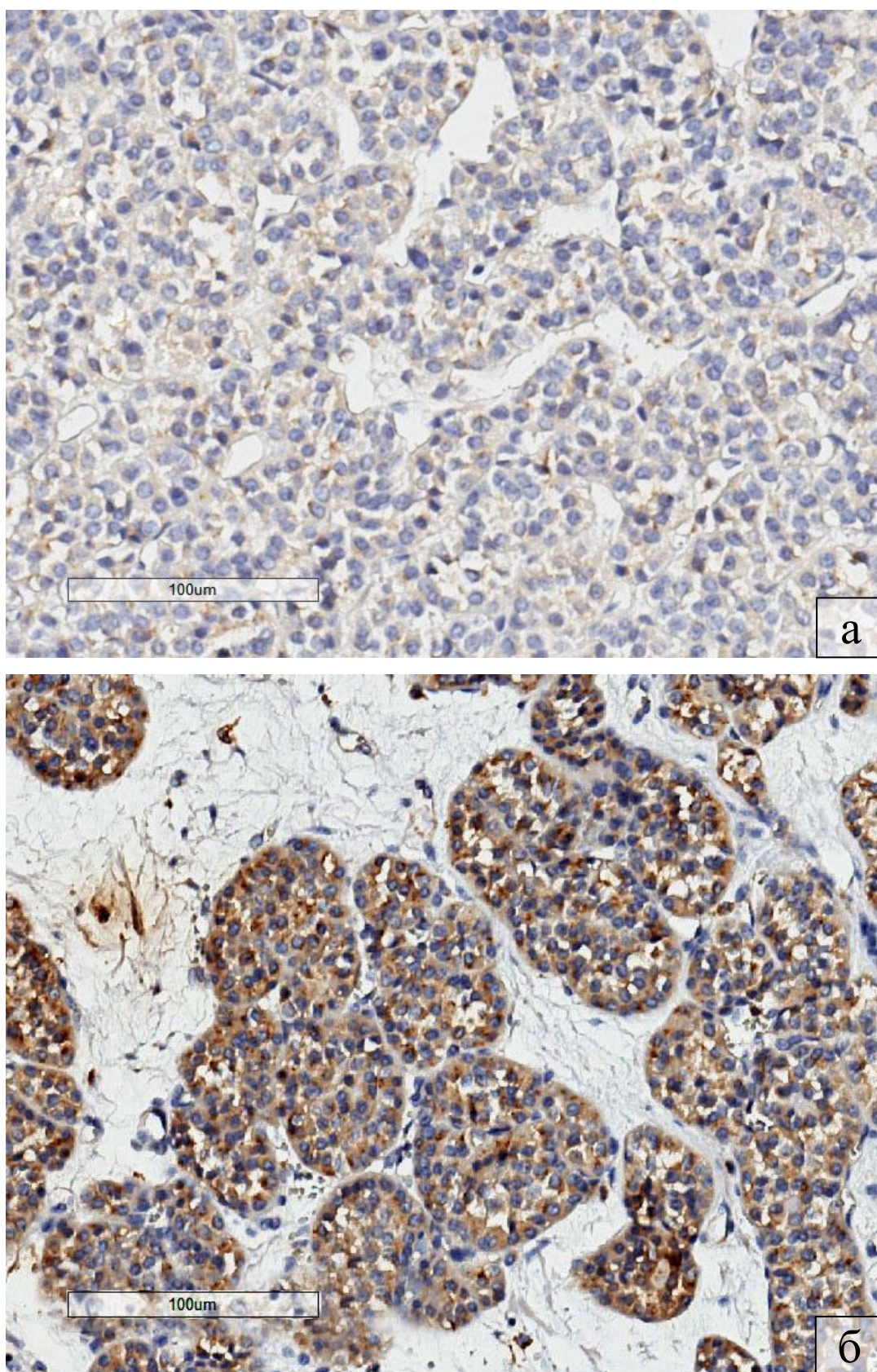


Рисунок 4. Онкоцитома. Экспрессия Arr-1. Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б – положительная реакция, x200.

Как уже упоминалось выше, при исследовании опухолей почек, имеющих строение онкоцитомы определялась аберрантная экспрессия Agt-1 в 76,5% случаев. Из них в 17,6% наблюдалась слабая экспрессия (1 балл), в 58,8% - умеренная (2 балла), выраженная экспрессия (3 балла) исследуемого белка в клетках онкоцитомы не наблюдалась (таблица 9).

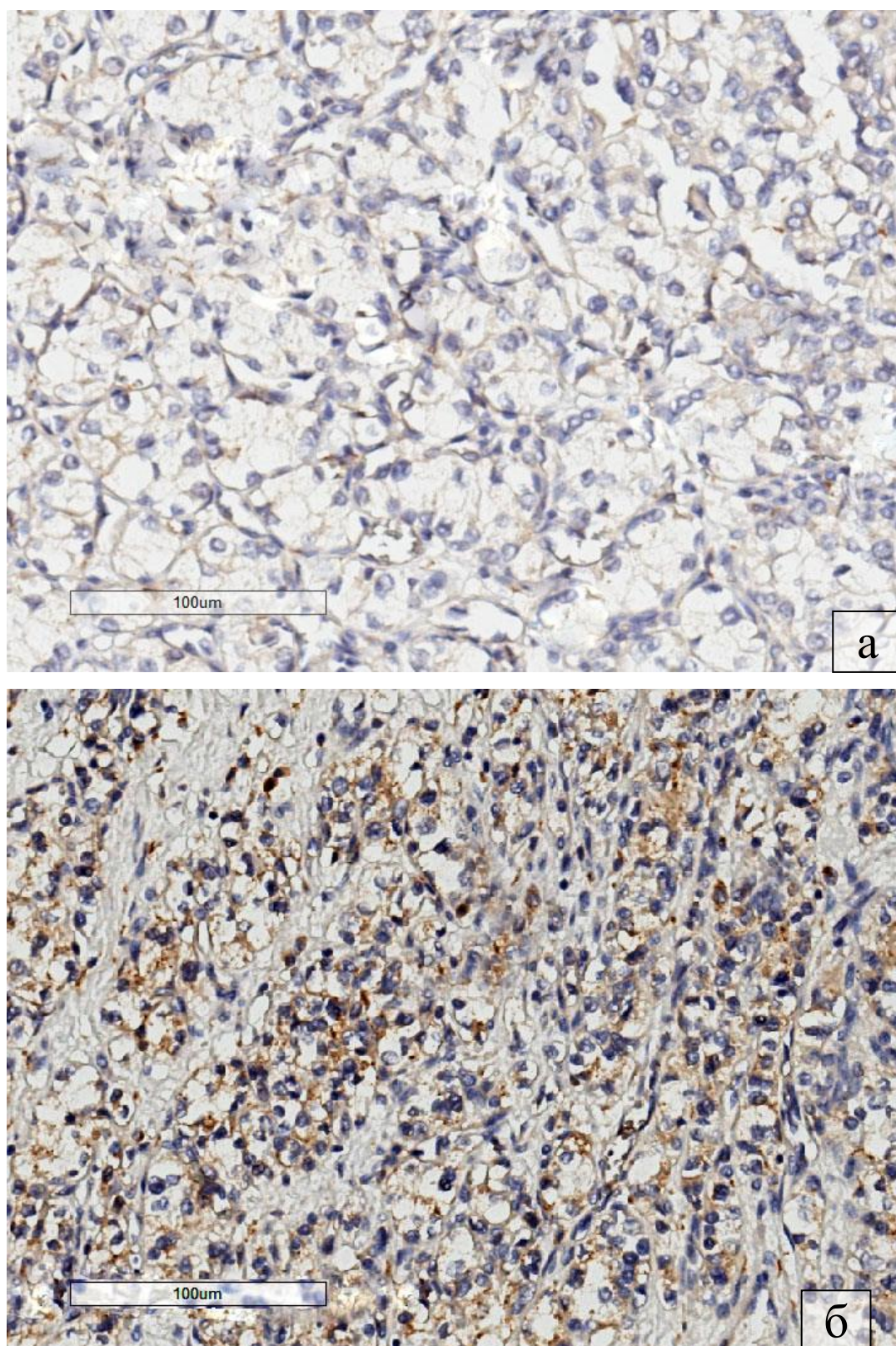


Рисунок 5. Светлоклеточный ПКР. Экспрессия Arr-1. Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б – положительная реакция, x200.

В образцах опухолей пациентов с диагнозом светлоклеточный ПКР положительная экспрессия Arr-1 наблюдалась в 40%, что почти в 2 раза меньше, чем в онкоцитомах. В 5,7% реакция оценивалась как слабая, в 22,8% - умеренная и в 11,4% - выраженная (таблица 9).

При этом в опухолях, имеющих стадию pT1a только в 1 из 11 случаев, отмечалась положительная реакция с антителами к Arr-1 с умеренной выраженностью экспрессии. Во всех Arr-1-позитивных случаях pT1b (4 из 7) также наблюдалась умеренная реакция. В образцах из светлоклеточных ПКР со стадией pT2a Arr-1-позитивных опухолей обнаружено не было. В 11 опухолях со стадией pT2b 2 опухоли со слабой реакцией и 1 с выраженной (всего 3 позитивных). Из 22 случаев pT3a Arr-1-позитивных опухолей было 12, в 2 образцах реакция была оценена как слабая, в 7 – умеренная и в 3 – выраженная (таблица 11). В группе светлоклеточных ПКР со стадией pT3b выявлено всего 8 из 17 опухолей, экспрессирующих аррестин-1: 1 со слабой степенью экспрессии, 5 с умеренной и 2 с выраженной.

Таблица 11. Экспрессия Arr-1 различной степени выраженности в светлоклеточном ПКР в зависимости от размера опухоли (pT).

Выраженность экспрессии	pT						Всего
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	
0	10	3	2	8	10	9	42
1	0	0	0	1	2	1	4
2	1	2	0	1	7	5	16
3	0	2	0	1	3	2	8
Всего положительных	1	4	0	3	12	8	28

При попытке определить зависимость выраженности экспрессии Arr-1 от степени опухолевой градации (G), получены следующие данные (таблица 12): в 2 высокодифференцированных светлоклеточных ПКР экспрессия Arr-1 не наблюдалась, из 51 опухоли со степенью G2: в 3 – слабая экспрессия, в 9 – умеренная и в 3 – выраженная. Из 17 опухолей со степенью G3 в 1 случае экспрессия оценивалась как слабая, в 7 – умеренная и в 4 – выраженная. В то же

время, при статистической обработке результатов (таблица 13) отмечено, что в опухолях с умеренной дифференцировкой частота экспрессии Arr-1 снижается, тогда как в низкодифференцированных светлоклеточных ПКР, наоборот, повышается ($p=0,008$; V Крамера 0,369).

Таблица 12. Экспрессия Arr-1 различной степени выраженности в светлоклеточном ПКР в зависимости от степени опухолевой градации (G).

Выраженность экспрессии	G			Всего
	1	2	3	
0	2	35	5	42
1	0	3	1	4
2	0	9	7	16
3	0	4	4	8
Всего положительных	0	16	12	28

Таблица 13. Корреляционная связь между экспрессией Arr-1 и степенью опухолевой градации (G).

Степень дифференцировки светлоклеточного ПКР	Arr-1		p	Cramer's V
	Есть (n=28)	Нет (n=42)		
G1	0	2 (4,8%)	$p=0,008$	0,369 $p=0,008$
G2	16 (57,1%)	35 (83,3%) ¹		
G3	12 (42,9%)	5 (11,9%) ¹		
Всего	28(100%)	42 (100%)		

Также были исследованы фрагменты 12 метастазов в лимфатические узлы, надпочечник, легкие, кости, кожу, головной мозг от 10 пациентов, у которых первичная опухоль имела строение светлоклеточного ПКР (рисунок 6). В каждом случае проводилась оценка экспрессии Arr-1 как в ткани первичных опухолей, так и в ткани метастазов.

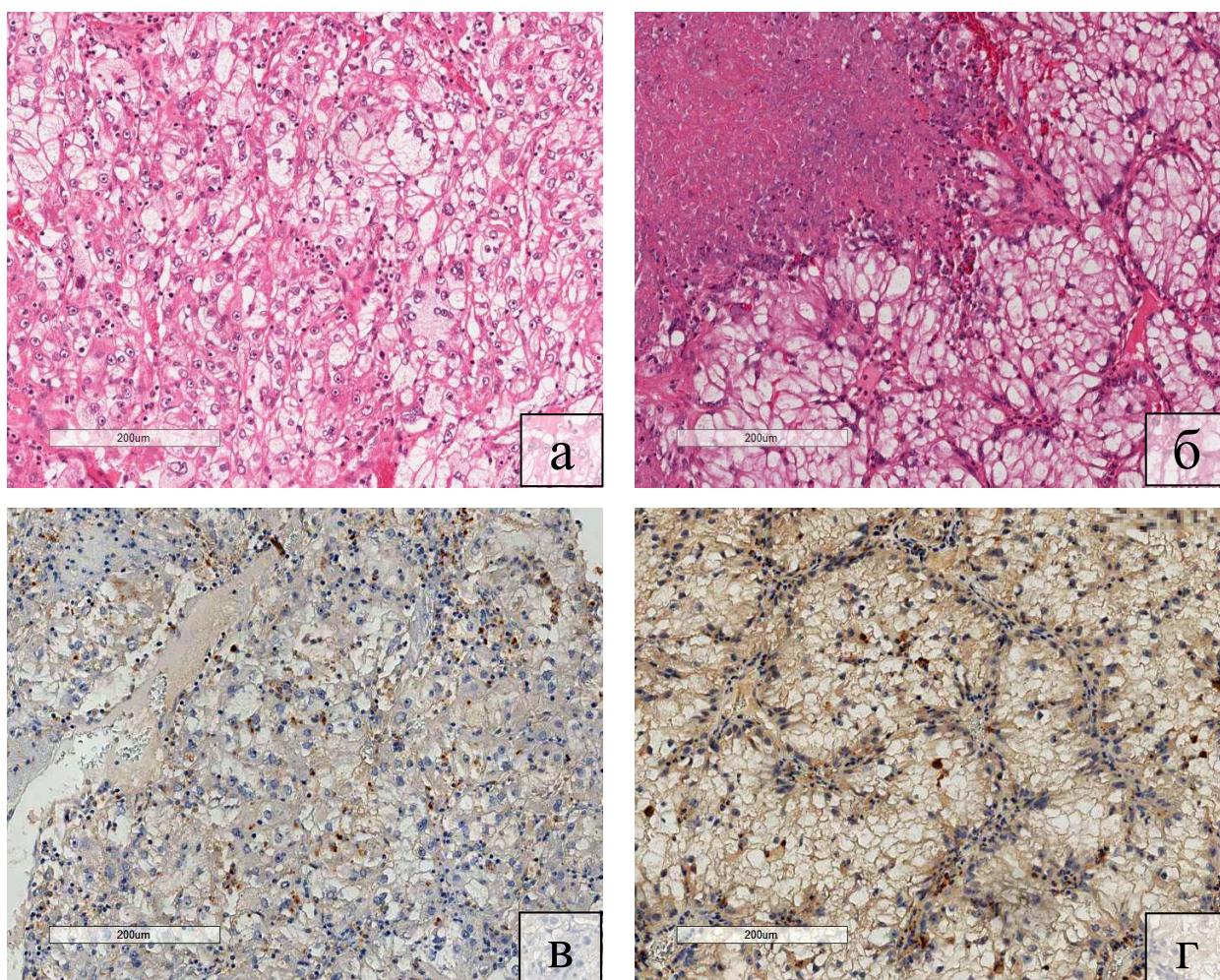


Рисунок 6. Светлоклеточный ПКР: а – первичная опухоль; б – метастаз светлоклеточного ПКР в головной мозг; в – экспрессия Arg-1 в первичной опухоли; г – экспрессия Arg-1 в ткани метастаза. а,б – окраска гематоксилином и эозином, х400; в, г – иммунопероксидазный метод, х400.

Отмечался сходный с первичными опухолями иммуногистохимический профиль: в 8 из 10 (80%) первичных опухолях наблюдалась положительная реакция с антителами к Arg-1, в соответствующих им метастазах также наблюдалась положительная экспрессия. При этом стоит отметить, что выраженность реакции в ткани метастазов превосходила выраженность в первичных опухолях.

При статистической обработке результатов (таблица 14) отмечено, что вероятность экспрессии Arg-1 возрастает при наличии гематогенных метастазов почти в 5 раз ($p=0,026$; V Крамера 0,219) с отношением шансов 5,233 (ДИ 95% 1,072-25,543).

Таблица 14. Корреляционная связь между экспрессией Arr-1 и наличием гематогенных метастазов (М).

Гематогенные метастазы	Arr-1		p	ОШ (ДИ95%)
	Есть (n=52)	Нет (n=52)		
Есть	9 (17,3%)	2 (3,8%)	p=0,026	5,233 (1,072-25,543)
Нет	43 (82,7%)	50 (96,2%)		

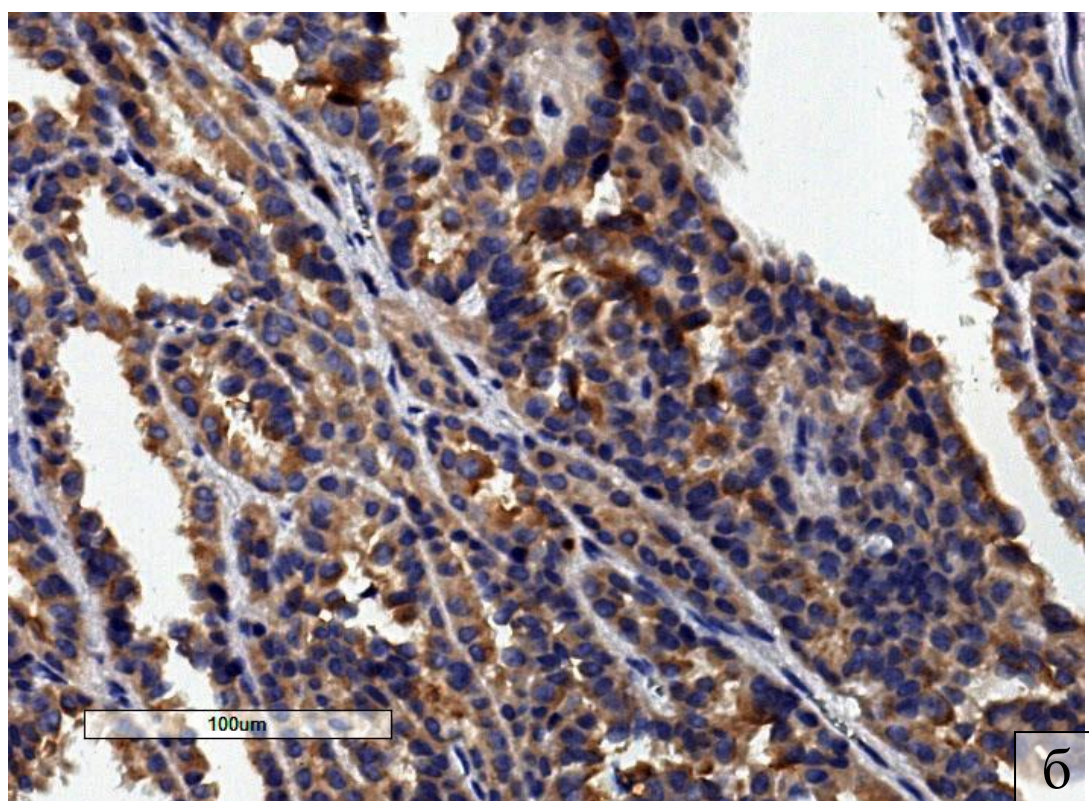
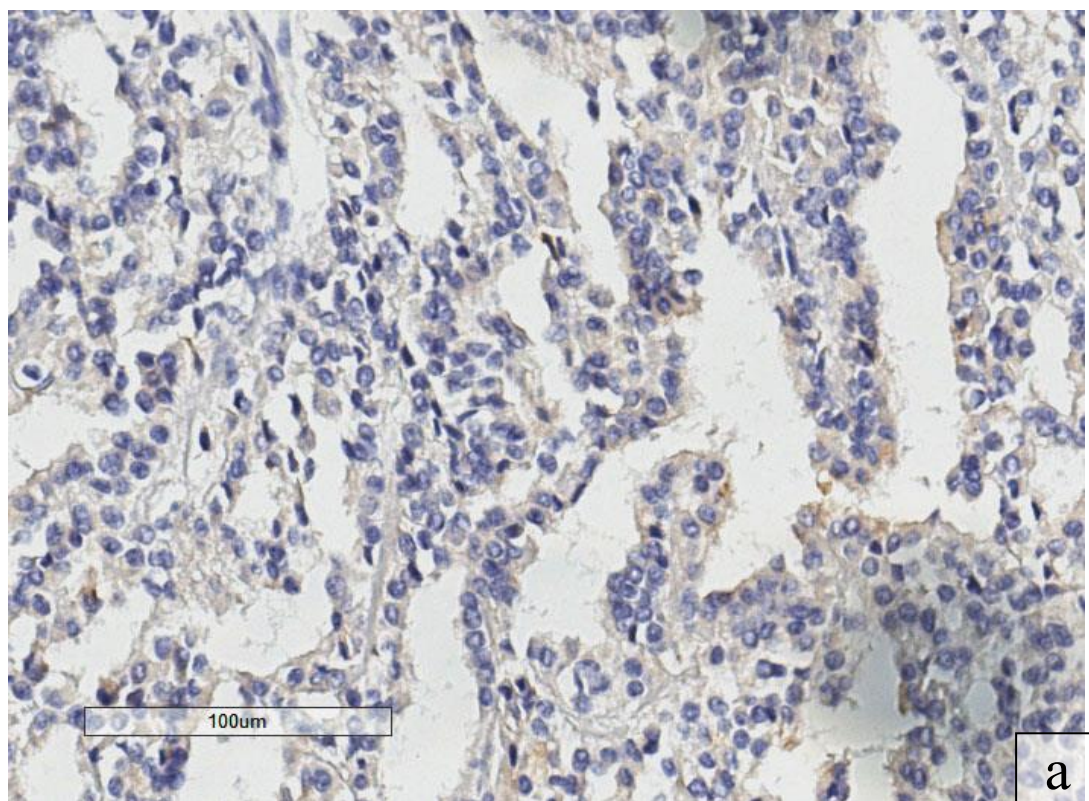


Рисунок 7. Папиллярный ПКР. Экспрессия Arr-1.
Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б –
положительная реакция, x200.

В группе папиллярных ПКР положительная реакция с антителами к Arr-1 наблюдалась в 66,6% случаев.

Среди 18 пациентов с папиллярным ПКР в 2 случаях (11,1%) экспрессия Arr-1 была оценена как слабая, в 8 – умеренная (44,4%) и в 2 (11,1%) – выраженная (таблица 9).

В опухолях, имеющих стадию pT1a только в 2 из 4 случаев, отмечалась положительная реакция с антителами к Arr-1 с умеренной выраженностью экспрессии. В образцах из папиллярных ПКР со стадией pT2a Arr-1-позитивных опухолей было 4, из них в 1 случае определялась слабая степень выраженности экспрессии и в 3 умеренная. В 3 опухолях со стадией pT2b всего по 1 опухоли со слабой и умеренной реакцией. Из 7 случаев pT3a Arr-1-позитивных опухолей было 4, в 2 образцах реакция была оценена как умеренная и в 2 – выраженная (таблица 15).

Таблица 15. Экспрессия Arr-1 различной степени выраженности в группе папиллярных ПКР в зависимости от размера опухоли (pT).

Выраженность экспрессии	pT				Всего
	1a	2a	2b	3a	
0	2	0	1	3	6
1	0	1	1	0	2
2	2	3	1	2	8
3	0	0	0	2	2
Всего положительных	2	4	2	4	12

Зависимость выраженности экспрессии Arr-1 от степени опухолевой градации (G) отражена в таблице 16. В 2 высокодифференцированных папиллярных ПКР экспрессия Arr-1 наблюдалась в 1 случае, из 12 опухолей со степенью G2: в 1 – слабая экспрессия, в 6 – умеренная и в 1 – выраженная. Из 4 опухолей со степенью G3 в 2 случаях экспрессия оценивалась как умеренная и в 1 – выраженная.

Таблица 16. Экспрессия Arr-1 различной степени выраженности в группе папиллярных ПКР в зависимости от степени опухолевой градации (G).

Выраженность экспрессии	G			Всего
	1	2	3	
0	1	4	1	6
1	1	1	0	2
2	0	6	2	8
3	0	1	1	2
Всего положительных	1	8	3	12

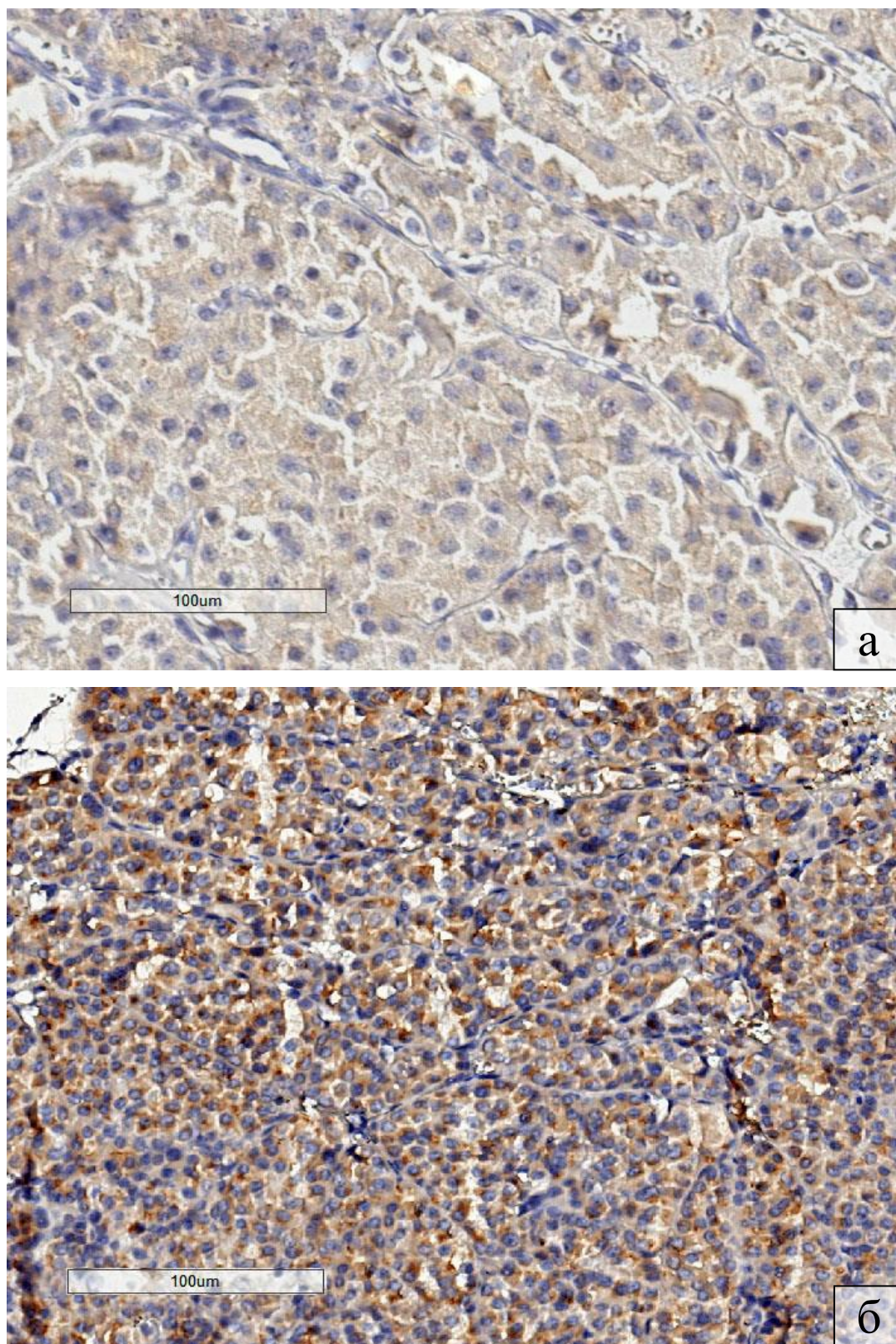


Рисунок 8. Хромофобный ПКР. Экспрессия Arr-1.
Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б –
положительная реакция, x200.

Из 16 пациентов с хромофобным ПКР в 3 случаях (18,7%) наблюдалась слабая экспрессия Arr-1, в 7 – умеренная (43,7%) и в 2 (12,5%) – выраженная (таблица 9).

Во всех опухолях со стадией pT1a (n=2) отмечалась положительная реакция с антителами к Arr-1 с умеренной и выраженной экспрессией (по 1 случаю). В образцах из опухолей со стадией pT1b слабая экспрессия наблюдалась только в 1 случае, при стадии pT2a Arr-1-позитивных опухолей было 2, из них в 1 случае слабая степень выраженности экспрессии и в 1 выраженная. В 3 опухолях со стадией pT2b выявлено 2 с умеренной экспрессией. Все хромофобные ПКР со стадией pT3a оказались Arr-1-позитивными, в 1 образце реакция была оценена как слабая и в 3 – умеренная. В единственной опухоли со стадией pT3b наблюдалась умеренная реакция с антителами к Arr-1 (таблица 17).

Таблица 17. Экспрессия Arr-1 различной степени выраженности в группе хромофобных ПКР в зависимости от размера опухоли (pT).

Выраженность экспрессии	pT						Всего
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	
0	0	2	1	1	0	0	4
1	0	1	1	0	1	0	3
2	1	0	0	2	3	1	7
3	1	0	1	0	0	0	2
Всего положительных	2	1	2	2	4	1	12

У 1 пациента с диагнозом хромофобный ПКР были диагностированы 2 метастаза в лимфатический узел и легкие. Оценка экспрессии Arr-1 в образцах с хромофобным ПКР выявила Arr-1-позитивные клетки как в первичной опухоли, так и в метастазах.

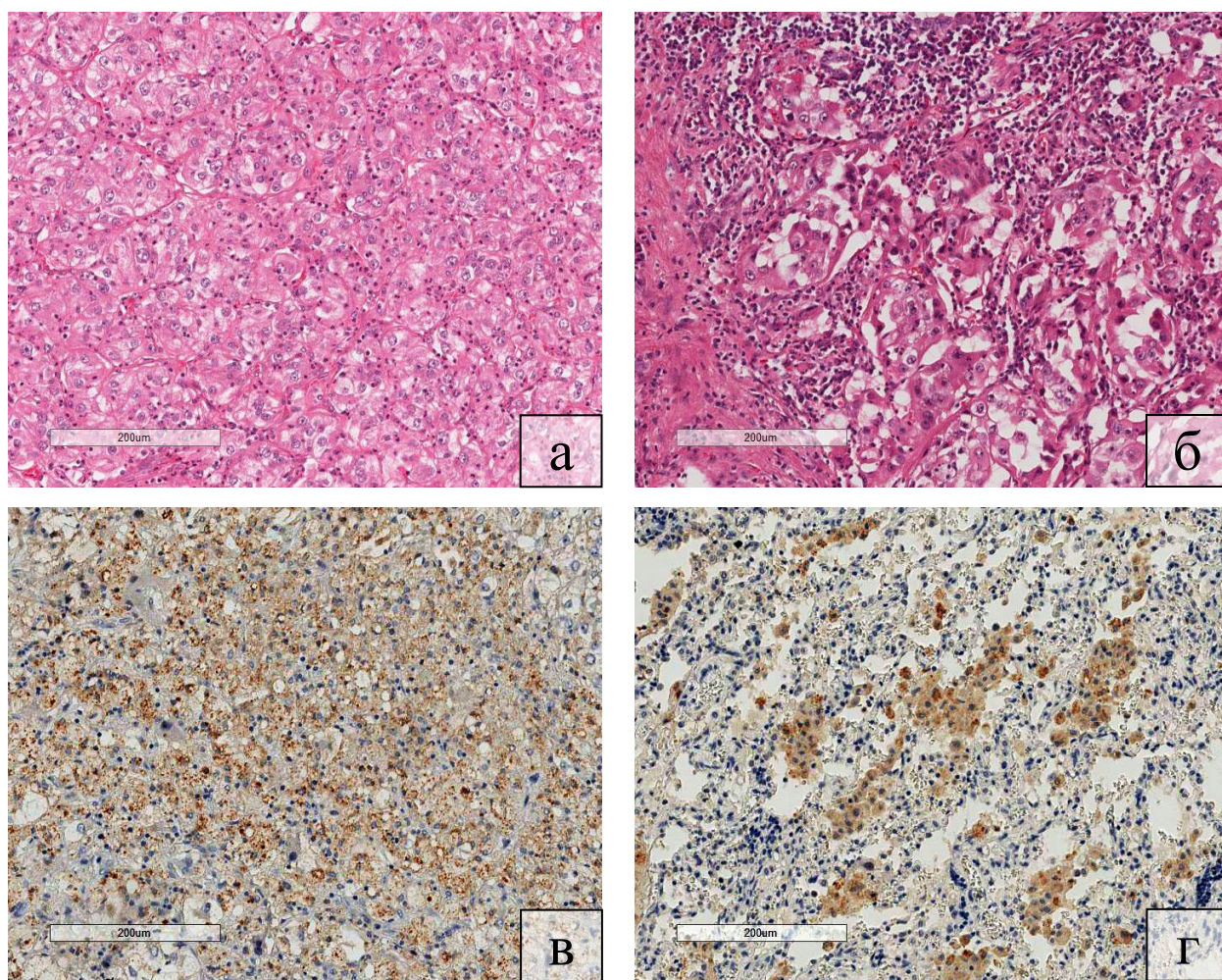


Рисунок 9. Хромофобный ПКР: а – первичная опухоль; б – метастаз хромофобного ПКР в легкие; в – экспрессия Arr-1 в первичной опухоли; г – экспрессия Arr-1 в ткани метастаза. а,б – окраска гематоксилином и эозином, х400; в, г – иммунопероксидазный метод, х400.

Таким образом, было обнаружено, что Arr-1 часто экспрессируется у пациентов с раком почки. Например, он обнаружен в 65 образцах ПКР, что составляет 53,7% всех изученных случаев ПКР. Удивительно, но aberrantная экспрессия Arr-1 также была обнаружена с большей частотой (76,4%) при доброкачественной опухоли почки – онкоцитоме ($p=0,005$; V Крамера 0,327).

При статистической обработке полученных данных обнаруживается четкая взаимосвязь между наличием у пациента онкоцитомы и положительной реакцией с антителами к Arr-1 при иммуногистохимическом исследовании, с тенденцией к увеличению частоты его положительной экспрессии. Также частота экспрессии

Arr-1 повышается со снижением дифференцировки светлоклеточного ПКР и наличием гематогенных метастазов данного типа ПКР.

Таким образом, Arr-1 является неподходящим биомаркером для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных опухолей почек. Тем не менее, частая экспрессия Arr-1 в опухолях делает этот белок многообещающей мишенью для будущих терапевтических тактик лечения ПКР.

В предыдущих исследованиях было доказано, что экспрессия Arr-1 в клетках меланомы вызывает выраженную генерацию соответствующих аутоантител, запускающих MAR [170]. Все опубликованные научные исследования, касающиеся экспрессии Arr-1 при злокачественной опухоли, основаны на обнаружении AAA-1 только у пациентов с диагностированной CAR. Насколько известно, нет никакого другого злокачественного заболевания, кроме меланомы, где аберрантная экспрессия Arr1 была обнаружена прямо, но не косвенно, посредством обнаружения AAA1. То есть, в текущем исследовании впервые изучается экспрессия Arr-1 в опухолях почки.

Рековерин

При анализе экспрессии рековерина было обнаружено, что в группах с одинаковым гистологическим типом опухолей почек есть как Рес-позитивные, так и негативные образцы. Во всех позитивных случаях Рес выявлялся в виде цитоплазматического «dot-like» окрашивания опухолевых клеток.

Позитивная реакция с антителами к Рес наблюдалось в 69,4% опухолей почек как доброкачественных, так и злокачественных. При этом в онкоцитомах аберрантная экспрессия рековерина наблюдалась чаще, в 94,1% случаев, по сравнению с экспрессией в группе ПКР (65,4%).

Соотношение Рес-положительных образцов каждого оцениваемого подтипа ПКР составляло: 68,6% в группе светлоклеточных ПКР, 72,2% в группе папиллярных ПКР, 43,7% в группе хромофобного ПКР

При количественной оценке степени выраженности реакции чаще всего наблюдалась умеренная экспрессия (43,8%) по сравнению со слабой и выраженной (11,6% и 14% соответственно) (таблица 18).

Таблица 18. Экспрессия Рес различной степени выраженности в опухолях почек.

Выраженность экспрессии	Гистологические варианты					p
	Онкоцитома (n=17)	Светлоклеточный ПКР (n=70)	Папиллярный ПКР (n=18)	Хромофобный ПКР (n=16)	Всего (n=121)	
0	1 (5,9%)	22 (31,4%)	5 (27,8%)	9 (56,3%)	37 (30,6%)	p=0,144
1	1 (5,9%)	9 (12,9%)	3 (16,7%)	1 (6,3%)	14 (11,6%)	
2	8 (47%)	34 (48,6%)	7 (38,9%)	4 (25%)	53 (43,8%)	
3	7 (41,2%)	5 (7,1%)	3 (16,7%)	2 (12,5%)	17 (14%)	
Всего положительных	16 (94,1%)	48 (68,6%)	13 (72,2%)	7 (43,7%)	84 (69,4%)	

При статистической обработке данных было отмечено, что частота положительной экспрессии рековерина увеличивалась в опухолях, имеющих строение онкоцитомы и снижалась при диагнозе хромофобный ПКР ($p=0,019$; V Крамера 0,287) (таблица 19).

Таблица 19. Корреляционная связь между морфологией опухоли и экспрессии Рес.

	Группы наблюдения		p	Cramer's V
	Есть рес (n=65)	Нет рес (n=56)		
Онкоцитома	16 (94,1%) ⁸	1 (5,9%)	p=0,019	0,287 p=0,019
Светлоклеточный ПКР	48 (68,6%)	22 (31,4%)		
Папиллярный ПКР	13 (72,2%)	5 (27,8%)		
Хромофобный ПКР	7(43,8%) ⁸	9 (56,3%)		

⁸ статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно первой группы

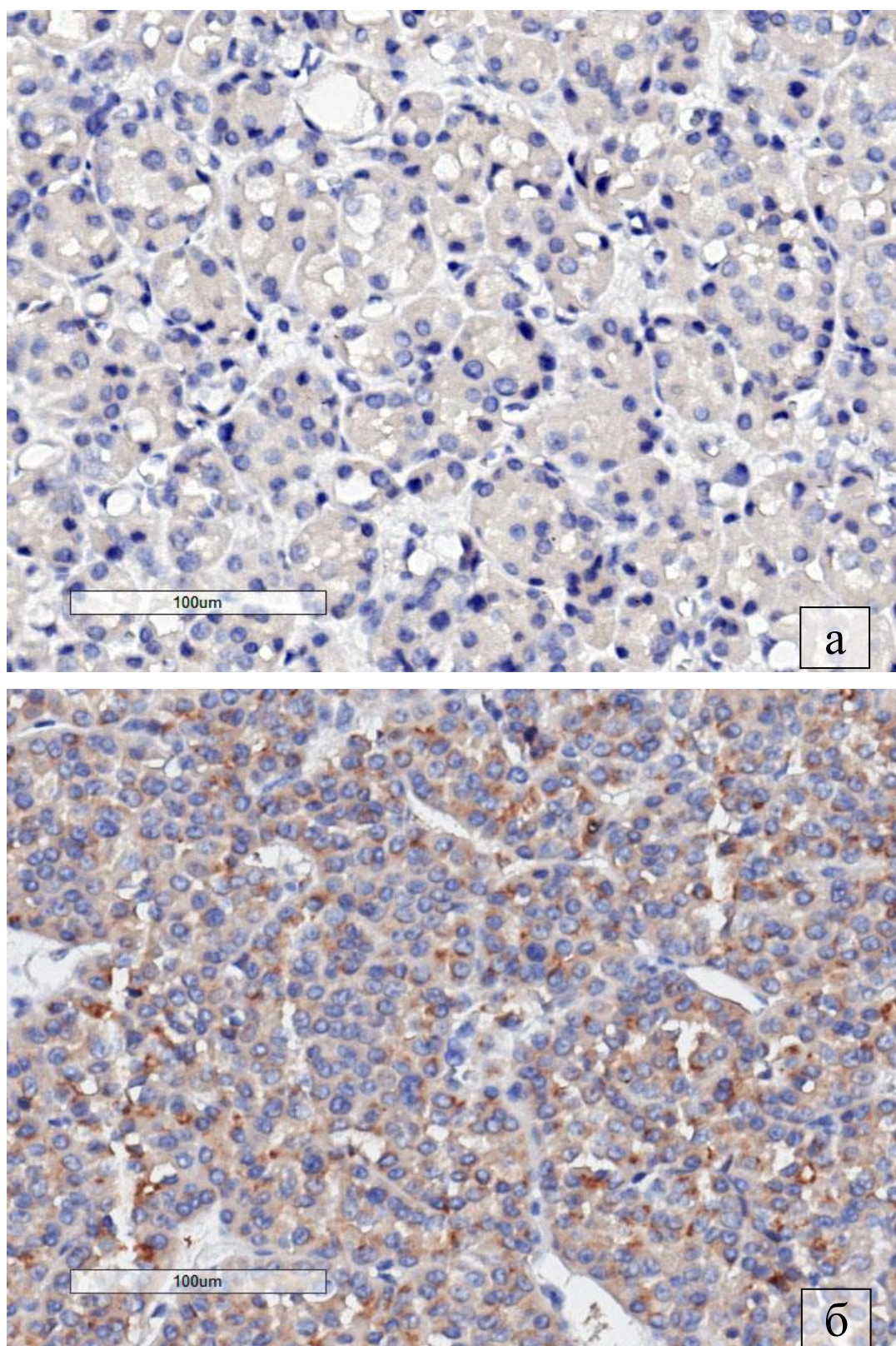


Рисунок 10. Онкоцитома. Экспрессия Rec. Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б – положительная реакция, x200.

При исследовании группы онкоцитом отмечалась высокая частота аберрантной экспрессии рековерина, в 94,1% случаев. При этом выраженность

экспрессии также была представлена на довольно высоком уровне: в 47% умеренная экспрессия, в 41,1% выраженная и лишь в 5,9% экспрессия оценивалась как слабая (таблица 18).

В сравнении с частотой экспрессии аррестина-1, аберрантная экспрессия рековерина в клетках онкоцитомы наблюдалась чаще и была выраженнее (94,1% против 76%). Так при проведении иммуногистохимического исследования препаратов онкоцитомы с антителами к Агг-1 выраженной степени экспрессии не наблюдалось, тогда как при реакции с антителами к Рес, выраженная степень экспрессии определялась в 41,1% случаев.

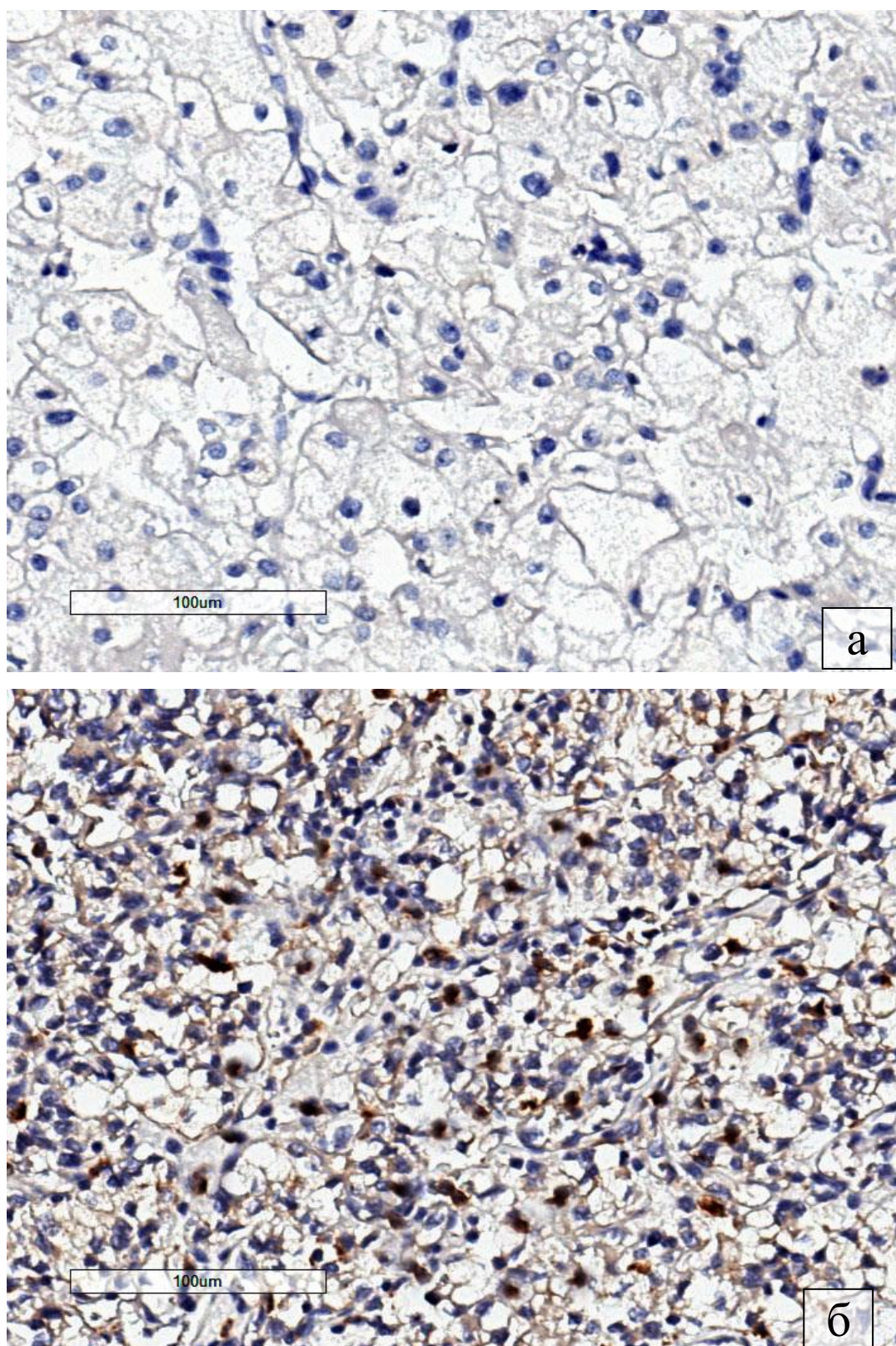


Рисунок 11. Светлоклеточный ПКР. Экспрессия Рес. Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б – положительная реакция, x200.

В опухолях, имеющих строение светлоклеточного ПКР, положительная экспрессия Res, также наблюдалась чаще, чем экспрессия Arg-1, в 68,6%. Основная доля Res-позитивных опухолей демонстрировала умеренную выраженность реакции – 48,6%, в 12,8% экспрессия оценивалась как слабая и в 7,1% - выраженная (таблица 18).

В опухолях, размеры которых соответствовали стадии pT1a в 1 из 11 случаев отмечалась слабая реакция с антителами к Res, в 5 – умеренная и в 1 выраженная. В 3 случаях со стадией pT1b наблюдалась умеренная реакция, в 2 – выраженная. Во всех образцах из светлоклеточных ПКР со стадией pT2a (n=2) отмечалась умеренная экспрессия. В 11 опухолях со стадией pT2b 2 опухоли со слабой реакцией и 7 – с умеренной, выраженная реакция при данной стадии не наблюдалась. Из 22 случаев pT3a Res-позитивных опухолей было 17, в 4 образцах реакция была оценена как слабая, в 11 – умеренная и в 2 – выраженная. При оценке степени экспрессии рековерина в опухолях со стадией pT3b были определены 8 случаев со слабой и умеренной выраженностью реакции (n=2 и 6 соответственно) (таблица 20).

Таблица 20. Экспрессия Res различной степени выраженности в светлоклеточном ПКР в зависимости от размера опухоли (pT).

Выраженность экспрессии	pT						Всего
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	
0	4	2	0	2	5	9	22
1	1	0	0	2	4	2	9
2	5	3	2	7	11	6	34
3	1	2	0	0	2	0	5
Всего	11	7	2	11	22	17	70

В зависимости от степени опухолевой градации (G) распределение Res-позитивных опухолей было следующим (таблица 21): в 2 высокодифференцированных светлоклеточных ПКР отмечалась умеренная экспрессия Res, из 51 опухоли со степенью G2: в 7 – слабая экспрессия, в 27 – умеренная и в 3 – выраженная. Из 17 опухолей со степенью G3 в 2 случае экспрессия оценивалась как слабая, в 5 – умеренная и в 2 – выраженная.

Таблица 21. Экспрессия Rec различной степени выраженности в светлоклеточном ПКР в зависимости от степени опухолевой градации (G).

Выраженность экспрессии	G			Всего
	1	2	3	
0	0	14	8	22
1	0	7	2	9
2	2	27	5	34
3	0	3	2	5
Всего	2	51	17	70

Наряду с первичными опухолями были исследованы фрагменты 12 лимфогенных и гематогенных метастазов от 10 пациентов, у которых первичная опухоль имела строение светлоклеточного ПКР (рисунок 12). В каждом случае проводилась оценка экспрессии Rec как в ткани первичных опухолей, так и в ткани метастазов.

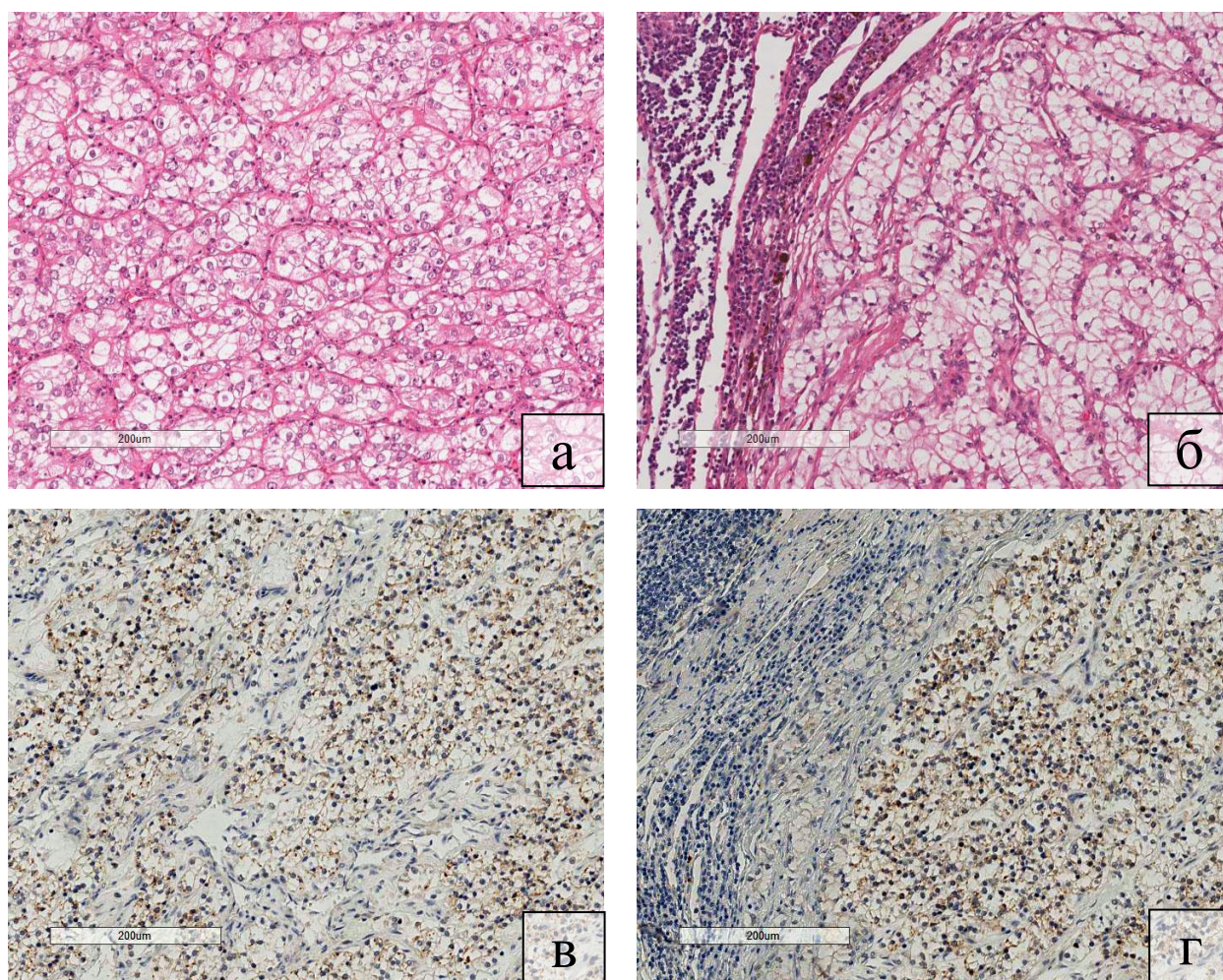


Рисунок 12. Светлоклеточный ПКР: а – первичная опухоль; б – метастаз светлоклеточного ПКР в лимфатический узел; в – экспрессия Res в первичной опухоли; г – экспрессия Res в ткани метастаза. а,б – окраска гематоксилином и эозином, х400; в, г – иммунопероксидазный метод, х400.

Отмечался сходный с первичными опухолями иммуногистохимический профиль: в 5 из 10 (50%) первичных опухолях наблюдалась положительная экспрессия реоверина, в соответствующих им метастазах также наблюдалось положительная реакция. Также выраженность экспрессии в ткани метастазов превосходила выраженность в первичных опухолях. Данное распределение сопоставимо с результатами, полученными при исследовании экспрессии аррестина-1 в клетках метастазов.

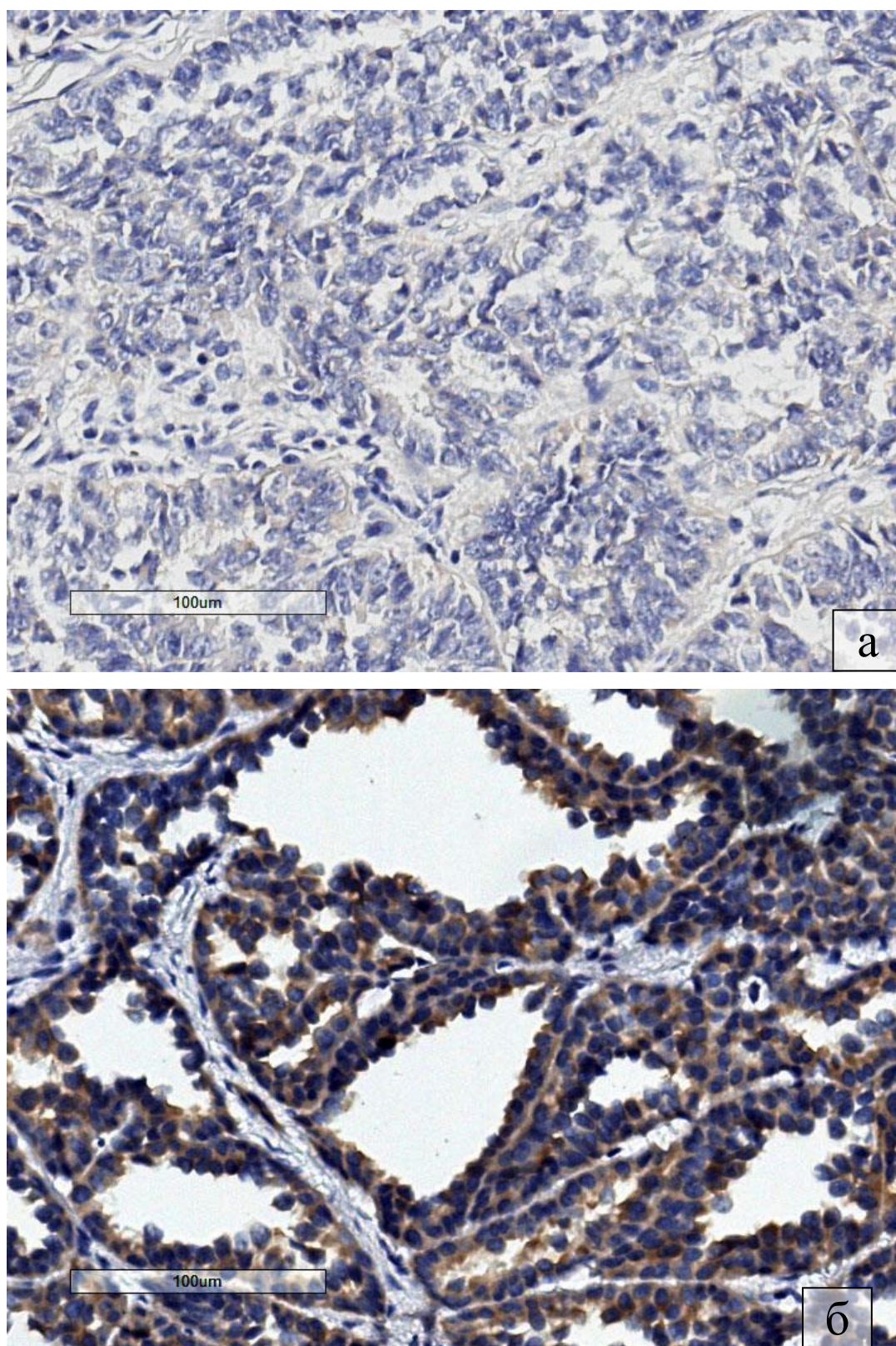


Рисунок 13. Папиллярный ПКР. Экспрессия Рес.
Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б –
положительная реакция, х200.

У 18 пациентов был диагностирован папиллярный ПКР, из них в 3 случаях (16,7%) экспрессия Рес была оценена как слабая, в 7 – умеренная (38,9%) и в 3 (16,7%) – выраженная (таблица 18).

В зависимости от размеров и распространения опухоли распределение экспрессии реоверина было следующим: при стадии pT1a всего в 1 опухоли отмечалась положительная реакция с умеренной выраженностью экспрессии, в фрагментах папиллярных ПКР со стадией pT2a в 2 случаях Рес-положительных опухолей экспрессия была оценена как умеренная и в 1 – выраженная, из 3 опухолей со стадией pT2b всего 2 опухоли с умеренной реакцией, при стадии pT3a во всех образцах отмечалась аберрантная экспрессия реоверина (в 1 случае слабая реакция, в 4 – умеренная и в 2 – выраженная) (таблица 22).

Таблица 22. Экспрессия Рес различной степени выраженности в группе папиллярных ПКР в зависимости от размера опухоли (pT).

Выраженность экспрессии	pT				Всего
	1a	2a	2b	3a	
0	3	1	1	0	5
1	0	0	2	1	3
2	1	2	0	4	7
3	0	1	0	2	3
Всего	4	4	3	7	18

При оценке степени экспрессии реоверина в опухолях разной степени градации были получены следующие результаты (таблица 23). В случаях высокодифференцированных папиллярных ПКР все опухоли оказались Рес-негативными, из 12 опухолей со степенью G2: в 2 – слабая экспрессия, в 6 – умеренная и в 1 – выраженная. Из 4 опухолей со степенью G3 в 1 случае экспрессия оценивалась как слабая, в 1 – умеренная и в 2 – выраженная.

Таблица 23. Экспрессия Рес различной степени выраженности в группе папиллярных ПКР в зависимости от степени опухолевой градации (G).

Выраженность экспрессии	G			Всего
	1	2	3	
0	2	3	0	5
1	0	2	1	3
2	0	6	1	7
3	0	1	2	3
Всего	2	12	4	18

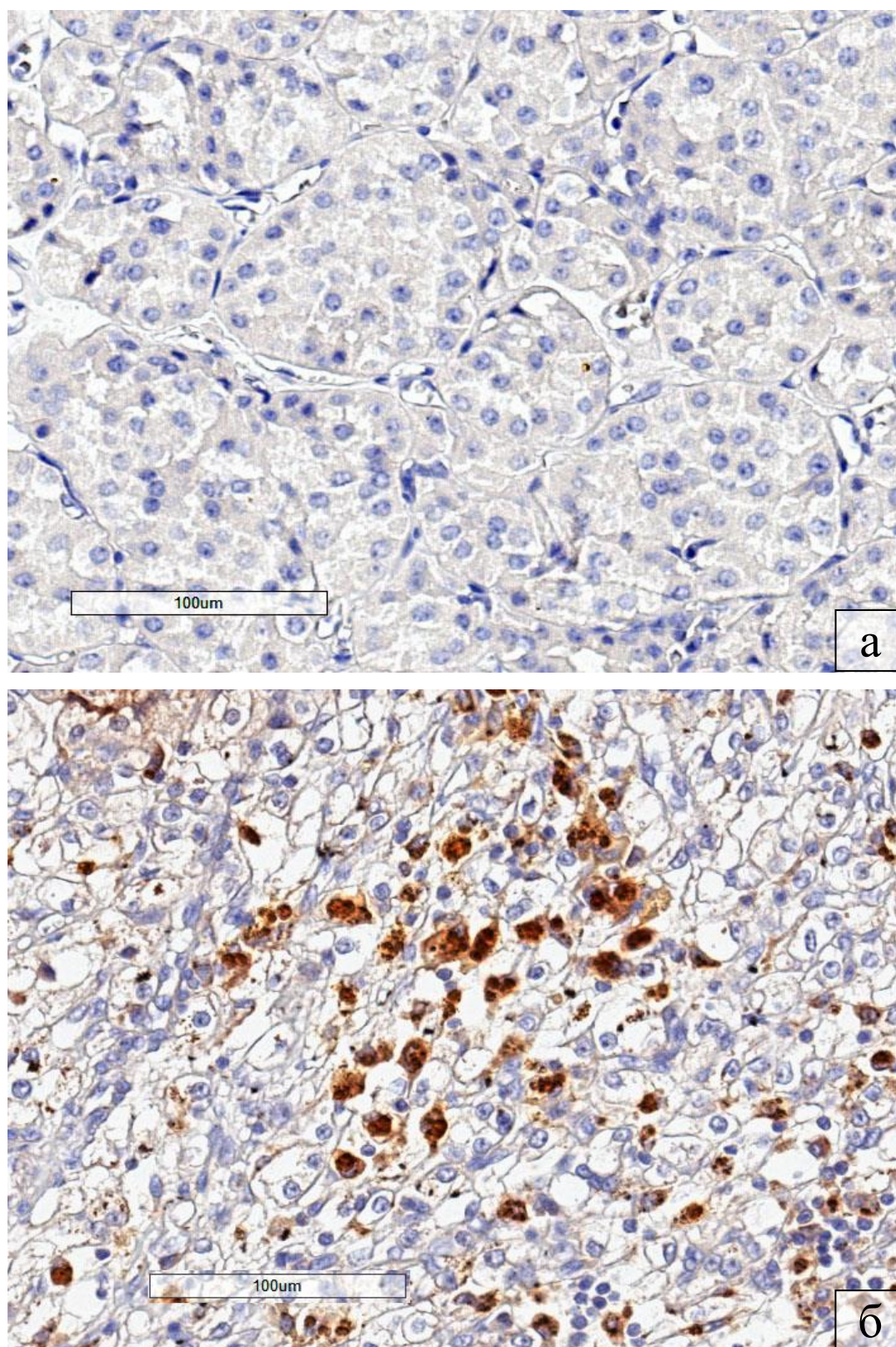


Рисунок 14. Хромофобный ПКР. Экспрессия Res. Иммунопероксидазный метод: а – отрицательная реакция; б – положительная реакция, x200.

В группе пациентов с хромофобным ПКР (n=16) рековерин обнаруживался в 43,7% случаев (n=7). Из них слабая экспрессия отмечалась в 1 случае (6,2%), умеренная – в 4 (25%) и выраженная – в 2 (12,5%) (таблица 18).

При стадии pT1a (n=2), pT1b (n=3), а также pT2b (n=3) рековерин в опухоли не обнаруживался. В опухолях со стадией pT2a Рес-позитивных опухолей было 3, из них в 2 случаях степень выраженности экспрессии оценивалась как умеренная и в 1 – выраженная. В образцах хромофобных ПКР со стадией pT3a (n=4) выявлено по 1 случаю на каждую степень выраженности экспрессии. В единственной опухоли со стадией pT3b наблюдалась умеренная реакция с антителами к Рес (таблица 24).

Таблица 24. Экспрессия Рес различной степени выраженности в группе хромофобных ПКР в зависимости от размера опухоли (pT).

Выраженность экспрессии	pT						Всего
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	
0	2	3	0	3	1	0	9
1	0	0	0	0	1	0	1
2	0	0	2	0	1	1	4
3	0	0	1	0	1	0	2
Всего	2	3	3	3	4	1	16

В единственном случае метастатического хромофобного ПКР, aberrantная экспрессия реоверина была выявлена как в первичной опухоли, так и в ткани метастаза.

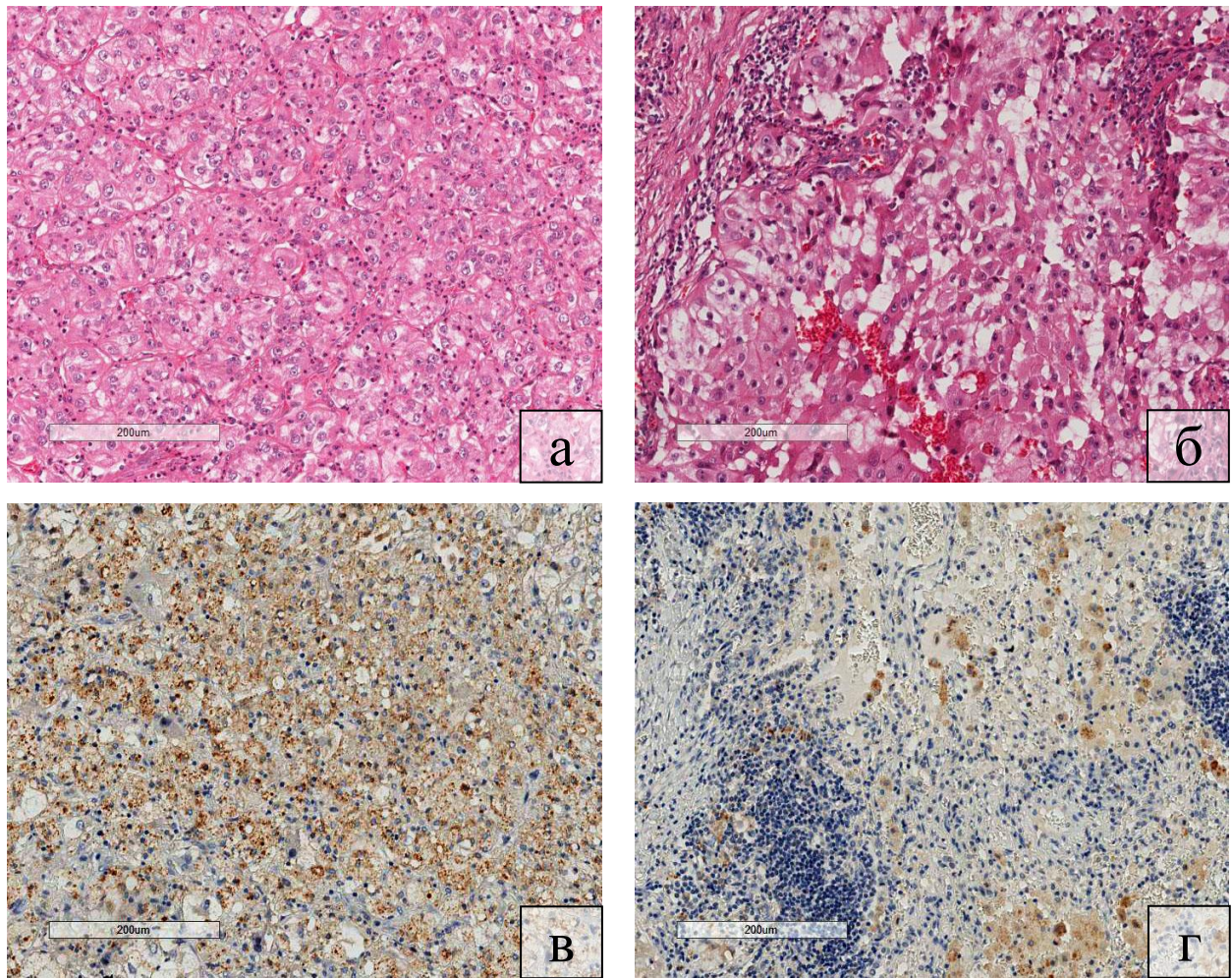


Рисунок 15. Хромофобный ПКР: а – первичная опухоль; б – метастаз хромофобного ПКР в лимфатический узел; в – экспрессия Res в первичной опухоли; г – экспрессия Res в ткани метастаза. а,б – окраска гематоксилином и эозином, х400; в, г – иммунопероксидазный метод, х400.

В предыдущих исследованиях реоверин в качестве раково-сетчаточного антигена был обнаружен в тканях опухолей, у пациентов с раком легких, меланомой, гинекологическими карциномами, раком желудочно-кишечного тракта, раком молочной железы и некоторыми другими типами злокачественных опухолей [21][22][25][135]. По разным данным, частота экспрессии реоверина варьировала от 30 до 80% в зависимости от типа опухоли [22][25][135]. До настоящего времени была опубликована только одна работа об aberrantной

экспрессии рековерина в опухолях почек, с частотой экспрессии 43% [135], что значительно ниже, чем в текущем исследовании. Данное несоответствие можно объяснить техническими различиями между этими двумя исследованиями: в нашей работе были использованы поликлональные антитела против рековерина, тогда как в своем исследовании Мацуо и соавторы применяли моноклональные антитела [135].

Неожиданностью явилась высокая частота экспрессии рековерина в тканях онкоцитомы – доброкачественной опухоли, обладающей низким злокачественным потенциалом, схожей по многим характеристикам со злокачественным хромофобным ПКР [97]. Более того, частота положительной экспрессии рековерина увеличивалась в опухолях, имеющих строение онкоцитомы и снижалась при диагнозе хромофобный ПКР ($p=0,019$; V Крамера 0,287). Но статистически значимых различий между экспрессией рековерина, размером опухоли, степенью опухолевой градации и наличием метастазов обнаружено не было. Таким образом, можно сделать вывод, что экспрессия рековерина не может быть использована в дифференциальной диагностике злокачественных и доброкачественных образований.

ПКР является видом рака с низкой частотой экспрессии опухолевых антигенов. Однако встречаются данные об экспрессии некоторых раково-тестикулярных антигенов (MAGEA1 у 22 %, MAGEA2 у 16 %, MAGEA3 у 76 %, MAGEA4 у 30 %, и SPAG9 у 88 % пациентов) [71][235]. Таким образом экспрессия рековерина сравнима с экспрессией других опухолеспецифических антигенов и также рековерин может быть использован в качестве возможной иммунотерапевтической мишени при лечении опухолей почек.

RCC

Маркер ПКР – моноклональные антитела против гликопротеина, щеточной каемки здоровых проксимальных канальцев почки. Считается специфичным для ПКР. Экспрессия по данным различных источников наблюдается в 70-90% ПКР. Считается, что данный маркер определяется в светлоклеточном и папиллярном раке почки.

В данном исследовании положительная экспрессия RCC наблюдалась в 52,9% всех опухолей почек и в 61,5% ПКР. Наиболее часто она наблюдалась в группе папиллярных ПКР (83,3%), при этом достоверных различий в зависимости от типа папиллярного ПКР выявлено не было. На втором месте по частоте экспрессии находится группа светлоклеточных ПКР (70%). В тканях хромофобного ПКР и онкоцитомы RCC не обнаруживался (таблица 25).

Таблица 25. Экспрессия RCC, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	RCC (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	0	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	49	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	7	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	3	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	5	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	0	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	0	5	5	7
Всего	64	65	84	121

В группе папиллярных опухолей (n=18) одновременная экспрессия Arr-1 и RCC наблюдалась в 61,1%. И в группе светлоклеточных ПКР одновременная aberrантная экспрессия Arr-1 и RCC отмечалась в 27,1%.

Положительная коэкспрессия RCC и Rec определялась в 61,1% папиллярных ПКР и в 50% светлоклеточных ПКР.

Виментин

Белок промежуточных филаментов соединительных тканей и других тканей мезенхимального происхождения. Промежуточные филаменты присутствуют во

всех клетках, и наряду с микротрубочками и актином участвуют в построении цитоскелета. Виментин экспрессируется в большинстве светлоклеточных ПКР (87% – 100%) и в папиллярных ПКР, но очень редко в хромофобных ПКР и онкоцитомах.

Экспрессия виментина отмечалась во всех видах ПКР (n=104) с частотой 77,9%, не выявлялась в образцах онкоцитомы. Так сравнительно высокая частота экспрессии виментина определялась в опухолях со строением светлоклеточного ПКР (91,4%), папиллярного ПКР (88,9%). В опухолях хромофобного ПКР экспрессия виментина наблюдалась только в 1 из 16 образцов (6,3%) (таблица 26).

Таблица 26. Экспрессия Vim, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	Vim (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	0	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	64	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	8	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	3	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	5	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	0	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	1	5	5	7
Всего	81	65	84	121

Коэкспрессия аррестина-1 и виментина в светлоклеточном ПКР наблюдалась в 35,7%, в папиллярном ПКР – 55,6% и в хромофобном ПКР единственная Vim-позитивная опухоль также экспрессировала аррестин-1 (6,3%).

При статистическом подсчете выявлено, что положительная экспрессия виментина снижает вероятность экспрессии Arr-1, так в группе виментин-

негативных опухолей экспрессия Arr-1 наблюдается чаще (44,6%), тогда как в группе виментин-положительных опухолей 80,4% не демонстрируют положительной реакции с антителами против Arr-1 ($p=0,004$; V Крамера 0,265) с отношением шансов 0,303 (ДИ 95% 0,134-0,690). (таблица 27).

Таблица 27. Корреляционная связь между экспрессией Vim и Arr-1 в опухолях почек.

Vim	Arr-1		p	ОШ (ДИ95%)
	Есть (n=65)	Нет (n=56)		
Есть	36 (55,4%)	45 (80,4%)	$p=0,004$	0,303 (0,134-0,690)
Нет	29 (44,6%)	11(19,6%)		

РеCOVERин и виментин также коэкспрессировались в различных типах ПКР, в группе светлоклеточныхкарцином коэкспрессия наблюдалась в 64,3%, в группе папиллярных – 61,1%, в хромофобном ПКР коэкспрессии виментина и реCOVERина не наблюдалось.

CD10

CD10 является поверхностным клеточным гликопротеионом большинства здоровых клеток, несет функцию фермента, гидролизующего пептидные связи, таким образом снижая клеточный ответ на местные пептидные гормоны. Экспрессия CD10 аналогична экспрессии RCC маркера, и почти все светлоклеточные ПКР и папиллярные ПКР положительно реагируют с антителами к CD10, в то время как остальные типы ПКР не являются CD10-позитивными.

Положительная реакция с антителами к CD10 определялось в группах светлоклеточного, папиллярного и хромофобного ПКР с частотой 90%, 88,9% и 6,3% соответственно, в онкоцитомах экспрессии данного маркера не наблюдалось (таблица 28).

Таблица 28. Экспрессия CD10, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	CD10 (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	0	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	63	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	8	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	4	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	4	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	0	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	1	5	5	7
Всего	80	65	84	121

Одновременно экспрессия аррестина-1 и CD10 в группе светлоклеточного ПКР наблюдалась в 23 опухолях (32,9%), в папиллярном ПКР – 61,1% и в хромофобном ПКР единственная CD10-позитивная опухоль также экспрессировала аррестин-1 (6,3%).

При статистическом анализе всех результатов, отмечено также, что положительная экспрессия CD10 снижает вероятность экспрессии Arr-1 ($p=0,001$; V Крамера 0,314) с отношением шансов 0,238 (ДИ 95% 0,103-0,552). (таблица 29).

Таблица 29. Корреляционная связь между экспрессией CD10 и Arr-1 в опухолях почек.

CD10	Arr-1		p	ОШ (ДИ95%)
	Есть (n=65)	Нет (n=56)		
Есть	34 (52,3%)	46 (82,1%)	$p=0,001$	0,238 (0,103-0,552)
Нет	31 (42,7%)	10(17,9%)		

Коэкспрессия реоверины и CD10 в группе светлоклеточных карцином наблюдалась в 64,3%, в группе папиллярных – 61,1%, в хромофобном ПКР коэкспрессии с реоверином не наблюдалось.

РАХ8

Фактор транскрипции, участвующий в эмбриогенезе и развитии почки щитовидной железы, и Мюллеровой системы. В почке взрослого человека РАХ8 обнаруживается в эпителиальных клетках канальцев почки и в капсуле Боумана-Шумлянского. Считается специфическим маркером ПКР.

Экспрессия РАХ8 наблюдалась во всех типах ПКР, отсутствовала в тканях онкоцитомы. Так положительная экспрессия наблюдалась в 78,6 % светлоклеточного ПКР, в 55,6% папиллярного ПКР и в 50% хромофобных ПКР (таблица 30).

При изучении коэкспрессии с раково-сетчаточными антигенами были получены следующие результаты: одновременная реакция с антителами к аррестину-1 и РАХ8 в группе светлоклеточных ПКР составила 34,3 % (n=24), папиллярных ПКР – 33,3% (n=6), хромофобных ПКР – 50 % (n=8); реакция с антителами к реоверину и РАХ8 в группе светлоклеточных ПКР составила 54,3% (n=38), папиллярных – 33,3% (n=6), хромофобных – 18,7% (n=3).

Таблица 30. Экспрессия PAX8, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	PAX8 (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	0	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	55	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	6	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	2	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	2	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	3	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	5	5	5	7
Всего	73	65	84	121

СК7

Белок, входящий в состав внутриклеточных промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. СК 7 положителен в большинстве папиллярных ПКР, раке собирательных трубочек и в уротелиальной карциноме, но негативен в большинстве светлоклеточных ПКР.

Так в результате исследования отмечалось отсутствие экспрессии в клетках онкоцитомы, небольшая частота (n=4, 5,7%) в группе светлоклеточных ПКР, значительная экспрессия в опухолях со строением папиллярного ПКР (n=14, 77,8%) и хромофобного ПКР (n=14, 87,5%) (таблица 31).

Таблица 31. Экспрессия CK7, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	CK7 (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	0	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	4	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	7	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	3	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	4	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	8	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	6	5	5	7
Всего	32	65	84	121

Коэкспрессия с Arr-1 в группе светлоклеточных ПКР наблюдалась в 2,9% (n=2), папиллярных ПКР – 44,4% (n=8), хромофобных ПКР – 62,5% (n=10). Коэкспрессия с Rec составила 2,9% (n=2), 55,6% (n=10) и 31,2% (n=5) соответственно.

При анализе данных, отмечено, что при положительной экспрессии CK7 в опухолях почки частота экспрессии Rec снижается ($p=0,020$; V Крамера 0,212) с отношением шансов 0,372 (ДИ 95% 0,160-0,866). (таблица 32).

Таблица 32. Корреляционная связь между экспрессией CK7 и Rec в опухолях почек.

CK7	Rec		p	ОШ (ДИ95%)
	Есть (n=84)	Нет (n=37)		
Есть	17 (20,2%)	15 (40,5%)	$p=0,020$	0,372 (0,160-0,866)
Нет	67 (79,8%)	22(59,5%)		

ЕМА

Эпителиальный мембранный антиген, ЕМА, обеспечивающий Ca^{2+} -независимую гомотипическую межклеточную адгезию, выявляется в нормальном эпителии большинства органов, обнаруживается в стволовых клетках. Снижение синтеза этого белка усиливает инвазивный потенциал опухолей.

Частота выявления ЕМА в светлоклеточном ПКР составила 92,9% (n=65), в папиллярном – 88,9% (n=16), в хромофобном – 87,5 % (n=14), в онкоцитомах – 88,2% (n=15) (таблица 33).

Экспрессия совместно с Arr-1 в группе светлоклеточных ПКР наблюдалась в 37,1% (n=26), папиллярных ПКР – 55,6% (n=10), хромофобных ПКР – 68,8% (n=11), онкоцитом – 64,7% (n=11). Коэкспрессия с Rec составила 64,3% (n=45), 61,1% (n=11), 37,5% (n=6) и 82,4% (n=14) соответственно.

Таблица 33. Экспрессия ЕМА, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	ЕМА (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	15	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	65	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	8	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	3	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	5	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	8	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	6	5	5	7
Всего	110	65	84	121

E-cadherin

E-cadherin, обеспечивающий адгезивные свойства клеток, является важным регулятором клеточного цикла, участвует в Wnt-пути. В норме экспрессируется клетками канальцев почки и многими другими типами клеток. Хотя почти все хромофобные ПКР и онкоцитомы экспрессируют E-cadherin, его экспрессия была также описана в других эпителиальных опухолях почки.

Положительная экспрессия E-cadherin отмечалась как в ПКР, так и в онкоцитомах со следующей частотой: 88,2% (n=15) в онкоцитомах, 5,7% (n=4) в светлоклеточных ПКР, 33,3% (n=6) – папиллярных ПКР, 87,5% (n=14) – хромофобных ПКР (таблица 34).

Одновременно экспрессия Arr-1 и E-cadherin в группе онкоцитом наблюдалась в 70,6% (n=12), в папиллярном ПКР – 22,2% (n=4) и в хромофобном ПКР – 62,5% (n=10), в группе светлоклеточных ПКР коэкспрессии с аррестином-1 не наблюдалось.

Коэкспрессия рековерина и E-cadherin в группе онкоцитом отмечалась в 82,3% (n=14), светлоклеточных карцином – в 2,9% (n=2), в группе папиллярных – 22,2% (n=4), в хромофобном ПКР частота коэкспрессии с рековерином составила 37,5% (n=6).

Таблица 34. Экспрессия E-cadherin, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	E-cadherin (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	15	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	4	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	3	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	1	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	2	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	7	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	7	5	5	7
Всего	39	65	84	121

S100A

Ca²⁺ связывающий белок, участвующий в межклеточном взаимодействии, регуляции клеточного цикла и дифференцировке клеток.

Частота обнаружения данного белка в различных типах опухолей почек была следующей: в группе онкоцитом – 76,5% (n=13), светлоклеточных ПКР – 77,1% (n=54), папиллярных ПКР – 66,7% (n=12), хромофобных ПКР – 31,3% (n=5) (таблица 35).

Коэкспрессия Arr-1 и S100A в группе онкоцитом наблюдалась в 58,8% (n=10), в светлоклеточном ПКР – 30% (n=30), в папиллярном ПКР – 38,9% (n=7) и в хромофобном ПКР – 12,5% (n=2).

Коэкспрессия с реверерином в группе онкоцитом отмечалась в 70,6% (n=12), светлоклеточных ПКР – в 48,6% (n=34), в группе папиллярных – 50% (n=9), в хромофобном ПКР частота коэкспрессии с реверерином составила 18,8% (n=3).

Таблица 35. Экспрессия S100A, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	S100A (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	13	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	54	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	7	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	1	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	4	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	1	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	4	5	5	7
Всего	84	65	84	121

AMACR (P504S)

Рацемаза (α-метилацил-коэнзим А рацемаза, AMACR, EC 5.1.99.4, p504) – фермент, участвующий в катаболизме жирных и желчных кислот. Кроме того, данный белок играет важную, еще не определенную роль в патогенезе некоторых карцином, в частности, предстательной железы, почки. Мембранная экспрессия рацемазы в нормальной ткани почки определяется в эпителии дистальных канальцев. Данный белок используется для дифференциальной диагностики ПКР, являясь маркером папиллярного рака. При этом, рацемаза может экспрессироваться и в других гистологических вариантах ПКР (в светлоклеточном, хромофобном).

Как и предполагалось, высокий уровень экспрессии рацемазы встречался в группе папиллярных ПКР с частотой 73,7% (n=14), в то время как в остальных типах опухолей почек данного белка не обнаружено (таблица 36).

Коэкспрессия с аррестином-1 в данной опухоли отмечалась в 50% (n=9) и с рековерином в 61,1% (n=11).

Таблица 36. Экспрессия AMACR, Arr-1 и Rec в разных опухолях почек.

Морфология	AMACR (n)	Arr-1 (n)	Rec (n)	Всего
Онкоцитома	0	13	16	17
Светлоклеточный ПКР	0	28	48	70
Папиллярный ПКР 1 тип	7	6	6	9
Папиллярный ПКР 2 тип	3	3	3	4
Папиллярный ПКР смешанный тип	4	3	4	5
Хромофобный ПКР классический вариант	0	7	2	9
Хромофобный ПКР эозинофильный вариант	0	5	5	7
Всего	14	65	84	121

Множественный логистический регрессионный анализ

С целью оценки предикторов экспрессии аррестина-1 на основании данных 121 пациента была построена логистическая регрессионная модель, включающая два статистически значимых предиктора:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(2,207 + 1,368x_1 + 1,419x_2)}}$$

где

p – вероятность наличия экспрессии аррестина-1,

x_1 – морфология (наличие у пациента онкоцитомы);

x_2 – степень дифференцировки опухоли (категории 1 – высокодифференцированная, 2 – умеренно дифференцированная, 3 – низкодифференцированная);

Модель является статистически значимой ($\chi^2=13,192$; $p=0,001$) и согласованной с исходными данными (по Хосмеру-Лемешеву $p=0,960$). На

четвертом шаге построения модель характеризуют следующие параметры (таблица 37):

Таблица 37. Сводные данные по регрессионной модели прогнозирования экспрессии аррестина-1 на основании характеристик опухоли почки

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость (p)	OR	95% ДИ для OR	
						Нижняя	Верхняя
Морфология опухоли (наличие онкоцитомы)	1,368	0,602	5,160	0,023	0,255	0,078	0,829
Степень дифференцировки опухоли	1,419	0,503	7,958	0,005	4,132	1,542	11,073
Константа	-2,207	1,134	3,788	0,052	0,110		

На основании значений коэффициентов регрессии видно, что экспрессия аррестина-1 ассоциирована со снижением дифференцировки ткани опухоли и с наличием онкоцитомы.

Для данной модели коэффициент детерминации (R^2) составил 0,186, что показывает статистически значимое объяснение данными предикторами дисперсии переменной отклика на 18,6%. При этом модель обладает 79,2%-ной специфичностью в плане предсказания отсутствия экспрессии аррестина-1. Чувствительность модели для определения наличия экспрессии аррестина-1 составила 57,5%. Общий процент корректных предсказаний достигает 69,3%.

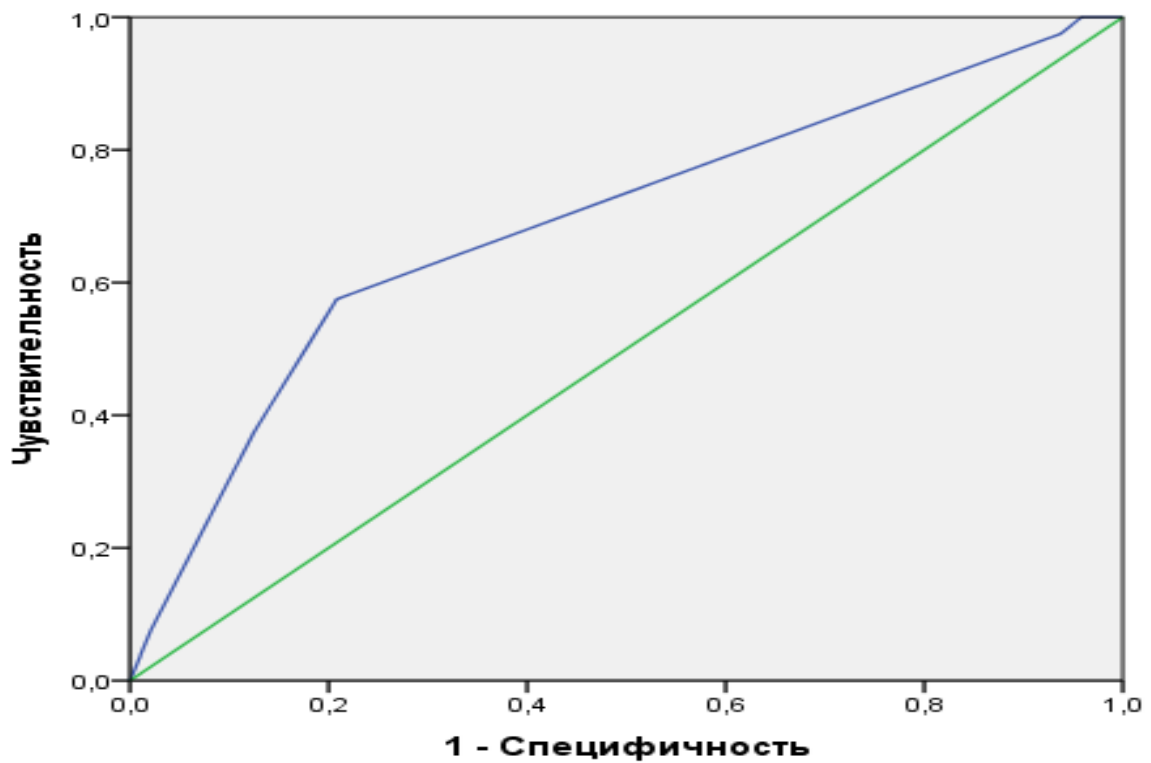


Рисунок 16. ROC-кривая прогнозирования экспрессии аррестина-1 на основании характеристик опухоли почки.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,691 \pm 0,058$ (ДИ 95% 0,578-0,804; $p=0,002$), что указывает на среднее качество прогностической модели.

Далее, на основании данных тех же пациентов, были протестированы предиктивные качества различных опухолевых маркеров для экспрессии аррестина-1.

Пошаговым методом была построена регрессионная модель, основанная только на маркерах, вносящих статистически значимый вклад в результаты прогнозирования. В регрессионную модель вошел только один статистически значимый параметр:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(1,131 - 1,434x_1)}}$$

где

p – вероятность наличия экспрессии аррестина-1,

x_1 – Экспрессия CD10 (0 – нет, 1 – да);

Модель является согласованной с исходными данными (по Хосмеру-Лемешеву $p=0,186$) и статистически значимой ($\chi^2=12,421$; $p < 0,001$).

Данные по регрессионной модели представлены в таблице 38.

Таблица 38. Сводные данные по регрессионной модели прогнозирования экспрессии аррестина-1 на основании экспрессии CD10.

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость (p)	Exp(b)	95% ДИ для Exp(b)	
						Нижняя	Верхняя
Экспрессия CD10	-1,434	0,428	11,207	0,001	0,238	0,103	0,552
Константа	1,131	0,364	9,679	0,002	3,100		

На основании значений коэффициента регрессии видно, что экспрессия аррестина-1 ассоциирована со снижением вероятности экспрессии CD10.

Коэффициент детерминации (R^2) для данной модели составил 0,130, что указывает на статистически значимое объяснение изменений переменной отклика выбранными предикторами на 13,0%. При этом специфичность модели составляет 82,1%. Точность прогнозирования экспрессии аррестина-1 - 47,7%. Общий процент корректных предсказаний составил 63,6%.

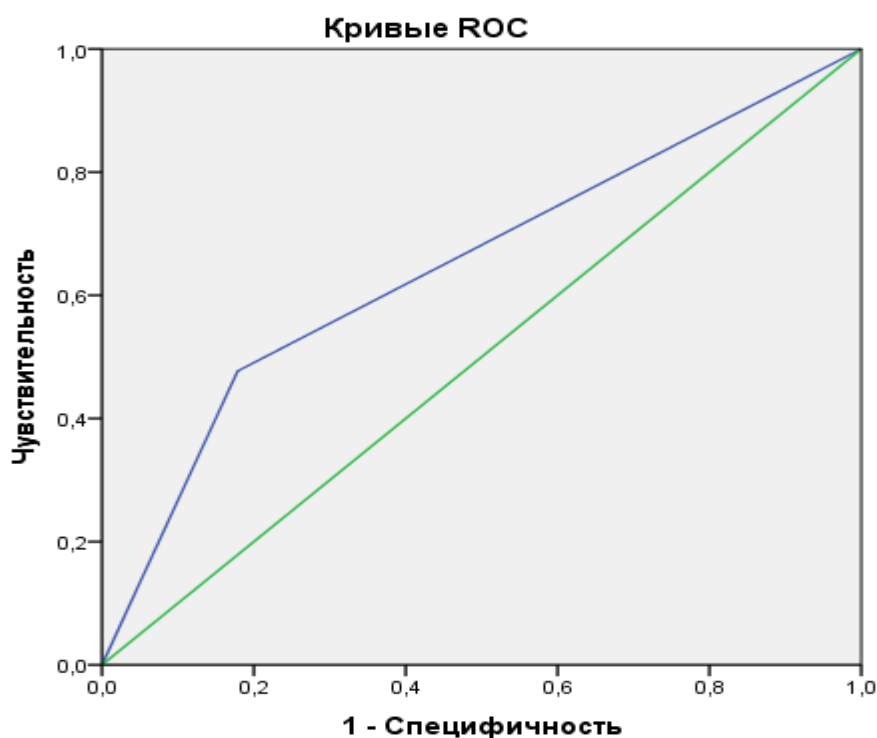


Рисунок 17. ROC-кривая прогнозирования экспрессии аррестина-1 на основании экспрессии CD10.

По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил $0,649 \pm 0,050$ (ДИ 95% 0,551- 0,747; $p=0,005$), что указывает на среднее качество прогностической модели.

Далее была сформирована регрессионная модель с целью оценки предикторов экспрессии реверина. Пошаговым методом был выбран наиболее значимый показатель - морфология опухоли.

Полученное уравнение имеет следующий вид:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(2,271 - 0,618x_1)}}$$

где

p – вероятность наличия экспрессии реверина,

x_1 – морфология опухоли (категории: 1 - онкоцитома, 2- светлоклеточный ПКР, 3 - папиллярный ПКР, 4 - хромофобный ПКР).

Согласованность модели подтверждена критерием Хосмера-Лемешева ($p=0,989$). Модель является статистически значимой по критерию хи-квадрат ($\chi^2=11,041$; $p=0,012$).

Данные о предикторах модели представлены в таблице 39.

Таблица 39. Сводные данные по регрессионной модели прогнозирования экспрессии реверина на основании характеристик опухоли почки.

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость(p)	OR	95% Доверит. интервал для OR	
						Нижняя	Верхняя
Морфология опухоли	-0,618	0,233	6,996	0,008	0,539	0,341	0,852
Константа	2,271	0,599	14,378	<0,001	9,692		

Коэффициент детерминации (R^2) модели составил 0,123, что указывает на статистически значимое объяснение отобранным предиктором 12,3% дисперсии зависимой переменной. Модель характеризует высокая чувствительность (предсказание наличия экспрессии реверина - в 91,7%). Специфичность модели (правильное предсказание отсутствия экспрессии реверина) составила 24,3%. Общая доля корректных предсказаний - 91,1%.

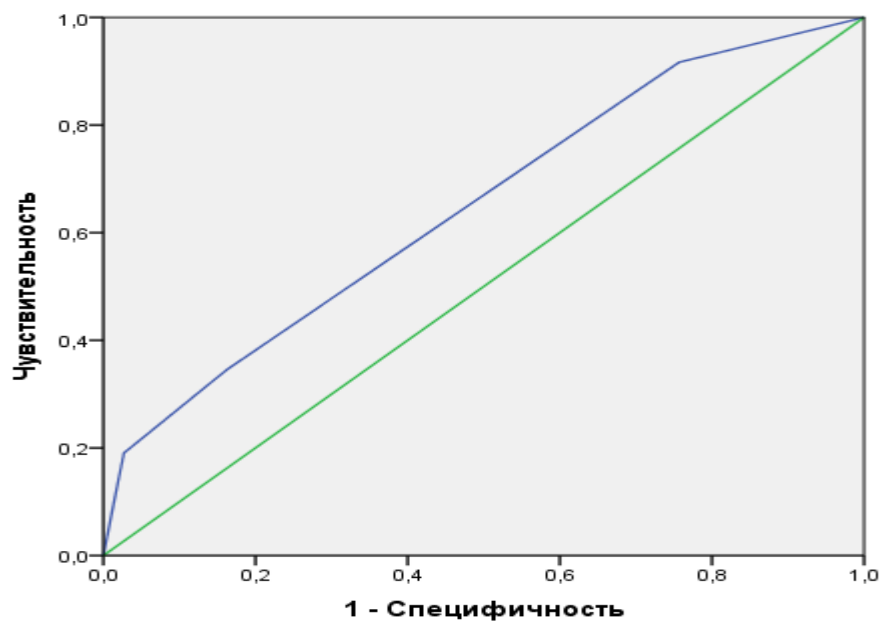


Рисунок 18. ROC-кривая прогнозирования экспрессии реверина на основании характеристик опухоли почки.

Показатель AUC составил $0,647 \pm 0,053$ (ДИ 95% 0,543-0,751; $p=0,010$), что свидетельствует о среднем качестве прогностической модели.

При построении пошаговым методом регрессионной модели экспрессии рековерина на основании только опухолевых маркеров было получено следующее уравнение:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(1,131 - 1,434x_1)}}$$

где

p – вероятность наличия экспрессии аррестина-1,

x_1 – Экспрессия СК7 (0 – нет, 1 – да);

Модель является согласованной с исходными данными (по Хосмеру-Лемешеву $p=0,143$) и статистически значимой ($\chi^2=5,217$; $p=0,02$).

Данные по регрессионной модели представлены в таблице 40.

Таблица 40. Сводные данные по регрессионной модели прогнозирования экспрессии рековерина на основании экспрессии СК7.

Предикторы	Коэфф. регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость(p)	Exp(b)	95% ДИ для Exp(b)	
						Нижняя	Верхняя
Экспрессия СК7	- 0,988	0,431	5,257	0,022	0,372	0,160	0,022
Константа	1,114	0,246	20,540	<0,001	3,045		

На основании значений коэффициента регрессии видно, что экспрессия рековерина ассоциирована со снижением вероятности экспрессии СК7.

Коэффициент детерминации (R^2) для данной модели составил 0,060, что указывает на статистически значимое объяснение изменений переменной отклика выбранными предикторами на 6,0%. При этом модель обладает 100% чувствительностью для предсказания экспрессии рековерина, но не может правильно предсказывать отсутствие его экспрессии. Общий процент корректных предсказаний составил 69,4%.

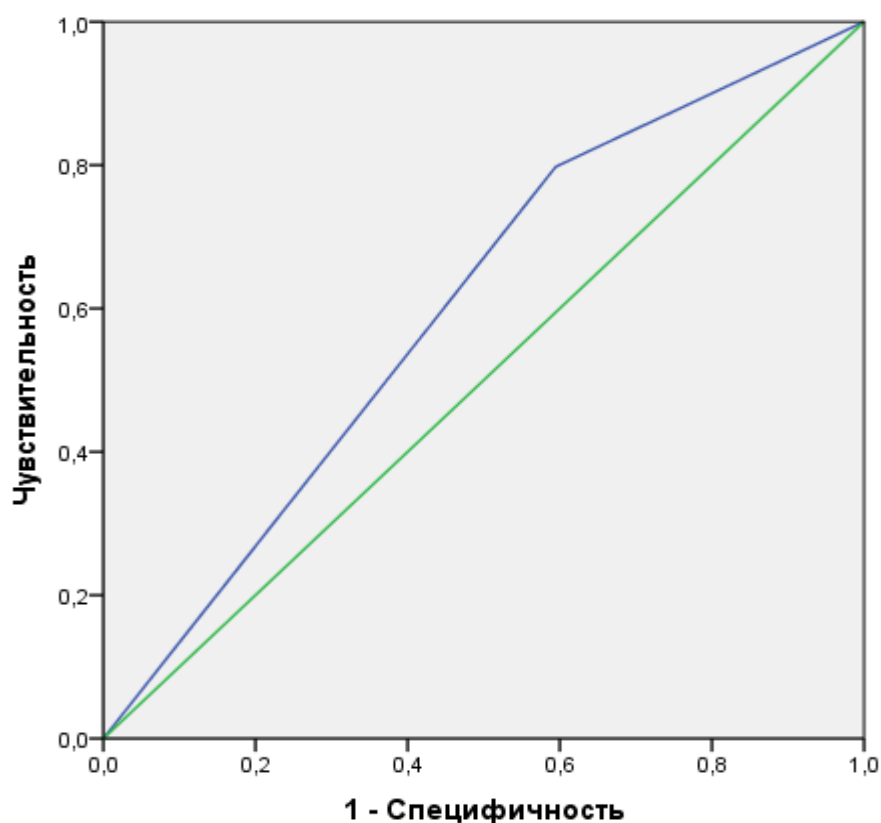


Рисунок 19. ROC-кривая прогнозирования экспрессии реоверина на основании экспрессии СК7.

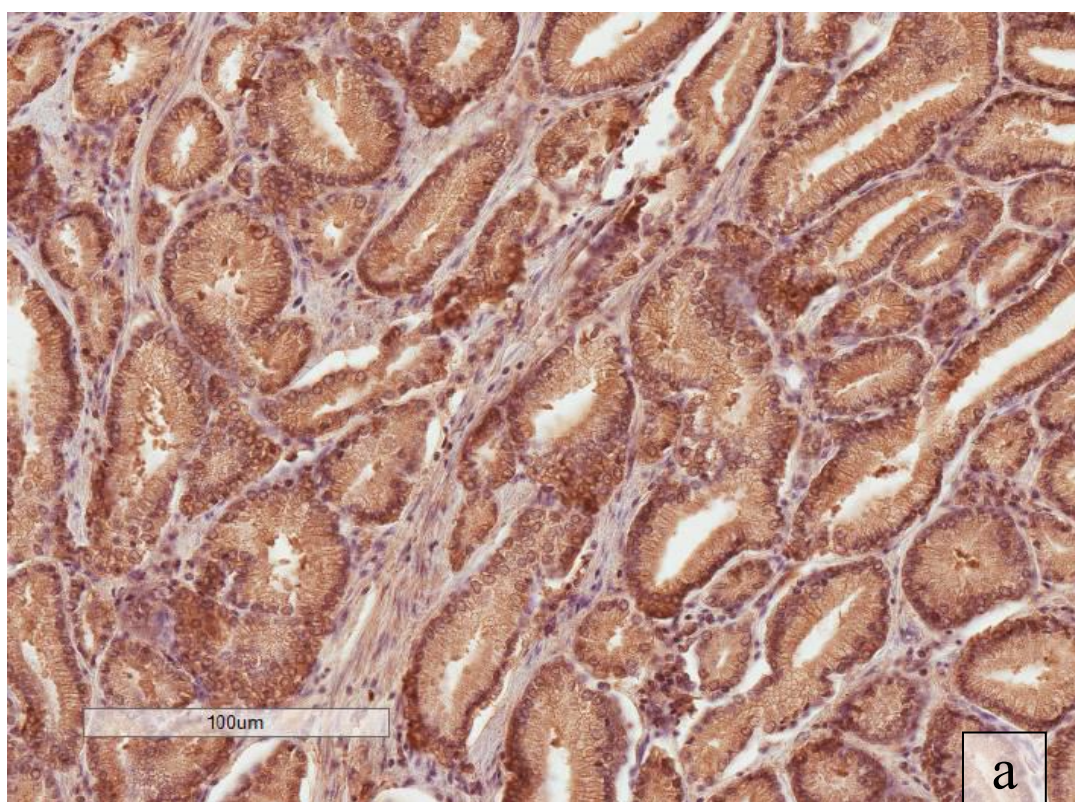
ROC-анализ указывает на недостаточную статистическую значимость модели для прогнозирования экспрессии реоверина. Показатель AUC составил $0,602 \pm 0,058$ (ДИ 95% 0,488-0,715; $p=0,076$).

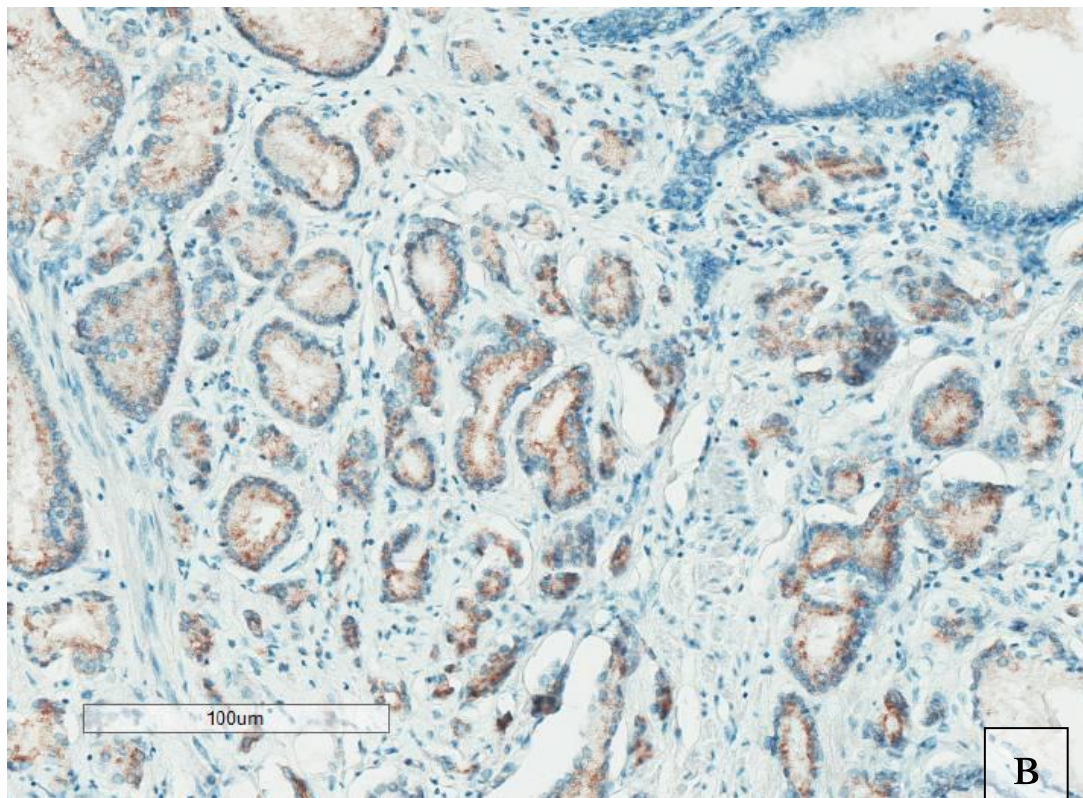
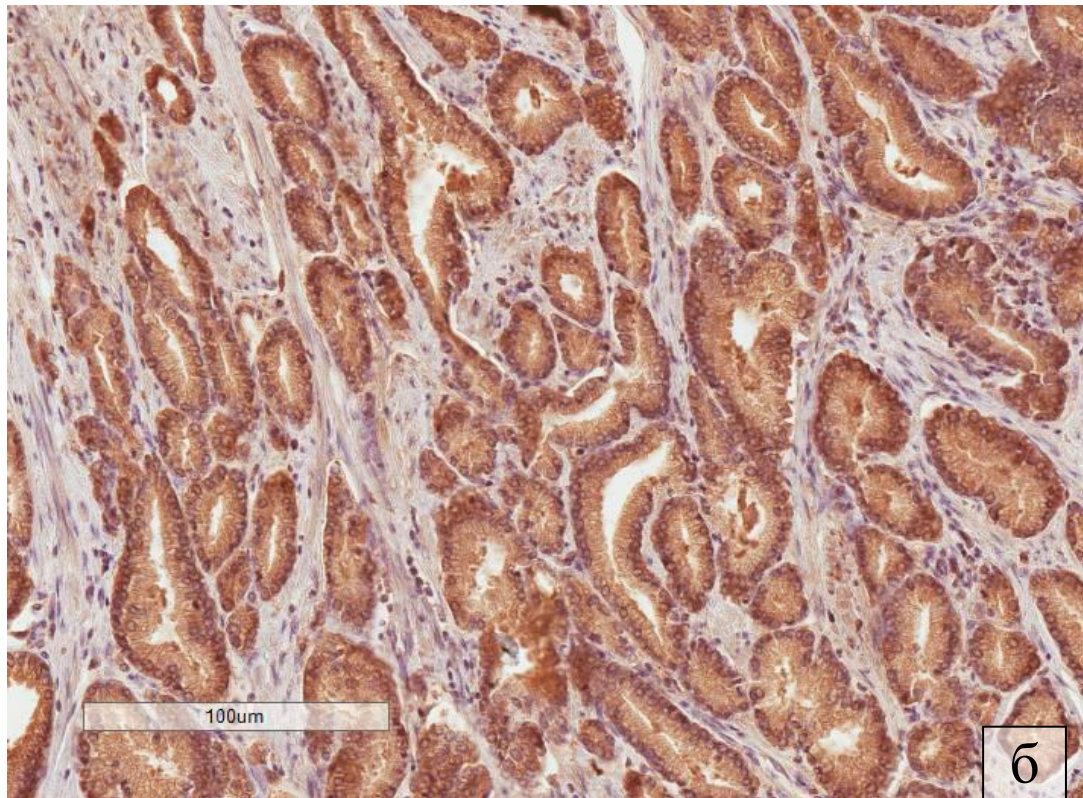
Таким образом, были получены логистические регрессионные модели прогнозирования экспрессии аррестина-1 и реоверина на основании характеристик опухоли почки и других опухолевых маркеров. Статистически значимыми предиктором для экспрессии аррестина-1 и реоверина является морфология опухоли. Для прогнозирования экспрессии аррестина-1 значимым является также степень дифференцировки (злокачественности) опухоли. Из остальных маркеров статистически значимыми предикторами в регрессионных моделях показали себя экспрессия CD10 для аррестина-1 и экспрессия СК7 для реоверина. При этом модель прогнозирования экспрессии реоверина на основании СК7 имела недостаточную статистическую значимость по результатам ROC-анализа из-за отсутствия специфичности.

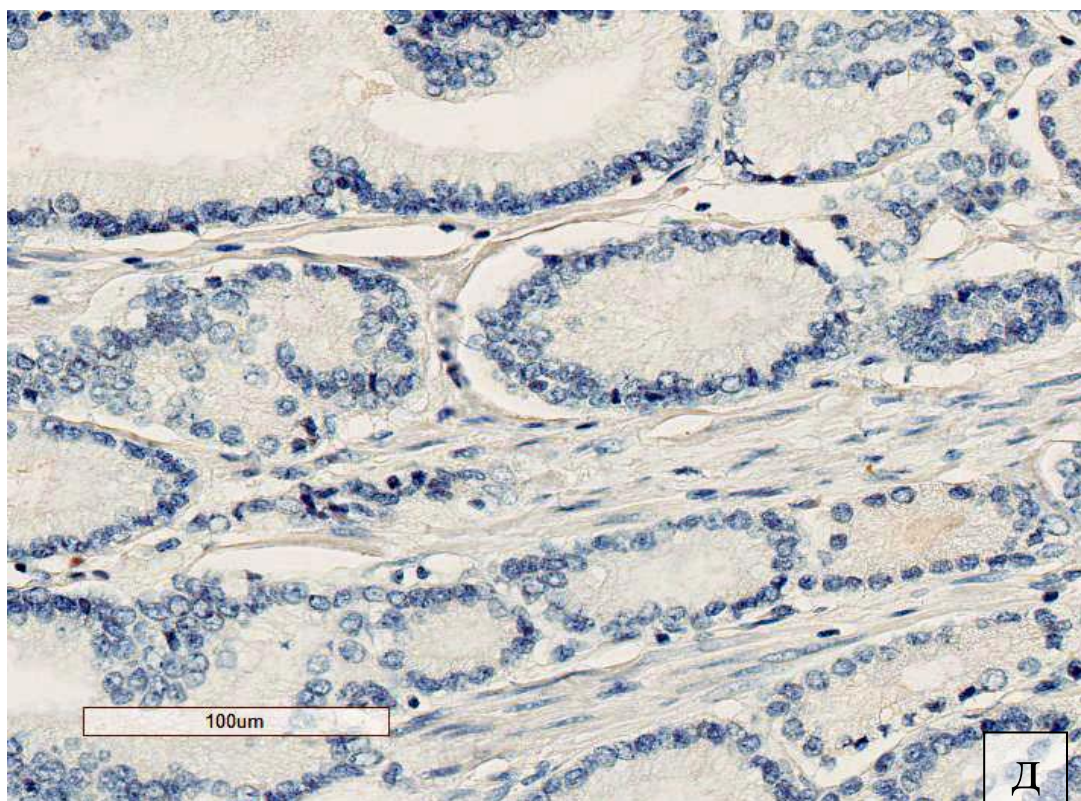
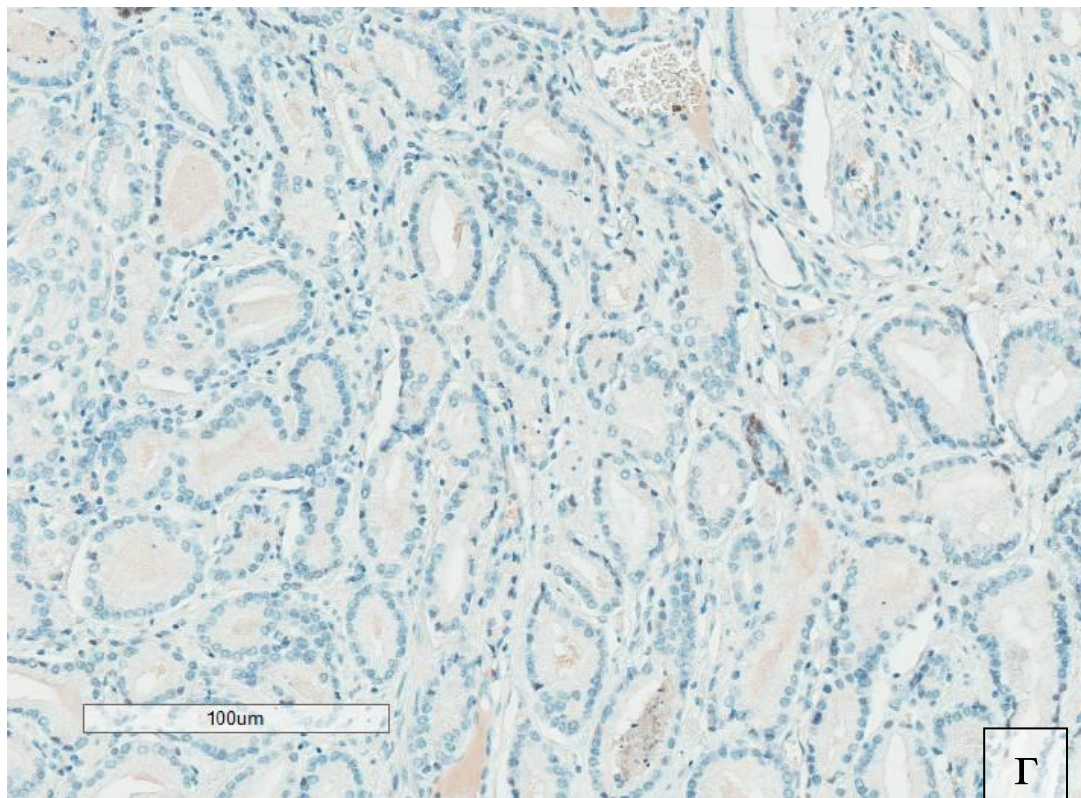
3.2.2. Исследование опухолей предстательной железы

Иммуногистохимическое исследование также проводилось на фрагментах ацинарной аденокарциномы простаты (n=16). Изучали раково-сетчаточные антигены (Arr-1, Rec), p63, PSA, PSAP, AMACR.

Все случаи РПЖ (100%) экспрессировали PSA (рисунок 20а), PSAP (рисунок 20б) обнаруживался только в 15 случаях (93,8%), положительная экспрессия AMACR (рисунок 20в) наблюдалась в 81,3% опухолей (n=13) и во всех случаях ацинарной аденокарциномы отмечалось исчезновение экспрессии p63 (рисунок 20г) в клетках базального слоя эпителия опухолевых желез. Реакция с антителами к раково-сетчаточным антигенам (Arr-1, Rec) во всех образцах была негативной (рисунок 20д, е).







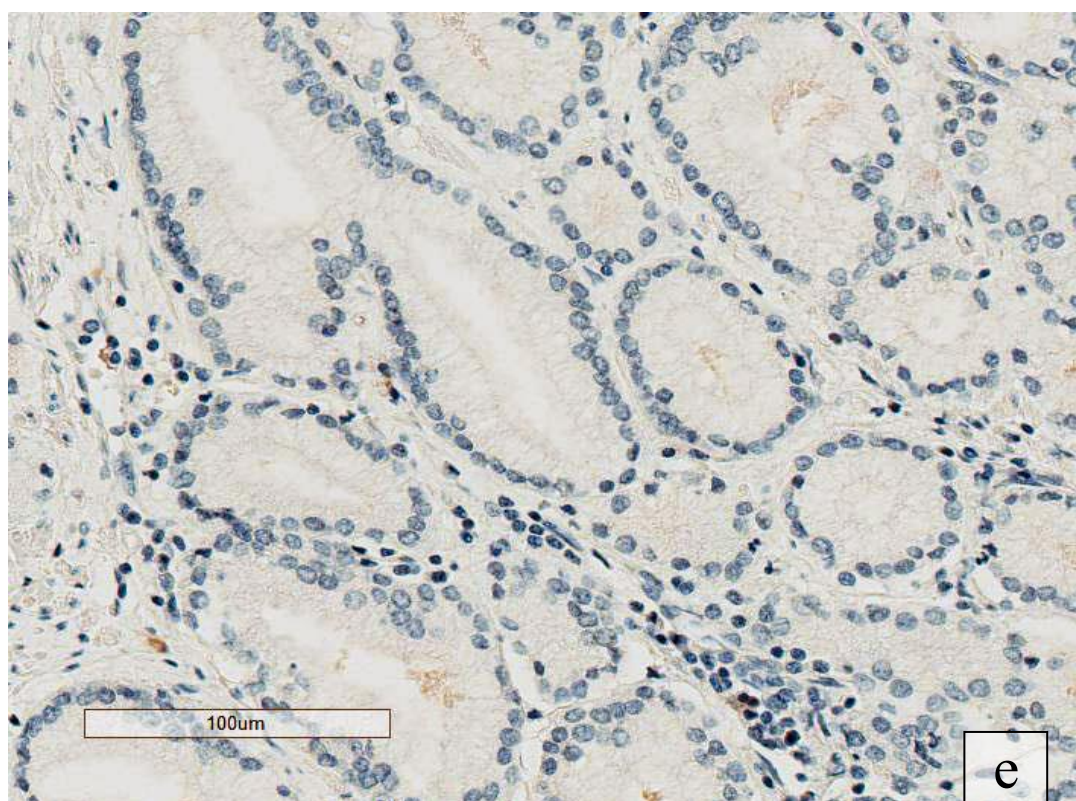


Рисунок 20. РПЖ. Иммунопероксидазный метод: а – экспрессия PSA; б – экспрессия PSAP; в – экспрессия AMACR; г – отсутствие экспрессии p63 в базальных клетках опухолевых желез; д – отсутствие экспрессии Arr-1; е – отсутствие экспрессии Res, x200.

Таким образом, очевидно, что применение раково-сетчаточных антигенов для диагностики РПЖ не оправдано. Данные белки не являются специфичными в отношении ацинарной аденокарциномы.

3.3. Электронномикроскопическая характеристика

Для электронномикроскопического исследования было отобрано по 10 образцов хромофобного ПКР и онкоцитомы. Из них Arr-1 и Res-позитивных хромофобных ПКР было 6, негативных – 4; Arr-1 и Res-позитивных онкоцитом – 9, негативных – 1.

Проводилась оценка ядерного полиморфизма, размеров ядра, размеров клетки, наличия внутриклеточных интрацитоплазматических включений. Так во всех случаях хромофобного ПКР (рисунок 21) отмечался выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, размеры клеток варьировали от 6 до 19 мкм, клеточная мембрана (■) утолщена, размеры ядра (▼) составляли от 4,2 до 17 мкм, при этом

все ядра причудливой формы, с конденсацией хроматина (◆) по периферии, увеличением количества ядрышек (●), с неровной ядерной мембраной (▶), фестончатыми краями. В цитоплазме большое количество митохондрий (■), в части из которых крипты разрушены, основная масса митохондрий определяется на периферии клеток, образуя перинуклеарное просветление (halo) (◻). Также в цитоплазме большое количество микровезикул (◻).

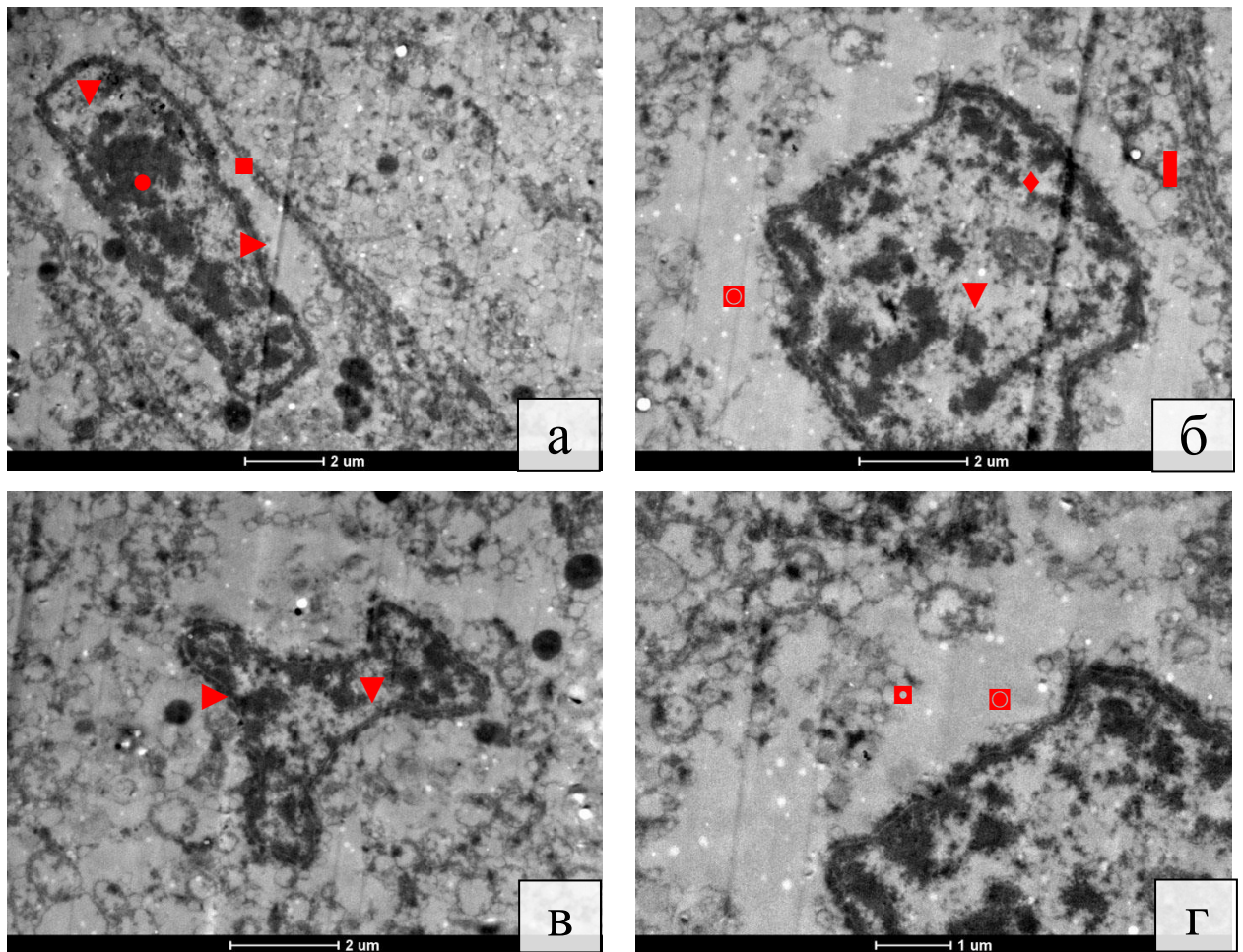


Рисунок 21. Электронная микроскопия хромофобного ПКР: а – контрастирование уранил-ацетатом, х6000; б – контрастирование уранил-ацетатом, х8200; в – контрастирование уранил-ацетатом, х8200; г – контрастирование уранил-ацетатом, х11500 (условные обозначения: ■ – клеточная мембрана; ▼ – ядро; ▶ – ядерная мембрана; ● – ядрышко; ◆ – конденсация хроматина; ■ – митохондрии; ◻ – halo; ◻ – микровезикулы).

При исследовании онкоцитом (рисунок 22), во всех опухолях (100%) определялись клетки с ровной клеточной мембраной (■), размерами от 10 до 16 мкм, ядра (▼) мономорфные округлой формы с ровной четкой ядерной мембраной

(▶), размерами от 6 до 8 мкм. Количество митохондрий (■) в цитоплазме значительно меньше по сравнению с хромофобным ПКР, все они равномерно распределены. В цитоплазме включения гранул липофусцина (⊕) и липидов, микровезикул (■). Также отмечается наличие интрацитоплазматических канальцев (*), которых не было обнаружено в случаях хромофобного рака (рисунок 21). Отдельных ультраструктурных признаков, характерных для Arg-1 и Res – позитивных опухолей обнаружено не было ни в случаях хромофобного ПКР, ни в случаях онкоцитом.

Сравнивая полученные данные, необходимо упомянуть работу японских авторов [112], в которой были описаны интрацитоплазматические канальцы в клетках онкоцитомы, в этой же работе авторы предлагают использовать данный отличительный признак как маркер в дифференциальной диагностике онкоцитом и хромофобного ПКР. Однако в литературе есть описанные случаи [193] наличия в цитоплазме как онкоцитом так и хромофобного ПКР интрацитоплазматических канальцев и микровезикул. В текущем исследовании на первый план выходит выраженный клеточный и ядерный полиморфизм злокачественных опухолей, наличие перинуклеарного halo, отсутствие интрацитоплазматических канальцев, по сравнению с онкоцитомами.

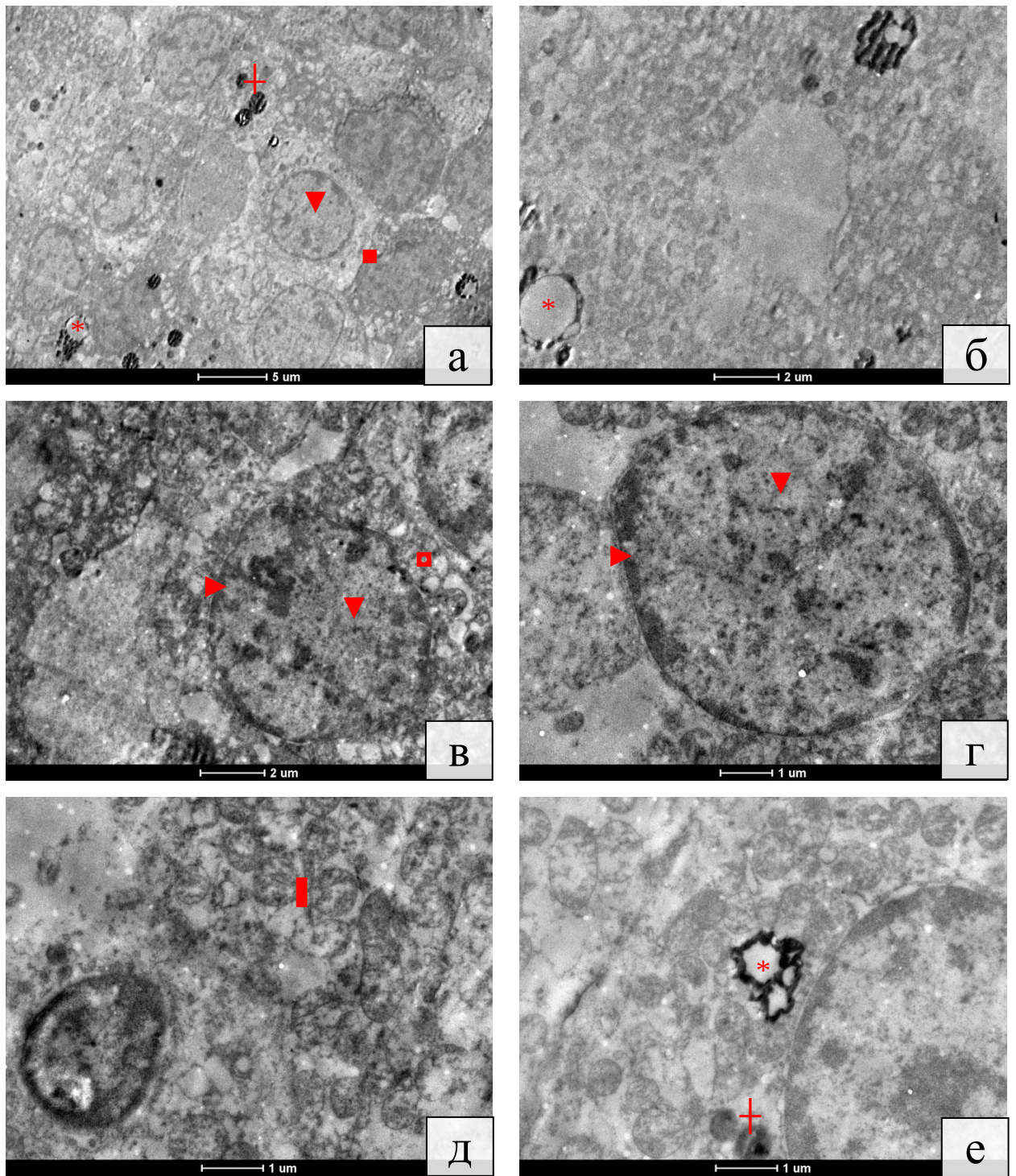


Рисунок 22. Электронная микроскопия онкоцитомы: а – контрастирование уранил-ацетатом, $\times 2550$; б – контрастирование уранил-ацетатом, $\times 6000$; в – контрастирование уранил-ацетатом, $\times 6000$; г – контрастирование уранил-ацетатом, $\times 9900$; д – контрастирование уранил-ацетатом, $\times 11500$; е – контрастирование уранил-ацетатом, $\times 11500$ (условные обозначения: ■ – клеточная мембрана; ▼ – ядро; ► – ядерная мембрана; ▮ – митохондрии; ◻ – микровезикулы, + – гранулы липофусцина, * – интрацитоплазматические каналы).

3.4. Анализ сыворотки крови пациентов

Как уже упоминалось ранее, экспрессия клетками опухолеспецифических антигенов может активировать иммунную систему и вызывать образование аутоантител. Таким образом в данном разделе представленные данные исследования сыворотки крови на наличие аутоантител против аррестина-1 и рековерина (AAA-1 – autoantibodies against arrestin-1, AAR – autoantibodies against recoverin). С этой целью был получен очищенный рекомбинантный аррестин-1 и рековерин и проведен вестерн блот анализ иммунного окрашивания данных белков с использованием сыворотки всех исследованных пациентов (n=137) и несколько образцов сыворотки больных с неопухолевым патологией (отрицательный контроль).

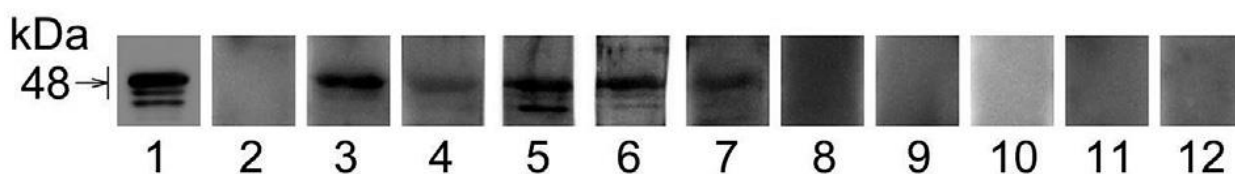


Рисунок 23. Вестерн блот анализ сыворотки крови на наличие AAA-1. Окрашивание рекомбинантным аррестином-1 (2 мг) сывороток, содержащих AAA-1 (3-7), сывороток без этих антител (8-12). Положительный контроль с использованием кроличьих поликлональных AAA-1 (1) и отрицательный контроль с сывороткой больного мочекаменной болезнью (2).

В контрольной группе AAA-1 и AAR найдены не были (рисунок 23, 24). В группе пациентов с РПЖ (n=16, 100%) также не были обнаружены ни AAA-1, ни AAR. В то время как в сыворотке крови пациентов с опухолью почек (n=121, 100%) AAA-1 были обнаружены в 69,4% случаев (n=84) (рисунок 23). Выявленная частота обнаружения антител довольно высокая, что делает возможным использование AAA-1 в качестве биомаркера опухолей почек. При этом распределение частоты обнаружения антител у пациентов с различными гистологическими типами опухолей было следующим (таблица 41): на 1 месте по частоте обнаружения аутоантител в сыворотке крови стояли пациенты с диагнозом онкоцитома (94,1%), на 2 – пациенты с диагнозом хромофобный ПКР (n=14, 87,5%), на 3 – папиллярный ПКР (n=13, 72,2%), в крови пациентов со светлоклеточным ПКР AAA-1

определялись реже, всего в 41 образцах (58,6%) ($p=0,01$, V Крамера 0,306). Стоит отметить, что ААА-1 были обнаружены в крови пациентов не только со злокачественными опухолями, но и у 16 из 17 пациентов с онкоцитомой.

Таблица 41. Частота обнаружения ААА-1 в крови пациентов с опухолью почек.

	Группы наблюдения		p	Cramer's V
	Есть ААА1 (n=84)	Нет ААА1 (n=37)		
Онкоцитома	16 (94,1%)	1 (5,9%)	$p=0,010$	0,306 $p=0,010$
Светлоклеточный ПКР	41 (68,6%)	29 (41,4%)		
Папиллярный ПКР	13 (72,2%)	5 (12,5%)		
Хромофобный ПКР	14(87,5%) ²	2 (12,5%)		

Также следует упомянуть, что частота экспрессии аррестина-1 в опухолях почек и частота обнаружения ААА-1 в сыворотке крови этих же пациентов не всегда совпадала между собой. Данное различие легко объясняется тем фактом, что при оценке экспрессии антигена в ткани опухолей проводился подсчет процента окрашенных клеток и образцы, в которых окрашивалось менее 10%, позитивными не считались. Тогда как при оценке сыворотки крови проводился качественный анализ, просто на наличие аутоантител.

Было обнаружено, что 65 из 121 пациентов были положительными по экспрессии Arr-1, тогда как ААА-1 обнаруживались в сыворотке крови у 84. Таким образом, у 19 из 121 пациента ААА-1 были обнаружены в отсутствие окрашивания Arr-1 в опухоли. Аналогичные результаты были получены при исследовании другого опухолеспецифического антигена – ливина, у пациентов с ПКР. У 13% пациентов с очень низкой экспрессией антигена в клетках опухолей были обнаружены в сыворотке крови соответствующие аутоантитела [103]. Было высказано предположение, что даже малая популяция ливин-экспрессирующих клеток может влиять на иммунную систему. Точно так же можно предположить, что в данном исследовании все пациенты экспрессировали Arr-1, но в 46% случаев

Arg-1-позитивные клетки оставались необнаруженными ИГХ методами. Действительно, чувствительность ИГХ часто недостаточна для обнаружения небольших антиген-экспрессирующих сайтов или даже отдельных антиген-экспрессирующих клеток.

Кроме того, участки опухоли с Arg-1-экспрессирующими клетками, могут оставаться за пределами материала биопсии. В любом случае, даже низкий уровень экспрессии антигена может вызвать сильный гуморальный ответ у некоторых людей, как это наблюдалось у пациентов с ПКР, продуцирующих анти-ливин [103]. То есть, можно предположить, что образование ААА-1 связано с aberrантной экспрессией аррестина-1 опухолями почек.

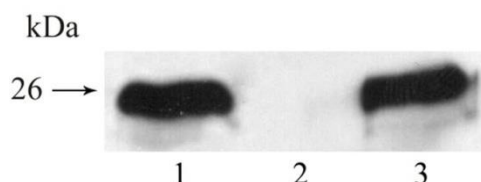


Рисунок 24. Вестерн блот анализ сыворотки крови на наличие ААР. Окрашивание рекомбинантным рековерином (1 мг) сывороток, содержащих ААР (3), положительный контроль с использованием кроличьих ААР (1) и отрицательный контроль с сывороткой больного мочекаменной болезнью (2).

При проведении вестерн блот анализа на наличие ААР (рисунок 24), антитела были обнаружены лишь в сыворотке 2 пациентов (1,7%) с папиллярным ПКР.

В предыдущих работах было показано, что aberrантная экспрессия рековерина в злокачественных опухолях способна вызывать иммунный ответ в виде образования специфических аутоантител [23][140][215]. Это явление имеет многообещающее значения для разработки средств ранней диагностики различных опухолей.

Так частота обнаружения ААР в сыворотке крови пациентов с раком легких составила 15-20% [22], пациентов с меланомой – всего 6% [25]. Данные, полученные в текущем исследовании, коррелируют с работой российских авторов [182], в которой из 10 исследованных сывороток пациентов с опухолью почек не

было определено ни одной с AAR. Таким образом, обнаружение AAR в сыворотке крови пациентов, вряд ли может быть использовано для ранней диагностики опухолей почек.

Различные биомолекулы, такие как опухолеспецифические антигены и нуклеиновые кислоты, были предложены в качестве диагностических биомаркеров опухолей [74]. Биомаркеры опухолей почек, которые уже были изучены, включают следующие: miRNAs (miR-210, miR-378, miR-451, miR-1233) [173][232][244], CAIX [233], Tu M2-PK [228], сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [174], ассоциированный с опухолью ингибитор трипсина (TATI) [128], AMACR [213], виментин [192], HIFPНЗ [180], CK7, CK19, CK20 [192] и другие [161]. Тем не менее, никаких надежных маркеров для раннего выявления ПКР фактически не обнаружено, поскольку все предложенные из них недостаточны с точки зрения чувствительности и/или специфичности. Неоднородность опухолей, а также нестабильность биомаркеров, поступающих в кровоток с учетом действия протеаз и нуклеаз, еще больше ограничивают их диагностическую ценность [154].

Предполагаемый тип биомаркеров, которые можно применять для диагностики ПКР – аутоантитела против опухолевых белков. Антитела имеют ряд преимуществ перед опухолеспецифическими антигенами и нуклеиновыми кислотами, циркулирующими в крови. Они гораздо более устойчивы, появляются в крови раньше и дольше циркулируют [57]. К тому же даже низкого уровня опухолеспецифических антигенов достаточно для развития выраженного гуморального ответа иммунной системы против данного антигена.

С каждым днем появляется все большее количество научных работ, демонстрирующих преимущества использования антител в диагностике злокачественных опухолей. Так, например, аутоантитела против опухолеспецифичных антигенов были найдены при раке яичников [40][73], легкого [238], поджелудочной железы [73], молочной железы [39], пищевода [187], предстательной железы [155], прямой кишки [41]. В нескольких исследованиях сообщается о возможности применения опухолеспецифических аутоантител в качестве биомаркеров ПКР. Наиболее упоминаемыми из них являются анти-

НІFРНЗ аутоантитела и анти-ливин антитела [103][199]. Помимо экспрессии в нормальных тканях НІFРНЗ также гиперэкспрессируется в клетках ПКР и титр аутоантител против НІFРНЗ в крови пациентов с ПКР выше, чем у здоровых людей [199]. Аутоантитела против ливина представляются более специфическими в отношении ПКР, так как в здоровой популяции ливин отсутствует, хотя данный антиген был обнаружен у пациентов с другими видами злокачественных заболеваний [84][103].

Как известно, гуморальный ответ против опухоли развивается тогда, когда последняя производит белки, чужеродные для иммунной системы. Таким образом, обнаружение экспрессии Arr-1 и Rec в опухолях почки побудило нас исследовать, генерируются ли AAA-1 и AAR у пациентов с опухолью почек, и оценить возможность такого явления в диагностике ПКР.

Рассматривая AAA-1 и AAR в качестве биомаркеров опухолей почек, маловероятно, что они могут быть использованы в прогностических целях. Очевидно, что иммунный ответ начнет развиваться вскоре после начала производства опухолеспецифичных белков. Даже если выработка антигена будет прервана из-за удаления опухоли, антитела будут циркулировать в крови еще некоторое время. По этим причинам циркуляция AAA-1 и AAR, по-видимому, вряд ли будет коррелировать с реакцией пациентов на лечение или прогрессированием заболевания из-за их относительно постоянного присутствия. Однако для опухолей почек продукция AAA-1 гораздо более специфична, чем генерация аутоантител против других CRA, в частности AAR, частота продукции которых значительно ниже. Использование AAA-1 и AAR в качестве диагностических маркеров более вероятно, хотя в этом случае также существуют некоторые ограничения. Например, AAA-1 не могут использоваться в дифференциальной диагностике различных подтипов ПКР, так как они были обнаружены у пациентов с каждым подтипом этого рака. По нашему мнению, лучшим применением для AAA-1 может быть ранняя диагностика опухолей почек в целом. Как указано выше, даже низкого уровня экспрессии белка на ранней стадии прогрессирования опухоли достаточно для индукции выраженного гуморального ответа. Таким образом, раннее

обнаружение AAA-1 в крови пациентов может быть предупреждающим знаком для врача, чтобы начать более детальное обследование пациента, особенно в отношении почек. Следует добавить, что экспрессия AAA-1 не специфична для пациентов с ПКР и онкоцитомой.

3.5. Анализ статуса метилирования ДНК

Аррестин-1 (S-antigen) кодируется геном SAG (NCBI gene ID:6295; HGNC gene ID: 10521). Известно, что в промоторе SAG отсутствуют CpG островки, поэтому, скорее всего, участие метилирования в регуляции гена маловероятно. Тем не менее, ранее в литературе встречалось описание дифференциального метилирования диссеминированных CpG-пар в промоторах тканеспецифических экспрессирующих генов (например, в промоторе гена инсулина [111]).

Поэтому, в данной работе был проведен анализ статуса метилирования отдельных CpG пар в промоторном регионе гена SAG. Основное внимание было уделено последовательности ДНК, состоящей из 264 нуклеотидных пар между -1891 и -1627 нуклеотидами, так как изменения статуса метилирования именно в этих участках были определены в предыдущих исследованиях различных тканей [222]. Изучаемые CpG пары данного региона были условно названы как CpG-1, CpG-2, CpG-3, CpG-4, CpG-5 и CpG-6, последовательно от центромеры.

Анализ проводился на 15 образцах ДНК светлоклеточного ПКР. Также для отрицательного контроля, образцы ДНК были получены из лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и 2 аутопсийных почек без признаков злокачественного поражения.

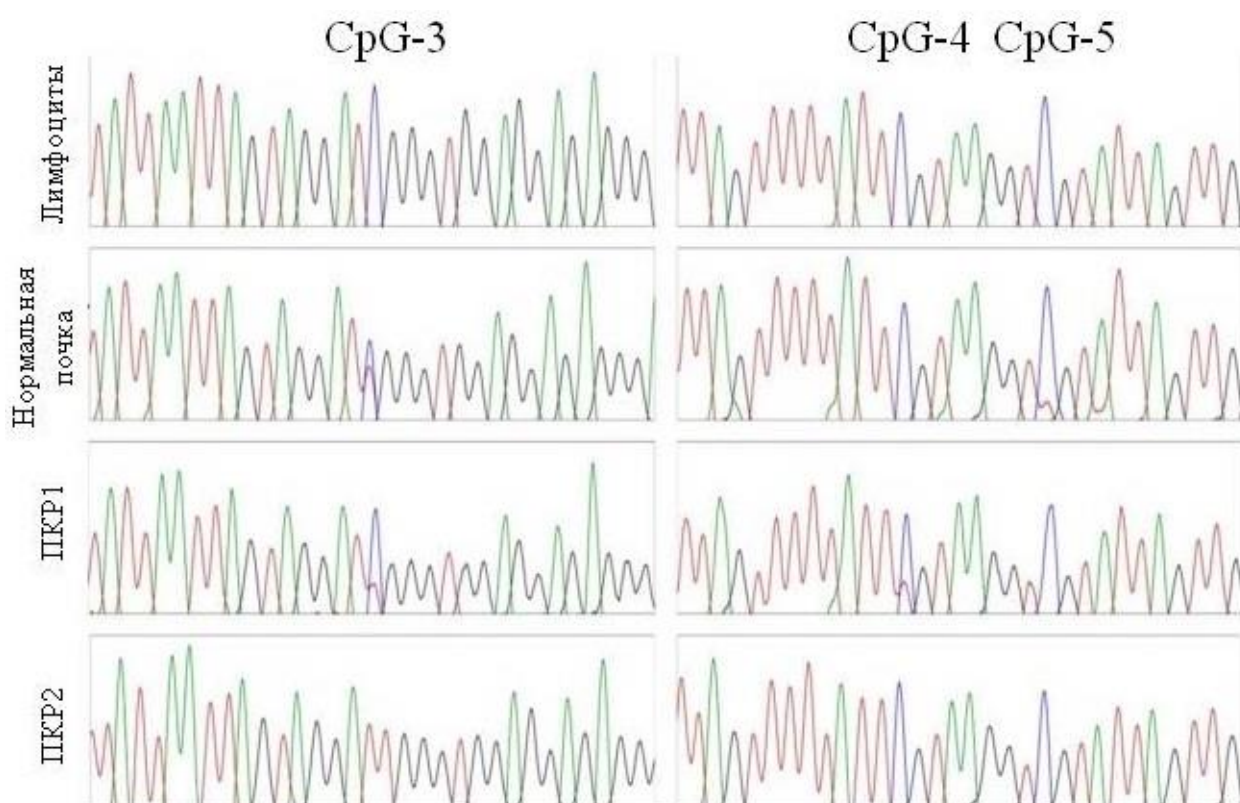


Рисунок 25. Статус метилирования CpG-пар промотора SAG в нормальной почке и светлоклеточном ПКР. Представлены результаты бисульфитного секвенирования, демонстрирующие метилирование CpG-3, CpG-4 и CpG-5 пар в локусах -1891/-1627 SAG в лимфоцитах, нормальной почке и 2х различных образцах ПКР («ПКР1» и «ПКР2»).

В образцах из лимфоцитов в каждой анализируемой CpG паре определялось двуаллельное метилирование (рисунок 25). В ДНК, полученной из здоровой почки, определялось моноаллельное метилирование CpG-3 и CpG-6, и двуаллельное метилирование всех остальных CpG пар (рисунок 25).

Анализ ДНК из светлоклеточного ПКР выявил гетерогенную картину метилирования исследованных локусов. В общих чертах паттерн метилирования был схож с результатами из нормальной почки: в большинстве образцов определялось моноаллельное метилирование только в CpG-3 и CpG-6 парах (таблица 42). В то же время в 3 образцах светлоклеточного ПКР наблюдалось дополнительное моноаллельное метилирование в парах CpG-1, CpG-4 (рисунок 25 «ПКР1») или CpG-5. В 3 других образцах определялось биаллельное

деметилирование CpG-3 пары (рисунок 25 «ПКР2») или CpG-6. При этом ни одно из описанных повреждений не коррелировало с экспрессией аррестина-1.

Существует несколько эпигенетических механизмов, регулирующих экспрессию генов, включая упаковку ДНК, различные взаимодействия РНК и ковалентные модификации ДНК [95]. По некоторым причинам могут возникать отклонения в эпигенетическом механизме опухолевых клеток, что вызывает aberrантную экспрессию неподходящих белков в процессе малигнизации клеток. В этом исследовании мы попытались понять, участвует ли гипометилирование промотора SAG, который является одним из возможных эпигенетических механизмов, в регуляции экспрессии Arr-1 в ПКР. Бисульфитное секвенирование ДНК, полученной из клеток опухолей почек, показало, что статус метилирования SAG существенно не отличается от контрольных образцов, выделенных из лимфоцитов здоровых доноров и нормальной ткани почек. Таким образом, гипометилирование вряд ли является причиной экспрессии Arr-1 в ПКР. Однако, оценка aberrантной экспрессии опухолеспецифичных антигенов, в том числе Arr-1, в ПКР важна для понимания патогенеза заболевания. Необходим дальнейший анализ механизмов эпигенетической регуляции SAG при раке, таких как взаимодействие мРНК с микроРНК.

Таблица 42. Статус метилирования локусов -1891 до -1627 промотора SAG у пациентов со светлоклеточным ПКР.

	Аррестин-1-позитивные			Аррестин-1-негативные		
	C/C ⁹	C/T ¹⁰	T/T ¹¹	C/C	C/T	T/T
CpG1	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0	7 (100%)	0	0
CpG2	8 (100%)	0	0	7 (100%)	0	0
CpG3	0	6 (75%)	1 (12,5%)	1 (14,2%)	6 (85,7%)	1 (14,2%)
CpG4	7 (87,5%)	0	0	7 (100%)	1 (14,2%)	0
CpG5	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0	7 (100%)	0	0
CpG6	2 (25%)	5 (62,5%)	0	3 (42,8%)	4 (57,1%)	1 (14,2%)
Всего	8 (100%)			7 (100%)		

⁹ C/C – Биаллельное метилирование

¹⁰ C/T – Моноаллельное метилирование

¹¹ T/T – Деметилирование

В отношении регуляции экспрессии рековерина, в предыдущих работах было показано, что aberrантное гипометилирование гена, кодирующего рековерин – RCVRN (NCBI gene ID:5957; HGNC gene ID: 9937), включая регионы промотера первого экзона, а также самого первого экзона, вовлечено в механизмы регуляции aberrантной экспрессии в тканях меланомы и рака легких [24]. Таким образом, было решено исследовать статус метилирования RCVRN в тканях опухоли почки. С этой целью, были получены образцы ДНК из опухолей (n=22) и проанализированы последовательности, состоящие из 26 CpG динуклеотидов между -93 и 471 нуклеотидами.

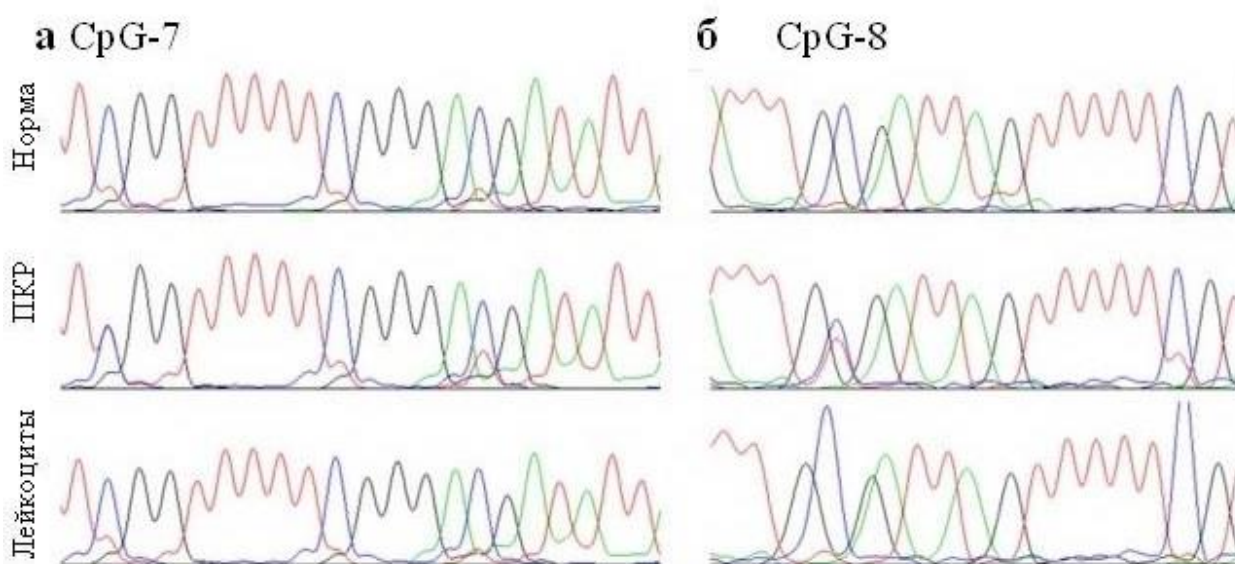


Рисунок 26. Статус метилирования CpG-пар RCVRN в нормальной почке и ПКР. Представлены результаты бисульфитного секвенирования, демонстрирующие метилирование CpG пар в промотерном регионе (а) и в первом экзоне (б) в образцах ПКР с нормальным паттерном метилирования («Норма»), с выраженным деметилированием CpG-7 и CpG-8 («ПКР») и в лейкоцитах.

Большинство CpG пар демонстрировали мозаичное метилирование с преобладанием метилированного состояния, за исключением -80 и 56 CpG. По этой причине был исследован статус метилирования только этих двух CpG пар. Во всех случаях наблюдалось биаллельный паттерн изменения статуса метилирования. У 6

пациентов определялось деметилирование в позиции -80, у 1 пациента метилирование в позиции -80 и деметилирование в позиции 56, в то время как у других 15 образцов признаков деметилирования не было обнаружено ни в одной из позиций (рисунок 26). Таким образом примерно у 32% исследованных пациентов обнаружены деметилированные CpG в позиции -80 или CpG в позиции 56. Кроме того, в пределах 5'-UTR RCVRN был обнаружен единичный общий нуклеотидный полиморфизм rs2286531 (в положении 112), создающий дополнительный CpG-динуклеотид. Последний был найден в виде гетерозиготы в 8 из 22 (36%) образцов и в виде гомозигот в одном образце, и он всегда был метилирован в образцах, полученных из нормальных и опухолевых тканей.

Анализ ДНК полученной из лейкоцитов пациентов (отрицательный контроль) показал нормальный паттерн метилирования изучаемого региона (-80 и 56) во всех случаях (рисунок 26).

После статистической обработки данных можно сделать вывод, что экспрессия рековерина в злокачественных опухолях почки не коррелировала со статусом метилирования ни в одном из исследованных регионов RCVRN ($p > 0,05$) (таблица 43).

Таблица 43. Экспрессия рековерина в опухолях и статус метилирования промотора RCVRN.

	Рековерин-позитивные	Рековерин-негативные
CpG -80	7 (58,3%)	6 (60%)
CpG 56	10 (83,3%)	7 (70%)
CpG -80 и CpG 56	6 (50%)	6 (60%)
Всего	12 (100%)	10 (100%)

Несмотря на наличие большого количества работ, демонстрирующих aberrantную экспрессию рековерина различными типами опухолевых клеток, механизмы, управляющие этим явлением, до сих пор остаются неопределенными. Ранее было обнаружено, что метилирование ДНК участвует в угнетении синтеза рековерина в нормальных тканях и aberrantное гипометилирование гена RCVRN участвует в его aberrantной экспрессии при меланоме и раке легких [24]. В настоящем исследовании было выявлено, что до 83% образцов опухолей почек,

которые обладали деметилированными CpG в области промотора гена RCVRN, являются рековерин-позитивными. Так как контрольные образцы ДНК, полученные из лейкоцитов тех же пациентов, содержат только метилированные CpG, можно предположить участие деметилирования в регуляции aberrантной экспрессии рековерина. Тем не менее, этот механизм не имеет особого значения, так как некоторые образцы опухолей с неизменным статусом метилирования ДНК промотора RCVRN также способны экспрессировать рековерин. Но, несмотря на полученные результаты, нельзя исключить, что aberrантное гипометилирование гена RCVRN участвует в механизме, лежащем в основе aberrантной экспрессии рековерина в опухолях почек, как это было показано ранее для меланомы и рака легких [24].

ГЛАВА 4. Общее заключение и выводы

На современном этапе для диагностики опухолей почки и РПЖ используются множество маркеров, такие как опухолеспецифические антигены и нуклеиновые кислоты. Биомаркеры опухолей почек и РПЖ, которые уже были изучены, включают следующие: miRNAs (miR-210, miR-378, miR-451, miR-1233) [173][232][244], CAIX [233], Tu M2-PK [228], сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [174], ассоциированный с опухолью ингибитор трипсина (TATI) [128], AMACR [213], виментин [192], HIFPH3 [180], CK7, CK19, CK20 [192], PSA [65], PSAP [147], p63 [151] и другие. Тем не менее, никаких надежных маркеров для раннего выявления ПКР и РПЖ фактически не обнаружено, поскольку все предложенные из них недостаточны с точки зрения чувствительности и/или специфичности. Также стоит отметить, что неоднородность опухолей, а также нестабильность биомаркеров, поступающих в кровоток с учетом действия протеаз и нуклеаз, еще больше ограничивают их диагностическую ценность [154].

С целью раннего выявления, а значит, и более успешного лечения новообразований проводится поиск новых, более чувствительных и специфических маркеров.

Перспективным представляется использование с этой целью паранеопластических антигенов. Большинство ПНА — белки организма, встречающиеся в пределах нервной ткани, однако в результате злокачественной трансформации ПНА начинают продуцироваться и в клетках опухоли за пределами иммунотолерантной ткани организма [58].

Отдельная группа антигенов, которые могут аберрантно экспрессироваться в почечной ткани при ее злокачественной трансформации, включает белки, синтезируемые преимущественно в иммунотолерантных тканях (например, нервной или ткани сетчатки глаза). Такие антигены подразделяются на два подтипа: онконевральные антигены и раково-сетчаточные антигены (cancer-retina antigen — CRA) в зависимости от их происхождения.

Большинство CRA представляют собой фоторецепторные белки, участвующие в визуальной трансдукции. Их аберрантная экспрессия была

отмечена в разных видах злокачественных новообразований, таких как рак желудка, рак легких, колоректальный рак и др. [168][60]. Чаще всего CRA обнаруживались в меланоме, которая экспрессирует такие фоторецепторные белки, как родопсин, трансдуцин, цГМФ-фосфодиэстераза 6, цГМФ-зависимые каналы, гуанилилциклаза, родопсинкиназа, рековерин (Rec) и зрительный аррестин (аррестин-1, Arr-1) [22]. Так как CRA происходят из иммуннопривилегированной зоны, они чужды иммунной системе и могут проявлять высокую иммуногенность. Действительно, аберрантная экспрессия CRA в злокачественных опухолях, локализованных за пределами сетчатки, способна вызывать ответ иммунной системы, проявляющийся в выработке специфических антител и Т-клеток. Подобные изменения в функционировании иммунной системы могут приводить к развитию паранеопластических синдромов, отягчающих ход основного заболевания. Ретинальная дегенерация, как паранеопластический синдром, встречается примерно у 6 % больных раком почки. Некоторые виды CRA были признаны опухолеспецифическими антигенами [22].

В предыдущих исследованиях было доказано, что экспрессия Arr-1 в клетках меланомы вызывает выраженную генерацию соответствующих аутоантител, запускающих меланома-ассоциированную ретинопатию (MAR) [170]. Все опубликованные научные исследования, касающиеся экспрессии Arr-1 при злокачественной опухоли, основаны на обнаружении AAA-1 только у пациентов с диагностированной CAR. Насколько известно, нет никакого другого злокачественного заболевания, кроме меланомы, где аберрантная экспрессия Arr1 была обнаружена прямо, но не косвенно, посредством обнаружения AAA1.

Рековерин в качестве раково-сетчаточного антигена был обнаружен в тканях опухолей, у пациентов с раком легких, меланомой, гинекологическими карциномами, раком желудочно-кишечного тракта, раком молочной железы и некоторыми другими типами злокачественных опухолей [21][22][25][135]. По разным данным, частота экспрессии рековерина варьировала от 30 до 80% в зависимости от типа опухоли [22][25][135]. До настоящего времени была опубликована только одна работа об аберрантной экспрессии рековерина в

опухолях почек, с частотой экспрессии 43% [135].

В работах других авторов было показано, что aberrантная экспрессия реоверина в злокачественных опухолях способна вызывать иммунный ответ в виде образования специфических аутоантител [23][140][215]. Это явление имеет многообещающее значения для разработки средств ранней диагностики различных опухолей.

В связи с этим, целью данной исследовательской работы стало оценить возможность применения раково-сетчаточных антигенов в диагностике почечно-клеточного рака и рака предстательной железы.

Задачи исследования:

1. Изучить экспрессию аррестина-1 и реоверна при почечно-клеточном раке и раке предстательной железы.
2. Изучить продукцию аутоантител против аррестина-1 и реоверина.
3. Изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе экспрессии аррестина-1 и реоверина при злокачественных опухолях почек и предстательной железы.
4. Сопоставить результаты молекулярно-биологического исследования почечно-клеточного рака и рака предстательной железы с клинико-лабораторными данными.
5. Провести корреляционный анализ на основании изучения молекулярно-биологических маркеров почечно-клеточного рака и рака предстательной железы и морфологических форм злокачественных новообразований.

Для решения вышеперечисленных задач был проведен анализ послеоперационного материала и сыворотки крови 137 пациентов, из них у 121 пациента был установлен диагноз «опухоль почки» и у 16 – «опухоль простаты». Средний возраст больных с опухолью почки составил $58,78 \pm 11,114$ лет (от 25 до 86 лет), мужчин с опухолью простаты – $64,31 \pm 6,69$ лет (от 51 до 76 лет). Среди пациентов с опухолью почки отмечалось преобладание мужского пола (64 мужчин и 57 женщин, что составило 52,9% и 47,1% соответственно).

Изучение материала проводили с помощью комплекса методов: гистологическое, иммуногистохимическое, электронномикроскопическое, генетическое исследование, а также исследование сыворотки крови на наличие аутоантител.

Из выборки были исключены опухоли с массивными очагами распада, некроза и кровоизлияниями в связи с низкой репрезентативностью при изучении экспрессии новых антигенов.

При световой микроскопии проводилась верификация диагноза опухолей почек и простаты. Степень дифференцировки ПКР (G) оценивалась только в случаях светлоклеточного и папиллярного типа ПКР, в соответствии с рекомендациями ВОЗ и международного общества уропатологов (ISUP) от G1 до G4.

Степень дифференцировки рака простаты (G) оценивалась согласно общепринятой шкале по D. Gleason, пересмотренной в 2015г [66] от G1 до G4, где G1 соответствует сумме баллов по Gleason ≤ 6 , G2 – 7 баллов, G3 – 8 баллов, G4 – ≥ 9 баллам.

TNM стадию заболевания определяли в соответствии с классификацией злокачественных опухолей мочеполовой системы [141].

При светооптическом исследовании опухолей почек (n=121, 100%) были диагностированы следующие гистологические варианты: онкоцитома (n=17, 14%); светлоклеточный ПКР (n=70, 57,9%); папиллярный ПКР (n=18, 14,8%), в котором выделяли 1 тип (n=9, 7,4%), 2 тип (n=4, 3,3%) и смешанный тип (n=5, 4,1%); хромофобный ПКР (n=16, 13,2%) с его вариантами: классический (n=9, 7,4%) и эозинофильный (n=7, 5,8%).

Все опухоли предстательной железы (n=16, 100%) были представлены ацинарной аденокарциномой.

У пациентов со злокачественными новообразованиями почек (n=104, 100%) размеры и распространение первичной опухоли характеризовались следующим образом: у 17 пациентов выявлена стадия pT1a, что составило 16,3%, у 10 пациентов – pT1b (9,6%), у 9 пациентов – pT2a (8,7%), у 17 пациентов – pT2b

(16,3%). В процентном соотношении довольно большое количество приходится на стадию pT3 (n=51, 49%), из которого стадия pT3a диагностирована в 33 случаях, стадия pT3b – в 18 случаях, что составляет 31,7% и 17,3% соответственно. Стадия pT4 среди пациентов с опухолью почек не определялась.

У пациентов со светлоклеточным ПКР (n=70, 100%) при стадии pT1a во всех случаях (n=11, 15,7%) определялась вторая степень злокачественности (G2), при стадии pT1b выявлялись как G2 так и G3 стадии (n=3, 4,2% и n=4, 5,7% соответственно). Светлоклеточные опухоли со стадией pT2a характеризовались высокой степенью дифференцировки (G1), но диагностированы они были лишь у 2 пациентов (2,8%). В 11 случаях светлоклеточного ПКР определялась стадия pT2b, из них в 9 опухолях (12,8%) градация была оценена как G2 и в 2 опухолях (2,8%) – G3. Наибольшее количество светлоклеточного ПКР приходится на стадию pT3 (pT3a и степень злокачественности G2 у 17 человек (24,2%), G3 у 5 человек (7,1%), pT3b в сочетании со степенью злокачественности G2 – 11 человек (15,7%) и G3 – 6 человек (8,5%)).

Частота встречаемости папиллярных ПКР значительно меньше (n=18, 100%), по сравнению со светлоклеточными ПКР, следовательно, соотношение стадий и степени злокачественности несколько иное: стадия pT1a и степень злокачественности G1 выявлена у 1 человека (5,5%), G2 – у 3 (16,6%); стадия pT2a и G1 в 1 случае (5,5%), G2 в 2 случаях (11,1%) и G3 в 1 случае (5,5%); стадия pT2b и G2 диагностированы у 3 пациентов (16,6%); стадия pT3a и G2 – у 4 пациентов (22,2%), G3 – у 3 пациентов (16,6%).

Низкодифференцированные почечноклеточные опухоли, имеющие градацию G4, в исследуемом материале не встречались.

У 11 пациентов с ПКР диагностировано метастатическое поражение (в том числе и множественное) лимфатических узлов (n=2), надпочечников (n=3), головного мозга (n=4), легких (n=2), костей (n=2) и кожи (n=1), при этом у 10 больных был верифицирован диагноз светлоклеточного ПКР, и только у 1-го – хромофобная почечноклеточная карцинома.

Среди 16 мужчин с раком простаты у большинства ($n=8$) диагностирована стадия pT1c (50%), на втором месте по встречаемости – pT2c ($n=6$; 37,5%), и по 1 случаю pT2a и pT3b, что составило по 6,3%. Стадия pT4 у исследованных пациентов не определялась.

При оценке степени градации большинство опухолей представлены умереннодифференцированной аденокарциномой G2 при сумме Глисона 7 ($n=13$; 81,3%), 2 случая – 12,5% высокодифференцированной аденокарциномы G1 (≤ 6 баллов) и 1 случай – 6,3% низкодифференцированной аденокарциномы G3 (8 баллов), при этом недифференцированные аденокарциномы G4 с суммой баллов ≥ 9 не встречались. Четкой корреляции между стадией pT и степенью злокачественности G не было выявлено, что можно объяснить малым количеством пациентов.

У 2 пациентов были диагностированы метастазы в регионарные лимфатические узлы, при этом отдаленные гематогенные метастазы найдены не были.

Иммуногистохимическое исследование было проведено на образцах онкоцитомы ($n=17$), светлоклеточного ПКР ($n=70$), папиллярного ПКР ($n=18$), хромофобного ПКР ($n=16$) и РПЖ ($n=16$). При изучении каждого гистологического типа отдельно, среди папиллярных ПКР 1 типа, 2 типа и смешанных, а также среди классических и эозинофильных вариантов хромофобного ПКР достоверных различий не было выявлено. Поэтому все варианты папиллярного и хромофобного ПКР были объединены в одну группу.

Изучали раково-сетчаточные антигены (Arr-1, Rec), RCC, Vimentin, CD10, PAX8, CK7, EMA, E-cadherin, S100A, AMACR (P504S), PSA, PSAP, p63.

При анализе иммуногистохимической реакции с антителами к RCC, Vimentin, CD10, PAX8, CK7, EMA, E-cadherin, S100A, AMACR (P504S), p63, PSA, PSAP учитывался процент окрашенных клеток (на 100 клеток опухоли). Позитивной экспрессия считалась при окрашивании 10% клеток.

Результаты иммуногистохимического исследования с антителами к Rec и Arr-1 оценивали количественным методом, с помощью программы «QuPath v0.1.2»

[19] при увеличении $\times 200$ в 20 полях зрения. Полученные результаты переводились в бальный эквивалент:

0 – менее 50 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (экспрессия отсутствует);

1 – от 51 до 100 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (слабая экспрессия);

2 – от 101 до 300 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (умеренная экспрессия);

3 – от 301 до 500 окрашенных клеток на 500 клеток опухоли (выраженная экспрессия).

Для оценки наличия aberrантной экспрессии Arr-1 и Rec в опухолевых клетках были проанализированы образцы из первичных опухолей почек и из их метастазов, а также образцы РПЖ. В группу исследованных опухолей были включены как различные гистологические варианты ПКР, РПЖ, так и онкоцитомы, также наряду с первичными опухолями были исследованы образцы метастазов ($n=14$) от 11 пациентов с ПКР.

При изучении экспрессии аррестина-1 установили, что в группах с одинаковым гистологическим типом опухолей почек есть как позитивные, так и негативные опухоли.

Положительная экспрессия Arr-1 наблюдалась в 53,7% всех типов опухолей почки. Относительное количество Arr1-положительных образцов онкоцитомы составило 76,5%, что было выше, чем соответствующее значение для всех других образцов ПКР, которое составляло 50%. Количество Arr1-положительных образцов каждого оцениваемого подтипа ПКР составляло 40% для светлоклеточного ПКР, 66,7% для папиллярного ПКР, 75,0% для хромофобного ПКР.

При оценке корреляционной связи было отмечено снижение количества Arr-1-положительных образцов при диагнозе светлоклеточный ПКР и повышение при диагнозе онкоцитомы ($p=0,005$; V Крамера 0,327).

В случаях светлоклеточного ПКР было отмечено, что в опухолях с умеренной дифференцировкой частота экспрессии Arr-1 снижается, тогда как в

низкодифференцированных светлоклеточных ПКР, наоборот, повышается ($p=0,008$; V Крамера 0,369).

При анализе экспрессии рековерина было обнаружено, что в группах с одинаковым гистологическим типом опухолей почек есть как Рес-позитивные, так и негативные образцы.

Позитивная реакция с антителами к Рес наблюдалась в 69,4% опухолей почек как доброкачественных, так и злокачественных. При этом в онкоцитомах аберрантная экспрессия рековерина наблюдалась чаще, в 94,1% случаев, по сравнению с экспрессией в группе ПКР (65,4%).

Соотношение Рес-положительных образцов каждого оцениваемого подтипа ПКР составляло: 68,6% в группе светлоклеточных ПКР, 72,2% в группе папиллярных ПКР, 43,7% в группе хромофобного ПКР

При количественной оценке степени выраженности реакции чаще всего наблюдалась умеренная экспрессия (43,8%) по сравнению со слабой и выраженной (11,6% и 14% соответственно).

При статистической обработке данных было отмечено, что частота положительной экспрессии рековерина увеличивалась в опухолях, имеющих строение онкоцитомы и снижалась при диагнозе хромофобный ПКР ($p=0,019$; V Крамера 0,287).

Наряду с первичными опухолями были исследованы фрагменты 12 лимфогенных и гематогенных метастазов от 10 пациентов, у которых первичная опухоль имела строение светлоклеточного ПКР и 2 метастаза у 1 пациента с диагнозом хромофобный ПКР. В каждом случае проводилась оценка экспрессии Arg-1 и Рес как в ткани первичных опухолей, так и в ткани метастазов. Отмечался сходный с первичными опухолями иммуногистохимический профиль: если в первичных опухолях наблюдалась положительная экспрессия Рес и/или Arg-1, то в соответствующих им метастазах также наблюдалось положительная реакция. Стоит отметить, что выраженность экспрессии в ткани метастазов превосходила выраженность в первичных опухолях.

Также необходимо упомянуть, что вероятность экспрессии Arg-1 возрастает при наличии гематогенных метастазов почти в 5 раз ($p=0,026$; V Крамера 0,219) с отношением шансов 5,233 (ДИ 95% 1,072-25,543).

Реакция с антителами к раково-сетчаточным антигенам (Arg-1, Rec) во всех образцах РПЖ была негативной.

Положительная экспрессия RCC наблюдалась в 52,9% всех опухолей почек и в 61,5% ПКР. Наиболее часто она наблюдалась в группе папиллярных ПКР (83,3%), при этом достоверных различий в зависимости от типа папиллярного ПКР выявлено не было. На втором месте по частоте экспрессии находится группа светлоклеточных ПКР (70%). В тканях хромофобного ПКР и онкоцитомы RCC не обнаруживался.

Экспрессия виментина отмечалась во всех видах ПКР ($n=104$) с частотой 77,9%, не выявлялась в образцах онкоцитомы. Так сравнительно высокая частота экспрессии виментина определялась в опухолях со строением светлоклеточного ПКР (91,4%), папиллярного ПКР (88,9%). В опухолях хромофобного ПКР экспрессия виментина наблюдалась только в 1 из 16 образцов (6,3%).

Положительная реакция с антителами к CD10 определялась в группах светлоклеточного, папиллярного и хромофобного ПКР с частотой 90%, 88,9% и 6,3% соответственно, в онкоцитомах экспрессии данного маркера не наблюдалось.

Экспрессия PAX8 наблюдалась во всех типах ПКР, отсутствовала в тканях онкоцитомы. Так положительная экспрессия наблюдалась в 78,6 % светлоклеточного ПКР, в 55,6% папиллярного ПКР и в 50% хромофобных ПКР (таблица 21).

В результате иммуногистохимического исследования опухолей почки с антителами к CK7 отмечалось отсутствие экспрессии в клетках онкоцитомы, небольшая частота ($n=4$, 5,7%) в группе светлоклеточных ПКР, значительная экспрессия в опухолях со строением папиллярного ПКР ($n=14$, 77,8%) и хромофобного ПКР ($n=14$, 87,5%).

Частота выявления ЕМА в светлоклеточном ПКР составила 92,9% (n=65), в папиллярном – 88,9% (n=16), в хромофобном – 87,5 % (n=14), в онкоцитомах – 88,2% (n=15).

Положительная экспрессия E-cadherin отмечалась как в ПКР, так и в онкоцитомах со следующей частотой: 88,2% (n=15) в онкоцитомах, 5,7% (n=4) в светлоклеточных ПКР, 33,3% (n=6) – папиллярных ПКР, 87,5% (n=14) – хромофобных ПКР.

Частота обнаружения S100A в различных типах опухолей почек была следующей: в группе онкоцитом – 76,5% (n=13), светлоклеточных ПКР – 77,1% (n=54), папиллярных ПКР – 66,7% (n=12), хромофобных ПКР – 31,3% (n=5).

Высокий уровень экспрессии AMACR встречался в группе папиллярных ПКР с частотой 73,7% (n=14), в то время как в остальных типах опухолей почек данного белка не обнаружено.

Все случаи РПЖ (100%) экспрессировали PSA, PSAP обнаруживался только в 15 случаях (93,8%), положительная экспрессия AMACR наблюдалась в 81,3% опухолей (n=13) и во всех случаях ацинарной аденокарциномы отмечалось исчезновение экспрессии p63 в опухолевой ткани.

Также были получены логистические регрессионные модели прогнозирования экспрессии аррестина-1 и реоверина на основании характеристик опухоли почки и других опухолевых маркеров. Статистически значимыми предиктором для экспрессии аррестина-1 и реоверина является морфология опухоли. Для прогнозирования экспрессии аррестина-1 значимым является также степень дифференцировки (злокачественности) опухоли. Из остальных маркеров статистически значимыми предикторами в регрессионных моделях показали себя экспрессия CD10 для аррестина-1 и экспрессия CK7 для реоверина. При этом модель прогнозирования экспрессии реоверина на основании CK7 имела недостаточную статистическую значимость по результатам ROC-анализа из-за отсутствия специфичности.

В случаях хромофобного ПКР и онкоцитомы было применено электронномикроскопическое исследование, в качестве дополнения к

светооптическому, так как данные подтипы опухолей почки нередко вызывают трудности в диагностике, также была сделана попытка уточнить ультраструктурные особенности данных типов опухолей. Было отобрано по 10 образцов хромофобного ПКР и онкоцитомы. Из них Arr-1 и Рес-позитивных хромофобных ПКР было 6, негативных – 4; Arr-1 и Рес-позитивных онкоцитом – 9, негативных – 1.

Проводилась оценка ядерного полиморфизма, размеров ядра, размеров клетки, наличия внутриклеточных интрацитоплазматических включений. Так во всех случаях хромофобного ПКР отмечался выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, размеры клеток варьировали от 6 до 19 мкм, клеточная мембрана утолщена, размеры ядра составляли от 4,2 до 17 мкм, при этом все ядра причудливой формы, с конденсацией хроматина по периферии, увеличением количества ядрышек, с неровной ядерной мембраной, фестончатыми краями. В цитоплазме большое количество митохондрий, в части из которых крипты разрушены, основная масса митохондрий определяется на периферии клеток, образуя перинуклеарное просветление (halo). Также в цитоплазме большое количество микровезикул.

При исследовании онкоцитом, во всех опухолях (100%) определялись клетки с ровной клеточной мембраной, размерами от 10 до 16 мкм, ядра мономорфные округлой формы с ровной четкой ядерной мембраной, размерами от 6 до 8 мкм. Количество митохондрий в цитоплазме значительно меньше по сравнению с хромофобным ПКР, все они равномерно распределены. В цитоплазме включения гранул липофусцина и липидов, микровезикул. Также отмечается наличие интрацитоплазматических канальцев, которых не было обнаружено в случаях хромофобного рака. Однако, каких-либо ультраструктурных признаков, характерных для Arr-1 и Рес –позитивных опухолей обнаружено не было ни в случаях хромофобного ПКР, ни в случаях онкоцитом.

Предполагаемый тип биомаркеров, которые можно применять для диагностики ПКР – аутоантитела против опухолевых белков. Антитела имеют ряд преимуществ перед опухолеспецифическими антигенами и нуклеиновыми

кислотами, циркулирующими в крови. Они гораздо более устойчивы, появляются в крови раньше и дольше циркулируют [57]. К тому же даже низкого уровня опухолеспецифических антигенов достаточно для развития выраженного гуморального ответа иммунной системы против данного антигена.

Таким образом, обнаружение экспрессии Arr-1 и Rec в опухолях почки явилось основанием для исследования генерации AAA-1 и AAR у пациентов с опухолью почек с последующей оценкой возможности применения данного явления в диагностике ПКР.

С этой целью был получен очищенный рекомбинантный аррестин-1 и рековерин и проведен вестерн блот анализ иммунного окрашивания данных белков с использованием сыворотки всех исследованных пациентов (n=137) и несколько образцов сыворотки больных с неопухоловой патологией (отрицательный контроль).

В контрольной группе AAA-1 и AAR найдены не были. В группе пациентов с РПЖ (n=16, 100%) также не были обнаружены ни AAA-1, ни AAR. В то время как в сыворотке крови пациентов с опухолью почек (n=121, 100%) AAA-1 были обнаружены в 69,4% случаев (n=84). Выявленная частота обнаружения антител довольно высокая, что делает возможным использование AAA-1 в качестве биомаркера опухолей почек. При этом распределение частоты обнаружения антител у пациентов с различными гистологическими типами опухолей было следующим: на 1 месте по частоте обнаружения аутоантител в сыворотке крови стояли пациенты с диагнозом онкоцитомы (94,1%), на 2 – пациенты с диагнозом хромофобный ПКР (n=14, 87,5%), на 3 – папиллярный ПКР (n=13, 72,2%), в крови пациентов со светлоклеточным ПКР AAA-1 определялись реже, всего в 41 образцах (58,6%) (p=0,01, V Крамера 0,306). Стоит отметить, что AAA-1 были обнаружены в крови пациентов не только со злокачественными опухолями, но и у 16 из 17 пациентов с онкоцитомой.

Также следует упомянуть, что частота экспрессии аррестина-1 в опухолях почек и частота обнаружения AAA-1 в сыворотке крови этих же пациентов не всегда совпадала между собой. Данное различие легко объясняется тем фактом, что

при оценке экспрессии антигена в ткани опухолей проводился подсчет процента окрашенных клеток и образцы, в которых окрашивалось менее 10%, позитивными не считались. Тогда как при оценке сыворотки крови проводился качественный анализ, просто на наличие аутоантител.

Было обнаружено, что 65 из 121 пациентов были положительными по экспрессии Arr-1, тогда как AAA-1 обнаруживались в сыворотке крови у 84. Таким образом, у 19 из 121 пациента AAA-1 были обнаружены в отсутствие окрашивания Arr-1 в опухолях.

При проведении вестерн блот анализа на наличие AAR (рисунок 22), антитела были обнаружены лишь в сыворотке 2 пациентов (1,7%) с папиллярным ПКР.

Рассматривая AAA-1 и AAR в качестве биомаркеров опухолей почек, маловероятно, что они могут быть использованы в прогностических целях. Очевидно, что иммунный ответ начнет развиваться вскоре после начала производства опухолеспецифичных белков. Даже если выработка антигена будет прервана из-за удаления опухоли, антитела будут циркулировать в крови еще некоторое время. По этим причинам циркуляция AAA-1 и AAR, по-видимому, вряд ли будет коррелировать с реакцией пациентов на лечение или прогрессированием заболевания из-за их относительно постоянного присутствия. Однако для опухолей почек продукция AAA-1 гораздо более специфична, чем генерация аутоантител против других CRA, в частности AAR, частота продукции которых значительно ниже. Использование AAA-1 и AAR в качестве диагностических маркеров более вероятно, хотя в этом случае также существуют некоторые ограничения. Например, AAA-1 не могут использоваться в дифференциальной диагностике различных подтипов ПКР, так как они были обнаружены у пациентов с каждым подтипом этого рака. По нашему мнению, лучшим применением для AAA-1 может быть ранняя диагностика опухолей почек в целом. Как указано выше, даже низкого уровня экспрессии белка на ранней стадии прогрессирования опухоли достаточно для индукции выраженного гуморального ответа. Таким образом, раннее обнаружение AAA-1 в крови пациентов может быть предупреждающим знаком для

врача, чтобы начать более детальное обследование пациента, особенно в отношении почек. Следует добавить, что экспрессия AAA-1 не специфична для пациентов с ПКР и онкоцитомой.

Аррестин-1 (S-antigen) кодируется геном SAG (NCBI gene ID:6295; HGNC gene ID: 10521). Известно, что в промоторе SAG отсутствуют CpG островки, поэтому, скорее всего, участие метилирования в регуляции гена маловероятно. Тем не менее, ранее в литературе встречалось описание дифференциального метилирования диссеминированных CpG-пар в промоторах тканеспецифических экспрессирующих генов (например, в промоторе гена инсулина [111]).

В данной работе был проведен анализ статуса метилирования отдельных CpG пар в промоторном регионе гена SAG. Основное внимание было уделено последовательности ДНК, состоящей из 264 нуклеотидных пар между -1891 и -1627 нуклеотидами, так как изменения статуса метилирования именно в этих участках были определены в предыдущих исследованиях различных тканей [222]. Изучаемые CpG пары данного региона были условно названы как CpG-1, CpG-2, CpG-3, CpG-4, CpG-5 и CpG-6, последовательно от центромеры.

Анализ проводился на 15 образцах ДНК светлоклеточного ПКР. Также для отрицательного контроля, образцы ДНК были получены из лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и 2 аутопсийных почек без признаков злокачественного поражения.

Анализ ДНК из светлоклеточного ПКР выявил гетерогенную картину метилирования исследованных локусов. В общих чертах паттерн метилирования был схож с результатами из нормальной почки: в большинстве образцов определялось моноаллельное метилирование только в CpG-3 и CpG-6 парах. В то же время в 3 образцах светлоклеточного ПКР наблюдалось дополнительное моноаллельное метилирование в парах CpG-1, CpG-4 или CpG-5. В 3 других образцах определялось биаллельное деметилирование CpG-3 пары или CpG-6. При этом ни одно из описанных повреждений не коррелировало с экспрессией аррестина-1.

В отношении регуляции экспрессии рековерина, в предыдущих работах было показано, что аберрантное гипометилирование гена, кодирующего рековерин – RCVRN (NCBI gene ID:5957; HGNC gene ID: 9937), включая регионы промотора первого экзона, а также самого первого экзона, вовлечено в механизмы регуляции аберрантной экспрессии в тканях меланомы и рака легких [24].

Несмотря на наличие большого количества работ, демонстрирующих аберрантную экспрессию рековерина различными типами опухолевых клеток, механизмы, управляющие этим явлением, до сих пор остаются неопределенными. Ранее было обнаружено, что метилирование ДНК участвует в угнетении синтеза рековерина в нормальных тканях и аберрантное гипометилирование гена RCVRN участвует в его аберрантной экспрессии при меланоме и раке легких [24].

Таким образом, было решено исследовать статус метилирования RCVRN в тканях опухоли почки. С этой целью, были получены образцы ДНК из опухолей (n=22) и проанализированы последовательности, состоящие из 26 CpG динуклеотидов между -93 и 471 нуклеотидами.

Примерно у 32% исследованных пациентов обнаружены деметилированные CpG в позиции -80 или CpG в позиции 56. Кроме того, в пределах 5'-UTR RCVRN был обнаружен единичный общий нуклеотидный полиморфизм rs2286531 (в положении 112), создающий дополнительный CpG-динуклеотид. Последний был найден в виде гетерозиготы в 8 из 22 (36%) образцов и в виде гомозигот в одном образце, и он всегда был метилирован в образцах, полученных из нормальных и опухолевых тканей.

Анализ ДНК, полученной из лейкоцитов пациентов (отрицательный контроль) показал нормальный паттерн метилирования изучаемого региона (-80 и 56) во всех случаях.

После статистической обработки данных можно сделать вывод, что экспрессия рековерина в злокачественных опухолях почки не коррелировала со статусом метилирования ни в одном из исследованных регионов RCVRN ($p>0,05$).

Таким образом, после проведенной работы становится очевидным, что в случаях новообразований почки происходит продукция CRA с последующим

вовлечением иммунной системы в виде выработки аутоантител. Однако, при попытке определить молекулярно-генетические, а также ультраструктурные основы aberrантной экспрессии Arr-1 и Rec ни один из примененных методов не дал четких результатов. Что является поводом для дальнейшего изучения данного раздела, привлечения новых методов исследования.

Выводы

1. Паранеопластические антигены часто экспрессируются у пациентов с злокачественными и доброкачественными опухолями почки (до 69,4%). Наиболее часто положительная ИГХ реакция с антителами к Arr-1 и Rec наблюдается у пациентов с онкоцитомой. При этом ни Arr-1, ни Rec не могут быть использованы в диагностике РПЖ, так как экспрессии данных белков в тканях не наблюдалось.
2. Аберрантная экспрессия Arr-1 и Rec в ткани опухолей почки способна вызывать иммунный ответ с последующей генерацией аутоантител. Для опухолей почек продукция AAA-1 (69,4%) гораздо более специфична, чем генерация аутоантител против Rec (1,7%). AAA-1 могут быть использованы в качестве диагностического маркера опухолей почки.
3. Статистически значимыми предиктором ($p < 0,05$) для экспрессии арестина-1 и рековерина является гистологический тип опухоли. Для прогнозирования экспрессии аррестина-1 значимым является также степень дифференцировки опухоли и наличие гематогенных метастазов. Из остальных маркеров статистически значимыми предикторами показали себя экспрессия CD10 и виментина для аррестина-1.
4. Механизм аберрантной экспрессии Arr-1 и Rec в опухолях почки не связан с изменением статуса метилирования гена SAG и RCVRN.
5. Не обнаружено значимых различий в частоте экспрессии Arr-1 и Rec при доброкачественных и злокачественных опухолях почек. Arr-1 и Rec не могут применяться для дифференциальной диагностики, но их положительная экспрессия может служить для будущей таргетной терапии ПКР.

Практические рекомендации

1. Всем пациентам с диагнозом опухоль почки необходимо проведение комплексного обследования, включающее в себя генетическое исследование, исследование сыворотки крови и гистологическое исследование.
2. В сложных случаях для дифференциальной диагностики различных видов опухолей почки необходимо применение методов ИГХ и электронной микроскопии.
3. Рекомендовано исследование сыворотки крови пациентов на наличие аутоантител против аррестина-1 и рековерина, для диагностики новообразований почки.
4. Аррестин-1 и рековерин могут быть использованы в качестве маркеров опухолей почки при ИГХ исследовании.

Список сокращений

A – аденин;

AAA1 – autoantibodies against arrestin-1 – аутоантитела против аррестина-1;

AAR – autoantibodies against recoverin – аутоантитела против рековерина;

AMACR – альфа-метил-КоА-рацемаза;

Arr-1 – arrestin -1 – аррестин-1;

AUC – area under ROC curve – площадь под ROC-кривой;

BHD – ген Birt-Hogg-Dube;

C – цитозин;

CAR – cancer-associated retinopathy – рак-ассоциированная ретинопатия;

СК – цитокератин;

CRA – cancer-retina antigen – раково-сетчаточный антиген;

DAB – 3,3'-диаминобензидин;

FHIT – ген непрочной гистидиновой триады;

G – гуанин;

ISUP – International Society of Urological Pathology – международное общество уропатологов;

MAR – melanoma-associated retinopathy – меланома-ассоциированная ретинопатия;

МСК – мультицитокератин;

PBS – фосфатно-солевой буфер;

PSA – prostatic specific antigen – простатический специфический антиген;

PSAP – prostatic specific acid phosphatase – простатическая специфическая кислая фосфатаза;

RCVRN – ген кодирующий рековерин;

Rec – recoverin – рековерин;

SAG – ген кодирующий аррестин-1;

Т – тимин;

VHL – ген von Hippel-Lindau;

Vim – виментин;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ДИ – доверительный интервал;

ОШ – отношение шансов;

ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия;

ПКР – почечно-клеточный рак;

ПНА – паранеопластический антиген;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РПЖ – рак предстательной железы.

Список литературы

1. Adamus G., Ortega H., Witkowska D., Polans A. Recoverin: a Potent Uveitogen for the Induction of Photoreceptor Degeneration in Lewis Rats. *Exp. Eye Res.* 1994.
2. Adley B.P., Gupta A., Lin F., Luan C., Teh B.T., Yang X.J. Expression of kidney-specific cadherin in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol.* 2006/06/07. 126 (1) : 79–85. 2006.
3. Adley B.P., Papavero V., Sugimura J., Teh B.T., Yang X.J. Diagnostic value of cytokeratin 7 and parvalbumin in differentiating chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006/08/25. 28 (4) : 228–236. 2006.
4. Albadine R., Latour M., Toubaji A., Haffner M., Isaacs W.B., E A.P., Meeker A.K., Demarzo A.M., Epstein J.I., Netto G.J. TMPRSS2-ERG gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2009/09/08. 22 (11) : 1415–1422. 2009.
5. Allory Y., Bazille C., Vieillefond A., Molinie V., Cochand-Priollet B., Cussenot O., Callard P., Sibony M. Profiling and classification tree applied to renal epithelial tumours. *Histopathology.* 2007/11/27. 52 (2) : 158–166. 2008.
6. Aly H.A.A. Cancer therapy and vaccination. *J. Immunol. Methods.* 2012.
7. Amare Kadam P.S., Varghese C., Bharde S.H., Narasimhamoorthy N.K., Desai S., Advani S.H., Havaladar R., Kulkarni J.N. Proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor (EGFr) status in renal cell carcinoma patients with polysomy of chromosome 7. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001/05/23. 125 (2) : 139–146. 2001.
8. Amin M.B., MacLennan G.T., Gupta R., Grignon D., Paraf F., Vieillefond A., Paner G.P., Stovsky M., Young A.N., Srigley J.R., Cheville J.C. Tubulocystic carcinoma of the kidney: clinicopathologic analysis of 31 cases of a distinctive

- rare subtype of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2008/11/18. 33 (3) : 384–392. 2009.
9. Amin M.B., Paner G.P., Alvarado-Cabrero I., Young A.N., Stricker H.J., Lyles R.H., Moch H. Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases. *Am J Surg Pathol.* 2008/09/25. 32 (12) : 1822–1834. 2008.
 10. Are C., Rajaram S., Are M., Raj H., Anderson B.O., Chaluvarya Swamy R., Vijayakumar M., Song T., Pandey M., Edney J.A., Cazap E.L. A review of global cancer burden: trends, challenges, strategies, and a role for surgeons. *J Surg Oncol.* 2012/08/29. 107 (2) : 221–226. 2013.
 11. Argani P., Olgac S., Tickoo S.K., Goldfischer M., Moch H., Chan D.Y., Eble J.N., Bonsib S.M., Jimeno M., Lloreta J., Billis A., Hicks J., De Marzo A.M., Reuter V.E., Ladanyi M. Xp11 translocation renal cell carcinoma in adults: expanded clinical, pathologic, and genetic spectrum. *Am J Surg Pathol.* 2007/08/02. 31 (8) : 1149–1160. 2007.
 12. Avery A.K., Beckstead J., Renshaw A.A., Corless C.L. Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2000/02/19. 24 (2) : 203–210. 2000.
 13. Axel E.M., Matveev V.B. Statistics of malignant tumors of urinary and male urogenital organs in Russia and the countries of the former USSR. *Onkourologiya.* 2019.
 14. Azoulay S., Vieillefond A., Paraf F., Pasquier D., Cussenot O., Callard P., Sibony M. Tubulocystic carcinoma of the kidney: a new entity among renal tumors. *Virchows Arch.* 2007/09/06. 451 (5) : 905–909. 2007.
 15. De Backer O., Arden K.C., Boretti M., Vantomme V., De Smet C., Czekay S., Viars C.S., De Plaen E., Brasseur F., Chomez P., Van den Eynde B., Boon T., van der Bruggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various

- human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* 1999/07/09. 59 (13) : 3157–3165. 1999.
16. Bahrami S., Malone J.C., Lear S., Martin A.W. CD10 expression in cutaneous adnexal neoplasms and a potential role for differentiating cutaneous metastatic renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2006/09/05. 130 (9) : 1315–1319. 2006.
 17. Bakshi N., Kunju L.P., Giordano T., Shah R.B. Expression of renal cell carcinoma antigen (RCC) in renal epithelial and nonrenal tumors: diagnostic Implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007/08/28. 15 (3) : 310–315. 2007.
 18. Balint I., Szponar A., Jauch A., Kovacs G. Trisomy 7 and 17 mark papillary renal cell tumours irrespectively of variation of the phenotype. *J Clin Pathol.* 2009/06/23. 62 (10) : 892–895. 2009.
 19. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernandez J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G., James J.A., Salto-Tellez M., Hamilton P.W. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017/12/06. 7 (1) : 16878. 2017.
 20. Baurain J.F., Colau D., van Baren N., Landry C., Martelange V., Vikkula M., Boon T., Coulie P.G. High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol.* 2000/05/23. 164 (11) : 6057–6066. 2000.
 21. Bazhin A. V, Dalke C., Willner N., Abschutz O., Wildberger H.G., Philippov P.P., Dummer R., Graw J., de Angelis M.H., Schadendorf D., Umansky V., Eichmuller S.B. Cancer-retina antigens as potential paraneoplastic antigens in melanoma-associated retinopathy. *Int J Cancer.* 2008/09/25. 124 (1) : 140–149. 2009.
 22. Bazhin A. V, Savchenko M.S., Shifrina O.N., Demoura S.A., Chikina S.Y., Jaques G., Kogan E.A., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and

- recoverin in tumors. *Lung Cancer*. 2004/04/16. 44 (2) : 193–198. 2004.
23. Bazhin A. V, Schadendorf D., Philippov P.P., Eichmuller S.B. Recoverin as a cancer-retina antigen. *Cancer Immunol Immunother*. 2006/01/31. 56 (1) : 110–116. 2007.
 24. Bazhin A. V, De Smet C., Golovastova M.O., Schmidt J., Philippov P.P. Aberrant demethylation of the recoverin gene is involved in the aberrant expression of recoverin in cancer cells. *Exp Dermatol*. 2010/09/04. 19 (11) : 1023–1025. 2010.
 25. Bazhin A. V., Schadendorf D., Willner N., De Smet C., Heinzelmann A., Tikhemirova N.K., Umansky V., Philippov P.P., Eichmüller S.B. Photoreceptor proteins as cancer-retina antigens. *Int. J. Cancer*. 2007.
 26. Bazille C., Allory Y., Molinie V., Vieillefond A., Cochand-Priollet B., Cussenot O., Callard P., Sibony M. [Immunohistochemical characterisation of the main histologic subtypes of epithelial renal tumours on tissue-microarrays. Study of 310 cases]. *Ann Pathol*. 2005/03/02. 24 (5) : 395–406. 2004.
 27. Beck S.D., Patel M.I., Snyder M.E., Kattan M.W., Motzer R.J., Reuter V.E., Russo P. Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2003/12/31. 11 (1) : 71–77. 2004.
 28. Boel P., Wildmann C., Sensi M.L., Brasseur R., Renauld J.C., Coulie P., Boon T., van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity*. 1995/02/01. 2 (2) : 167–175. 1995.
 29. Boon T., Coulie P.G., Van den Eynde B.J., van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*. 2006/03/23. 24 : 175–208. 2006.
 30. Bouchard M., Souabni A., Mandler M., Neubuser A., Busslinger M. Nephric

- lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev.* 2002/11/19. 16 (22) : 2958–2970. 2002.
31. Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Wolfel C., De Plaen E., Lethe B., Coulie P., Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1993/08/01. 178 (2) : 489–495. 1993.
 32. Brown J.A., Takahashi S., Alcaraz A., Borell T.J., Anderl K.L., Qian J., Persons D.L., Bostwick D.G., Lieber M.M., Jenkins R.B. Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1. *J Urol.* 1996/07/01. 156 (1) : 31–35. 1996.
 33. Brunelli M., Delahunt B., Gobbo S., Tardanico R., Eccher A., Bersani S., Cossu-Rocca P., Parolini C., Balzarini P., Menestrina F., Cheng L., Eble J.N., Martignoni G. Diagnostic usefulness of fluorescent cytogenetics in differentiating chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma: a validation study combining metaphase and interphase analyses. *Am J Clin Pathol.* 2009/12/22. 133 (1) : 116–126. 2010.
 34. Brunelli M., Eble J.N., Zhang S., Martignoni G., Delahunt B., Cheng L. Eosinophilic and classic chromophobe renal cell carcinomas have similar frequent losses of multiple chromosomes from among chromosomes 1, 2, 6, 10, and 17, and this pattern of genetic abnormality is not present in renal oncocytoma. *Mod Pathol.* 2004/10/07. 18 (2) : 161–169. 2005.
 35. Butler D., Collins C., Mabruk M., Barry Walsh C., Leader M.B., Kay E.W. Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to high-risk HPV infection but is independent of histopathological features. *J Pathol.* 2000/12/13. 192 (4) : 502–510. 2000.
 36. Butnor K.J., Nicholson A.G., Allred D.C., Zander D.S., Henderson D.W., Barrios R., Haque A.K., Allen T.C., Killen D.E., Cagle P.T. Expression of renal cell

- carcinoma-associated markers erythropoietin, CD10, and renal cell carcinoma marker in diffuse malignant mesothelioma and metastatic renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2006/06/03. 130 (6) : 823–827. 2006.
37. Camparo P., Vasiliu V., Molinie V., Couturier J., Dykema K.J., Petillo D., Furge K.A., Comperat E.M., Lae M., Bouvier R., Boccon-Gibod L., Denoux Y., Ferlicot S., Forest E., Fromont G., Hintzy M.C., Laghouati M., Sibony M., Tucker M.L., Weber N., Teh B.T., Vieillefond A. Renal translocation carcinomas: clinicopathologic, immunohistochemical, and gene expression profiling analysis of 31 cases with a review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2008/03/18. 32 (5) : 656–670. 2008.
 38. Capitanio U., Montorsi F. Renal cancer. *Lancet.* 2016.
 39. Chapman C., Murray A., Chakrabarti J., Thorpe A., Woolston C., Sahin U., Barnes A., Robertson J. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Ann Oncol.* 2007/03/10. 18 (5) : 868–873. 2007.
 40. Chatterjee M., Mohapatra S., Ionan A., Bawa G., Ali-Fehmi R., Wang X., Nowak J., Ye B., Nahhas F.A., Lu K., Witkin S.S., Fishman D., Munkarah A., Morris R., Levin N.K., Shirley N.N., Tromp G., Abrams J., Draghici S., Tainsky M.A. Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer Res.* 2006/01/21. 66 (2) : 1181–1190. 2006.
 41. Chen H., Werner S., Tao S., Zornig I., Brenner H. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014/01/28. 346 (2) : 178–187. 2014.
 42. Chen Y.T., Scanlan M.J., Sahin U., Tureci O., Gure A.O., Tsang S., Williamson B., Stockert E., Pfreundschuh M., Old L.J. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997/03/04. 94 (5) : 1914–1918. 1997.
 43. Choi Y.D., Kim K.S., Ryu S., Park Y., Cho N.H., Rha S.H., Jang J.J., Ro J.Y.,

- Juhng S.W., Choi C. Claudin-7 is highly expressed in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *J Korean Med Sci.* 2007/04/24. 22 (2) : 305–310. 2007.
44. Chomez P., De Backer O., Bertrand M., De Plaen E., Boon T., Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 2001/07/17. 61 (14) : 5544–5551. 2001.
 45. Chu P., Arber D.A. Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol.* 2000/03/08. 113 (3) : 374–382. 2000.
 46. Clark J., Attard G., Jhavar S., Flohr P., Reid A., De-Bono J., Eeles R., Scardino P., Cuzick J., Fisher G., Parker M.D., Foster C.S., Berney D., Kovacs G., Cooper C.S. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene.* 2007/10/09. 27 (14) : 1993–2003. 2008.
 47. Clark J., Merson S., Jhavar S., Flohr P., Edwards S., Foster C.S., Eeles R., Martin F.L., Phillips D.H., Crundwell M., Christmas T., Thompson A., Fisher C., Kovacs G., Cooper C.S. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene.* 2006/10/18. 26 (18) : 2667–2673. 2007.
 48. Contractor H., Zariwala M., Bugert P., Zeisler J., Kovacs G. Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour. *J Pathol.* 1997/02/01. 181 (2) : 136–139. 1997.
 49. Correale P., Walmsley K., Nieroda C., Zaremba S., Zhu M., Schlom J., Tsang K.Y. In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst.* 1997/02/19. 89 (4) : 293–300. 1997.
 50. Coulie P.G., Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Schneider J., Traversari C., Mattei S., De Plaen E., Lurquin C., Szikora J.P., Renauld J.C., Boon T. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T

- lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1994/07/01. 180 (1) : 35–42. 1994.
51. Coulie P.G., Van den Eynde B.J., van der Bruggen P., Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014/01/25. 14 (2) : 135–146. 2014.
 52. Coulie P.G., Lehmann F., Lethe B., Herman J., Lurquin C., Andrawiss M., Boon T. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995/08/15. 92 (17) : 7976–7980. 1995.
 53. Davis C.F., Ricketts C.J., Wang M., Yang L., Cherniack A.D., Shen H., Buhay C., Kang H., Kim S.C., Fahey C.C., Hacker K.E., Bhanot G., Gordenin D.A., Chu A., Gunaratne P.H., Biehl M., Seth S., Kaiparettu B.A., Bristow C.A., Donehower L.A., Wallen E.M., Smith A.B., Tickoo S.K., Tamboli P., Reuter V., Schmidt L.S., Hsieh J.J., Choueiri T.K., Hakimi A.A., Chin L., Meyerson M., Kucherlapati R., Park W.Y., Robertson A.G., Laird P.W., Henske E.P., Kwiatkowski D.J., Park P.J., Morgan M., Shuch B., Muzny D., Wheeler D.A., Linehan W.M., Gibbs R.A., Rathmell W.K., Creighton C.J. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014/08/27. 26 (3) : 319–330. 2014.
 54. Day E. Progress against cancer. Preventive aspects. *Rocky Mt Med J*. 1965/11/01. 62 (11) : 43–50. 1965.
 55. Delahunt B., Eble J.N. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol*. 1997/06/01. 10 (6) : 537–544. 1997.
 56. Deng F.M., Melamed J. Histologic variants of renal cell carcinoma: does tumor type influence outcome? *Urol Clin North Am*. 2012/04/11. 39 (2) : 119–132, v. 2012.
 57. Desmetz C., Mange A., Maudelonde T., Solassol J. Autoantibody signatures:

- progress and perspectives for early cancer detection. *J Cell Mol Med*. 2011/06/10. 15 (10) : 2013–2024. 2011.
58. Diala E.S., Cheah M.S., Rowitch D., Hoffman R.M. Extent of DNA methylation in human tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983/10/01. 71 (4) : 755–764. 1983.
 59. Dizhoor A., Ray S., Kumar S., Niemi G., Spencer M., Brolley D., Walsh K., Philipov P., Hurley J., Stryer L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* (80-.). 2006.
 60. Dizhoor A.M., Chen C.K., Olshevskaya E., Sinelnikova V. V, Phillipov P., Hurley J.B. Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca^{2+} -dependent membrane interaction. *Science* (80-.). 1993/02/05. 259 (5096) : 829–832. 1993.
 61. Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, Walsh KA, Philipov PP, Hurley JB S.L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retina... [Science. 1991] - PubMed result. *Science*. 1991.
 62. Dong J.T. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2002/06/28. 20 (3–4) : 173–193. 2001.
 63. Donninger H., Clark J.A., Monaghan M.K., Schmidt M.L., Vos M., Clark G.J. Cell cycle restriction is more important than apoptosis induction for RASSF1A protein tumor suppression. *J Biol Chem*. 2014/09/17. 289 (45) : 31287–31295. 2014.
 64. Druck T., Kastury K., Hadaczek P., Podolski J., Toloczko A., Sikorski A., Ohta M., LaForgia S., Lasota J., McCue P., et al. Loss of heterozygosity at the familial RCC t(3;8) locus in most clear cell renal carcinomas. *Cancer Res*. 1995/11/15. 55 (22) : 5348–5353. 1995.
 65. Epstein J.I. PSA and PAP as immunohistochemical markers in prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 1993/11/01. 20 (4) : 757–770. 1993.
 66. Epstein J.I., Zelefsky M.J., Sjoberg D.D., Nelson J.B., Egevad L., Magi-Galluzzi

- C., Vickers A.J., Parwani A. V, Reuter V.E., Fine S.W., Eastham J.A., Wiklund P., Han M., Reddy C.A., Ciezki J.P., Nyberg T., Klein E.A. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2015/07/15. 69 (3) : 428–435. 2016.
67. Van den Eynde B., Peeters O., De Backer O., Gaugler B., Lucas S., Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med.* 1995/09/01. 182 (3) : 689–698. 1995.
 68. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Pineros M., Znaor A., Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2018/10/24. 144 (8) : 1941–1953. 2019.
 69. Fuzesi L., Frank D., Nguyen C., Ringert R.H., Bartels H., Gunawan B. Losses of 1p and chromosome 14 in renal oncocytomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005/07/05. 160 (2) : 120–125. 2005.
 70. Gad S., Lefevre S.H., Khoo S.K., Giraud S., Vieillefond A., Vasiliu V., Ferlicot S., Molinie V., Denoux Y., Thiounn N., Chretien Y., Mejean A., Zerbib M., Benoit G., Herve J.M., Allegre G., Bressac-de Paillerets B., Teh B.T., Richard S. Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1beta gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2006/11/30. 96 (2) : 336–340. 2007.
 71. Garg M., Kanojia D., Khosla A., Dudha N., Sati S., Chaurasiya D., Jagadish N., Seth A., Kumar R., Gupta S., Gupta A., Lohiya N.K., Suri A. Sperm-associated antigen 9 is associated with tumor growth, migration, and invasion in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2008/10/17. 68 (20) : 8240–8248. 2008.
 72. Genega E.M., Hutchinson B., Reuter V.E., Gaudin P.B. Immunophenotype of high-grade prostatic adenocarcinoma and urothelial carcinoma. *Mod Pathol.*

2000/12/06. 13 (11) : 1186–1191. 2000.

73. Gnjatic S., Ritter E., Buchler M.W., Giese N.A., Brors B., Frei C., Murray A., Halama N., Zornig I., Chen Y.T., Andrews C., Ritter G., Old L.J., Odunsi K., Jager D. Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010/03/03. 107 (11) : 5088–5093. 2010.
74. Golovastova M.O., Korolev D.O., Tsoy L.V., Varshavsky V.A., Xu W.-H., Vinarov A.Z., Zernii E.Y., Philippov P.P., Zamyatnin A.A. Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives. *Curr. Urol. Rep.* 18 (1). 2017.
75. Golovastova M.O., Tsoy L.V., Bocharnikova A.V., Korolev D.O., Gancharova O.S., Alekseeva E.A., Kuznetsova E.B., Savvateeva L.V., Skorikova E.E., Strelnikov V.V., Varshavsky V.A., Vinarov A.Z., Nikolenko V.N., Glybochko P.V., Zernii E.Y., Zamyatnin A.A., Bazhin A.V., Philippov P.P. The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors. *Tumor Biol.* 37 (7). 2016.
76. Golovastova M.O., Bazhin A. V, Philippov P.P. Cancer-retina antigens -- a new group of tumor antigens. *Biochem.* 2014/11/05. 79 (8) : 733–739. 2014.
77. Graziano D.F., Finn O.J. Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer Treat Res.* 2005/10/11. 123 : 89–111. 2005.
78. Grunwald G.B., Kornguth S.E., Towfighi J., Sassani J., Simmonds M.A., Housman C.M., Papadopoulos N. Autoimmune basis for visual paraneoplastic syndrome in patients with small cell lung carcinoma. Retinal immune deposits and ablation of retinal ganglion cells. *Cancer.* 1987/08/15. 60 (4) : 780–786. 1987.
79. Gunawan B., von Heydebreck A., Fritsch T., Huber W., Ringert R.H., Jakse G., Fuzesi L. Cytogenetic and morphologic typing of 58 papillary renal cell carcinomas: evidence for a cytogenetic evolution of type 2 from type 1 tumors. *Cancer Res.* 2003/10/16. 63 (19) : 6200–6205. 2003.

80. Gure A.O., Tureci O., Sahin U., Tsang S., Scanlan M.J., Jager E., Knuth A., Pfreundschuh M., Old L.J., Chen Y.T. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer*. 1997/11/05. 72 (6) : 965–971. 1997.
81. Gurevich E. V, Gurevich V. V. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol*. 2006/10/06. 7 (9) : 236. 2006.
82. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999/04/15. 9 (2) : 67–81. 1999.
83. Han C.P., Hsu J.D., Koo C.L., Yang S.F. Antibody to cytokeratin (CK8/CK18) is not derived from CAM5.2 clone, and anticytokeratin CAM5.2 (Becton Dickinson) is not synonymous with the antibody (CK8/CK18). *Hum Pathol*. 2010/03/17. 41 (4) : 616–617; author reply 617. 2010.
84. Hariu H., Hirohashi Y., Torigoe T., Asanuma H., Hariu M., Tamura Y., Aketa K., Nabeta C., Nakanishi K., Kamiguchi K., Mano Y., Kitamura H., Kobayashi J., Tsukahara T., Shijubo N., Sato N. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005/02/15. 11 (3) : 1000–1009. 2005.
85. Hes O., Michal M., Kuroda N., Martignoni G., Brunelli M., Lu Y., Adley B.P., Alvarado-Cabrero I., Yang X.J. Vimentin reactivity in renal oncocytoma: immunohistochemical study of 234 cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2007/12/18. 131 (12) : 1782–1788. 2007.
86. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbe C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urba W.J. Improved survival

- with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010/06/08. 363 (8) : 711–723. 2010.
87. Hoek K.S., Schlegel N.C., Eichhoff O.M., Widmer D.S., Praetorius C., Einarsson S.O., Valgeirsdottir S., Bergsteinsdottir K., Schepsky A., Dummer R., Steingrimsen E. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008/12/11. 21 (6) : 665–676. 2008.
 88. van Houwelingen K.P., van Dijk B.A., Hulsbergen-van de Kaa C.A., Schouten L.J., Gorissen H.J., Schalken J.A., van den Brandt P.A., Oosterwijk E. Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study. *BMC Cancer*. 2005/06/04. 5 : 57. 2005.
 89. Hu Y., Dobi A., Sreenath T., Cook C., Tadase A.Y., Ravindranath L., Cullen J., Furusato B., Chen Y., Thangapazham R.L., Mohamed A., Sun C., Sesterhenn I.A., McLeod D.G., Petrovics G., Srivastava S. Delineation of TMPRSS2-ERG splice variants in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008/08/05. 14 (15) : 4719–4725. 2008.
 90. Huang W., Kanehira K., Drew S., Pier T. Oncocytoma can be differentiated from its renal cell carcinoma mimics by a panel of markers: an automated tissue microarray study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008/09/05. 17 (1) : 12–17. 2009.
 91. Huiping C., Kristjansdottir S., Bergthorsson J.T., Jonasson J.G., Magnusson J., Egilsson V., Ingvarsson S. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2002/03/28. 38 (5) : 728–735. 2002.
 92. Humphrey P.A., Moch H., Cubilla A.L., Ulbright T.M., Reuter V.E. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016/03/22. 70 (1) : 106–119. 2016.
 93. Iljin K., Wolf M., Edgren H., Gupta S., Kilpinen S., Skotheim R.I., Peltola M.,

- Smit F., Verhaegh G., Schalken J., Nees M., Kallioniemi O. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res.* 2006/11/03. 66 (21) : 10242–10246. 2006.
94. Jhang J.S., Narayan G., Murty V. V, Mansukhani M.M. Renal oncocytomas with 11q13 rearrangements: cytogenetic, molecular, and immunohistochemical analysis of cyclin D1. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004/03/24. 149 (2) : 114–119. 2004.
 95. Jiang Z., Fanger G.R., Woda B.A., Banner B.F., Algate P., Dresser K., Xu J., Chu P.G. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. *Hum Pathol.* 2003/09/25. 34 (8) : 792–796. 2003.
 96. Jiang Z., Li C., Fischer A., Dresser K., Woda B.A. Using an AMACR (P504S)/34betaE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2005/04/22. 123 (2) : 231–236. 2005.
 97. Jonasch E., Gao J., Rathmell W.K. Renal cell carcinoma. *BMJ.* 2014/11/12. 349 : g4797. 2014.
 98. Karanikas V., Colau D., Baurain J.F., Chiari R., Thonnard J., Gutierrez-Roelens I., Goffinet C., Van Schaftingen E. V, Weynants P., Boon T., Coulie P.G. High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Cancer Res.* 2001/04/28. 61 (9) : 3718–3724. 2001.
 99. Kawakami Y., Eliyahu S., Jennings C., Sakaguchi K., Kang X., Southwood S., Robbins P.F., Sette A., Appella E., Rosenberg S.A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol.* 1995/04/15. 154 (8) : 3961–3968. 1995.

100. Kawakami Y., Eliyahu S., Sakaguchi K., Robbins P.F., Rivoltini L., Yannelli J.R., Appella E., Rosenberg S.A. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*. 1994/07/01. 180 (1) : 347–352. 1994.
101. Ke X.S., Qu Y., Rostad K., Li W.C., Lin B., Halvorsen O.J., Haukaas S.A., Jonassen I., Petersen K., Goldfinger N., Rotter V., Akslen L.A., Oyan A.M., Kalland K.H. Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. *PLoS One*. 2009/03/06. 4 (3) : e4687. 2009.
102. Keltner J.L., Roth A.M., Chang R.S. Photoreceptor Degeneration: Possible Autoimmune Disorder. *Arch. Ophthalmol*. 1983.
103. Kitamura H., Honma I., Torigoe T., Hariu H., Asanuma H., Hirohashi Y., Sato E., Sato N., Tsukamoto T. Expression of livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients. *Urology*. 2007/07/28. 70 (1) : 38–42. 2007.
104. Klatte T., Pantuck A.J., Said J.W., Seligson D.B., Rao N.P., LaRochelle J.C., Shuch B., Zisman A., Kabbinnar F.F., Belldegrun A.S. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009/02/21. 15 (4) : 1162–1169. 2009.
105. Kobayashi N., Matsuzaki O., Shirai S., Aoki I., Yao M., Nagashima Y. Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical evaluation of the use of antibodies for differential diagnosis. *Hum Pathol*. 2008/07/08. 39 (9) : 1350–1359. 2008.
106. Kondo Y., Shen L., Cheng A.S., Ahmed S., Boumber Y., Charo C., Yamochi T., Urano T., Furukawa K., Kwabi-Addo B., Gold D.L., Sekido Y., Huang T.H., Issa J.P. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*. 2008/05/20. 40 (6) : 741–750. 2008.

107. Korf H.W., White B.H., Schaad N.C., Klein D.C. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res.* 1992.
108. Kornguth S.E., Klein R., Appen R., Choate J. Occurrence of anti-retinal ganglion cell antibodies in patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer.* 1982.
109. Kornguth S.E., Kalinke T., Grunwald G.B., Schutta H., Dahl D. Anti-neurofilament antibodies in the sera of patients with small cell carcinoma of the lung and with visual paraneoplastic syndrome. *Cancer Res.* 1986/05/01. 46 (5) : 2588–2595. 1986.
110. Kuehn A., Paner G.P., Skinnider B.F., Cohen C., Datta M.W., Young A.N., Srigley J.R., Amin M.B. Expression analysis of kidney-specific cadherin in a wide spectrum of traditional and newly recognized renal epithelial neoplasms: diagnostic and histogenetic implications. *Am J Surg Pathol.* 2007/09/27. 31 (10) : 1528–1533. 2007.
111. Kuroda A., Rauch T.A., Todorov I., Ku H.T., Al-Abdullah I.H., Kandeel F., Mullen Y., Pfeifer G.P., Ferreri K. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One.* 2009/09/11. 4 (9) : e6953. 2009.
112. Kuroda N., Toi M., Yamamoto M., Miyazaki E., Hayashi Y., Hiroi M., Shuin T., Enzan H. Immunohistochemical identification of intracytoplasmic lumens by cytokeratin typing may differentiate renal oncocytomas from chromophobe renal cell carcinomas. *Histol Histopathol.* 2004/01/01. 19 (1) : 23–28. 2004.
113. Kuznetsova E.B., Kekeeva T. V, Larin S.S., Zemliakova V. V, Babenko O. V, Nemtsova M. V, Zaletaev D. V, Strel'nikov V. V. [Novel methylation and expression markers associated with breast cancer]. *Mol Biol.* 2007/10/17. 41 (4) : 624–633. 2007.
114. Lambrecht H.G., Koch K.W. A 26 kd calcium binding protein from bovine rod outer segments as modulator of photoreceptor guanylate cyclase. *EMBO J.* 1991.

115. Lang D., Powell S.K., Plummer R.S., Young K.P., Ruggeri B.A. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006/08/15. 73 (1) : 1–14. 2007.
116. Langner C., Ratschek M., Rehak P., Schips L., Zigeuner R. CD10 is a diagnostic and prognostic marker in renal malignancies. *Histopathology.* 2004/10/27. 45 (5) : 460–467. 2004.
117. Langner C., Ratschek M., Rehak P., Schips L., Zigeuner R. Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. *Mod Pathol.* 2003/12/06. 17 (2) : 180–188. 2004.
118. Lapointe J., Li C., Giacomini C.P., Salari K., Huang S., Wang P., Ferrari M., Hernandez-Boussard T., Brooks J.D., Pollack J.R. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007/09/19. 67 (18) : 8504–8510. 2007.
119. Lebbe C., Weber J.S., Maio M., Neyns B., Harmankaya K., Hamid O., O'Day S.J., Konto C., Cykowski L., McHenry M.B., Wolchok J.D. Survival follow-up and ipilimumab retreatment of patients with advanced melanoma who received ipilimumab in prior phase II studies. *Ann Oncol.* 2014/09/12. 25 (11) : 2277–2284. 2014.
120. Lethe B., Lucas S., Michaux L., De Smet C., Godelaine D., Serrano A., De Plaen E., Boon T. LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer.* 1998/06/17. 76 (6) : 903–908. 1998.
121. Li F.P., Decker H.J., Zbar B., Stanton Jr. V.P., Kovacs G., Seizinger B.R., Aburatani H., Sandberg A.A., Berg S., Hosoe S., Brown R.S. Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. *Genetics of familial renal carcinoma. Ann Intern Med.* 1993/01/15. 118 (2) : 106–111. 1993.

122. Li G., Barthelemy A., Feng G., Gentil-Perret A., Peoc'h M., Genin C., Tostain J. S100A1: a powerful marker to differentiate chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. *Histopathology*. 2007/03/31. 50 (5) : 642–647. 2007.
123. Li L.C., Carroll P.R., Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005/01/20. 97 (2) : 103–115. 2005.
124. Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002/11/09. 18 (11) : 1427–1431. 2002.
125. Lin F., Brown R.E., Shen T., Yang X.J., Schuerch C. Immunohistochemical detection of P504S in primary and metastatic renal cell carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004/09/10. 12 (2) : 153–159. 2004.
126. Liu L., Qian J., Singh H., Meiers I., Zhou X., Bostwick D.G. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007/08/09. 131 (8) : 1290–1297. 2007.
127. Lucas S., De Smet C., Arden K.C., Viars C.S., Lethe B., Lurquin C., Boon T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res*. 1998/03/04. 58 (4) : 743–752. 1998.
128. Lukkonen A., Lintula S., von Boguslawski K., Carpen O., Ljungberg B., Landberg G., Stenman U.H. Tumor-associated trypsin inhibitor in normal and malignant renal tissue and in serum of renal-cell carcinoma patients. *Int J Cancer*. 1999/10/03. 83 (4) : 486–490. 1999.
129. Lurquin C., De Smet C., Brasseur F., Muscatelli F., Martelange V., De Plaen E., Brasseur R., Monaco A.P., Boon T. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins.

- Genomics. 1998/01/27. 46 (3) : 397–408. 1997.
130. Maeda A., Ohguro H., Maeda T., Wada I., Sato N., Kuroki Y., Nakagawa T. Aberrant expression of photoreceptor-specific calcium-binding protein (recoverin) in cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000/04/15. 60 (7) : 1914–1920. 2000.
 131. Maeda T., Maeda A., Maruyama I., Ogawa K.I., Kuroki Y., Sahara H., Sato N., Ohguro H. Mechanisms of photoreceptor cell death in cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001/02/27. 42 (3) : 705–712. 2001.
 132. Martignoni G., Pea M., Chilosì M., Brunelli M., Scarpa A., Colato C., Tardanico R., Zamboni G., Bonetti F. Parvalbumin is constantly expressed in chromophobe renal carcinoma. *Mod Pathol.* 2001/08/16. 14 (8) : 760–767. 2001.
 133. Matsubara S., Yamaji Y., Sato M., Fujita J., Takahara J. Expression of a photoreceptor protein, recoverin, as a cancer-associated retinopathy autoantigen in human lung cancer cell lines. *Br J Cancer.* 1996/11/01. 74 (9) : 1419–1422. 1996.
 134. Matsubara S., Yamaji Y., Fujita T., Kanayama T., Yamadori I., Sato M., Fujita J., Shiotani T., Takahara J. Cancer-associated retinopathy syndrome: A case of small cell lung cancer expressing recoverin immunoreactivity. *Lung Cancer.* 1996.
 135. Matsuo S., Ohguro H., Ohguro I., Nakazawa M. Clinicopathological roles of aberrantly expressed recoverin in malignant tumor cells. *Ophthalmic Res.* 2009/11/06. 43 (3) : 139–144. 2010.
 136. McGregor D.K., Khurana K.K., Cao C., Tsao C.C., Ayala G., Krishnan B., Ro J.Y., Lechago J., Truong L.D. Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: the use of the monoclonal antibody «Renal Cell Carcinoma Marker». *Am J Surg Pathol.* 2001/11/22. 25 (12) : 1485–1492. 2001.
 137. Mehra R., Tomlins S.A., Shen R., Nadeem O., Wang L., Wei J.T., Pienta K.J., Ghosh D., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M., Shah R.B. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate

- cancer. *Mod Pathol*. 2007/03/06. 20 (5) : 538–544. 2007.
138. Meyer P.N., Clark J.I., Flanigan R.C., Picken M.M. Xp11.2 translocation renal cell carcinoma with very aggressive course in five adults. *Am J Clin Pathol*. 2007/06/21. 128 (1) : 70–79. 2007.
 139. Milam A.H., Dacey D.M., Dizhoor A.M. Recoverin immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells. *Vis. Neurosci*. 1993.
 140. Misiuk-Hojlo M., Ejma M., Gorczyca W.A., Szymaniec S., Witkowska D., Fortuna W., Miedzybrodzki R., Rogozinska-Szczepka J., Bartnik W. Cancer-associated retinopathy in patients with breast carcinoma. *Arch Immunol Ther Exp*. 2007/07/31. 55 (4) : 261–265. 2007.
 141. Moch H., Cubilla A.L., Humphrey P.A., Reuter V.E., Ulbright T.M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016/03/05. 70 (1) : 93–105. 2016.
 142. Molinie V., Balaton A., Rotman S., Mansouri D., De Pinieux I., Homsy T., Guillou L. Alpha-methyl CoA racemase expression in renal cell carcinomas. *Hum Pathol*. 2006/05/31. 37 (6) : 698–703. 2006.
 143. Mosquera J.M., Perner S., Demichelis F., Kim R., Hofer M.D., Mertz K.D., Paris P.L., Simko J., Collins C., Bismar T.A., Chinnaiyan A.M., Rubin M.A. Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer. *J Pathol*. 2007/03/27. 212 (1) : 91–101. 2007.
 144. Mosquera J.M., Perner S., Genega E.M., Sanda M., Hofer M.D., Mertz K.D., Paris P.L., Simko J., Bismar T.A., Ayala G., Shah R.B., Loda M., Rubin M.A. Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2008/06/04. 14 (11) : 3380–3385. 2008.

145. Mulligan J.M., Mai K.T., Parks W., Gerridzen R.G. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and MIB 1: Markers of locally advanced and biologically aggressive prostate cancer. *Can J Urol*. 2003/05/09. 4 (3) : 422–425. 1997.
146. Murakami T., Sano F., Huang Y., Komiya A., Baba M., Osada Y., Nagashima Y., Kondo K., Nakaigawa N., Miura T., Kubota Y., Yao M., Kishida T. Identification and characterization of Birt-Hogg-Dube associated renal carcinoma. *J Pathol*. 2007/02/27. 211 (5) : 524–531. 2007.
147. Nadji M., Tabei S.Z., Castro A., Chu T.M., Murphy G.P., Wang M.C., Morales A.R. Prostatic-specific antigen: an immunohistologic marker for prostatic neoplasms. *Cancer*. 1981/09/01. 48 (5) : 1229–1232. 1981.
148. Nagy A., Buzogany I., Kovacs G. Microsatellite allelotyping differentiates chromophobe renal cell carcinomas from renal oncocytomas and identifies new genetic changes. *Histopathology*. 2004/06/10. 44 (6) : 542–546. 2004.
149. Nagy A., Zoubakov D., Stupar Z., Kovacs G. Lack of mutation of the folliculin gene in sporadic chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Int J Cancer*. 2004/02/13. 109 (3) : 472–475. 2004.
150. Narlis M., Grote D., Gaitan Y., Boualia S.K., Bouchard M. Pax2 and pax8 regulate branching morphogenesis and nephron differentiation in the developing kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007/02/23. 18 (4) : 1121–1129. 2007.
151. Nassar A., Amin M.B., Sexton D.G., Cohen C. Utility of alpha-methylacyl coenzyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005/08/06. 13 (3) : 252–255. 2005.
152. Nelson W.G. Prostate cancer prevention. *Curr Opin Urol*. 2007/04/07. 17 (3) : 157–167. 2007.
153. Nelson W.G., De Marzo A.M., Yegnasubramanian S. Epigenetic alterations in

- human prostate cancers. *Endocrinology*. 2009/06/13. 150 (9) : 3991–4002. 2009.
154. Ngo T.C., Wood C.G., Karam J.A. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2013/11/19. 32 (3) : 243–251. 2014.
 155. Nilsson B.O., Carlsson L., Larsson A., Ronquist G. Autoantibodies to prostasomes as new markers for prostate cancer. *Ups J Med Sci*. 2002/01/31. 106 (1) : 43–49. 2001.
 156. Novellino L., Renkvist N., Rini F., Mazzocchi A., Rivoltini L., Greco A., Deho P., Squarcina P., Robbins P.F., Parmiani G., Castelli C. Identification of a mutated receptor-like protein tyrosine phosphatase kappa as a novel, class II HLA-restricted melanoma antigen. *J Immunol*. 2003/06/10. 170 (12) : 6363–6370. 2003.
 157. Ohta Y., Suzuki T., Shiokawa A., Mitsuya T., Ota H. Expression of CD10 and cytokeratins in ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2005/06/22. 24 (3) : 239–245. 2005.
 158. Ojea Calvo A., Mosteiro Cervino M.J., Dominguez Freire F., Alonso Rodrigo A., Rodriguez Iglesias B., Benavente Delgado J., Barros Rodriguez J.M., Gonzalez Pineiro A. [Prognostic factors of prostate cancer: usefulness of Ki-67 expression in preoperative biopsies]. *Arch Esp Urol*. 2004/11/25. 57 (8) : 805–816. 2004.
 159. Olson B.M., Frye T.P., Johnson L.E., Fong L., Knutson K.L., Disis M.L., McNeel D.G. HLA-A2-restricted T-cell epitopes specific for prostatic acid phosphatase. *Cancer Immunol Immunother*. 2010/02/09. 59 (6) : 943–953. 2010.
 160. Pan C.C., Chen P.C., Ho D.M. The diagnostic utility of MOC31, BerEP4, RCC marker and CD10 in the classification of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical analysis of 328 cases. *Histopathology*. 2004/10/27. 45 (5) : 452–459. 2004.
 161. Pastore A.L., Palleschi G., Silvestri L., Moschese D., Ricci S., Petrozza V., Carbone A., Di Carlo A. Serum and urine biomarkers for human renal cell

- carcinoma. *Dis Markers*. 2015/04/30. 2015 : 251403. 2015.
162. Pastorekova S., Zavadova Z., Kostal M., Babusikova O., Zavada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology*. 1992/04/01. 187 (2) : 620–626. 1992.
 163. Perner S., Demichelis F., Beroukhir R., Schmidt F.H., Mosquera J.M., Setlur S., Tchinda J., Tomlins S.A., Hofer M.D., Pienta K.G., Kuefer R., Vessella R., Sun X.W., Meyerson M., Lee C., Sellers W.R., Chinnaiyan A.M., Rubin M.A. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006/09/05. 66 (17) : 8337–8341. 2006.
 164. Peterson Y.K., Luttrell L.M. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol Rev*. 2017/06/20. 69 (3) : 256–297. 2017.
 165. Picken M.M., Chyna B., Flanigan R.C., Lee J.M. Analysis of chromosome 1p abnormalities in renal oncocytomas by loss of heterozygosity studies: correlation with conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol*. 2008/02/21. 129 (3) : 377–382. 2008.
 166. Pignot G., Elie C., Conquy S., Vieillefond A., Flam T., Zerbib M., Debre B., Amsellem-Ouazana D. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology*. 2007/02/06. 69 (2) : 230–235. 2007.
 167. Pittet M.J., Valmori D., Dunbar P.R., Speiser D.E., Lienard D., Lejeune F., Fleischhauer K., Cerundolo V., Cerottini J.C., Romero P. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med*. 1999/09/08. 190 (5) : 705–715. 1999.
 168. Polans A.S., Buczylo J., Crabb J., Palczewski K. A photoreceptor calcium binding protein is recognized by autoantibodies obtained from patients with

- cancer-associated retinopathy. *J. Cell Biol.* 1991.
169. Poleev A., Fickenscher H., Mundlos S., Winterpacht A., Zabel B., Fidler A., Gruss P., Plachov D. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development.* 1992/11/01. 116 (3) : 611–623. 1992.
 170. Potter M.J., Thirkill C.E., Dam O.M., Lee A.S., Milam A.H. Clinical and immunocytochemical findings in a case of melanoma-associated retinopathy. *Ophthalmology.* 1999/11/26. 106 (11) : 2121–2125. 1999.
 171. Przybycin C.G., Cronin A.M., Darvishian F., Gopalan A., Al-Ahmadie H.A., Fine S.W., Chen Y.B., Bernstein M., Russo P., Reuter V.E., Tickoo S.K. Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 203 tumors in 200 patients with primary resection at a single institution. *Am J Surg Pathol.* 2011/05/24. 35 (7) : 962–970. 2011.
 172. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019/05/10. 10 (2) : 63–89. 2019.
 173. Redova M., Poprach A., Nekvindova J., Iliev R., Radova L., Lakomy R., Svoboda M., Vyzula R., Slaby O. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med.* 2012/03/24. 10 : 55. 2012.
 174. Rioux-Leclercq N., Fergelot P., Zerrouki S., Leray E., Jouan F., Bellaud P., Epstein J.I., Patard J.J. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol.* 2007/06/29. 38 (10) : 1489–1495. 2007.
 175. Robert C., Thomas L., Bondarenko I., O'Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J.F., Testori A., Grob J.J., Davidson N., Richards J., Maio M., Hauschild A., Miller Jr. W.H., Gascon P., Lotem M., Harmankaya K., Ibrahim R., Francis S., Chen T.T., Humphrey R., Hoos A., Wolchok J.D. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011/06/07. 364

(26) : 2517–2526. 2011.

176. Rocca P.C., Brunelli M., Gobbo S., Eccher A., Bragantini E., Mina M.M., Ficarra V., Zattoni F., Zamo A., Pea M., Scarpa A., Chilosi M., Menestrina F., Bonetti F., Eble J.N., Martignoni G. Diagnostic utility of S100A1 expression in renal cell neoplasms: an immunohistochemical and quantitative RT-PCR study. *Mod Pathol.* 2007/05/08. 20 (7) : 722–728. 2007.
177. Rosenberg S.A., White D.E. Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Emphas. Tumor Immunol.* 1996/01/01. 19 (1) : 81–84. 1996.
178. Rouzier C., Haudebourg J., Carpentier X., Valerio L., Amiel J., Michiels J.F., Pedetour F. Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008/05/14. 183 (1) : 21–27. 2008.
179. Saramaki O.R., Harjula A.E., Martikainen P.M., Vessella R.L., Tammela T.L., Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res.* 2008/06/04. 14 (11) : 3395–3400. 2008.
180. Sato E., Torigoe T., Hirohashi Y., Kitamura H., Tanaka T., Honma I., Asanuma H., Harada K., Takasu H., Masumori N., Ito N., Hasegawa T., Tsukamoto T., Sato N. Identification of an immunogenic CTL epitope of HIFPH3 for immunotherapy of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008/11/05. 14 (21) : 6916–6923. 2008.
181. Savchenko M.S., Bazhin A. V, Shifrina O.N., Demoura S.A., Kogan E.A., Chuchalin A.G., Philippov P.P. Antirecoverin autoantibodies in the patient with non-small cell lung cancer but without cancer-associated retinopathy. *Lung Cancer.* 2003/08/21. 41 (3) : 363–367. 2003.
182. Savchenko M.S., Goncharskaia M.A., Skorikova E.E., Eichmuller S.B., Kushlinsky N.E., Bazhin A. V, Philippov P.P. Autoantibodies against the Ca(2+)-binding protein recoverin in blood sera of patients with various oncological

- diseases. *Oncol Lett.* 2012/06/29. 3 (2) : 377–382. 2012.
183. Sawyer R.A., Selhorst J.B., Zimmerman L.E., Hoyt W.F. Blindness caused by photoreceptor degeneration as a remote effect of cancer. *Am. J. Ophthalmol.* 1976.
 184. Schwerdtle R.F., Storkel S., Neuhaus C., Brauch H., Weidt E., Brenner W., Hohenfellner R., Huber C., Decker H.J. Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996/07/01. 56 (13) : 2927–2930. 1996.
 185. Shen S.S., Krishna B., Chirala R., Amato R.J., Truong L.D. Kidney-specific cadherin, a specific marker for the distal portion of the nephron and related renal neoplasms. *Mod Pathol.* 2005/02/08. 18 (7) : 933–940. 2005.
 186. Shen S.S., Ro J.Y., Tamboli P., Truong L.D., Zhai Q., Jung S.J., Tibbs R.G., Ordonez N.G., Ayala A.G. Mucinous tubular and spindle cell carcinoma of kidney is probably a variant of papillary renal cell carcinoma with spindle cell features. *Ann Diagn Pathol.* 2007/01/24. 11 (1) : 13–21. 2007.
 187. Shimada H., Takeda A., Arima M., Okazumi S., Matsubara H., Nabeya Y., Funami Y., Hayashi H., Gunji Y., Suzuki T., Kobayashi S., Ochiai T. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2000/10/24. 89 (8) : 1677–1683. 2000.
 188. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* 2018.
 189. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 2019.
 190. Simsir A., Chhieng D., Wei X.J., Yee H., Waisman J., Cangiarella J. Utility of CD10 and RCCma in the diagnosis of metastatic conventional renal-cell adenocarcinoma by fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol.* 2005/06/10.

- 33 (1) : 3–7. 2005.
191. Singh R.B., Amare Kadam P.S. Investigation of tumor suppressor genes apart from VHL on 3p by deletion mapping in sporadic clear cell renal cell carcinoma (cRCC). *Urol Oncol.* 2011/10/04. 31 (7) : 1333–1342. 2013.
 192. Skinnider B.F., Folpe A.L., Hennigar R.A., Lim S.D., Cohen C., Tamboli P., Young A., de Peralta-Venturina M., Amin M.B. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2005/05/18. 29 (6) : 747–754. 2005.
 193. Sokolova I.N., Vishnevskaya Ia V., Gridneva Ia V. [Chromophobic carcinoma of the kidney with intracytoplasmic tubules]. *Arkh Patol.* 2011/06/24. 73 (2) : 35–37. 2011.
 194. Sukosd F., Kuroda N., Beothe T., Kaur A.P., Kovacs G. Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003/01/25. 63 (2) : 455–457. 2003.
 195. Sun K., Huan Y., Unger P.D. Clear cell adenocarcinoma of urinary bladder and urethra: another urinary tract lesion immunoreactive for P504S. *Arch Pathol Lab Med.* 2008/09/16. 132 (9) : 1417–1422. 2008.
 196. Sviatoha V., Tani E., Kleina R., Sperga M., Skoog L. Immunohistochemical analysis of the S100A1, S100B, CD44 and Bcl-2 antigens and the rate of cell proliferation assessed by Ki-67 antibody in benign and malignant melanocytic tumours. *Melanoma Res.* 2010/01/01. 20 (2) : 118–125. 2010.
 197. Taftachi R., Ayhan A., Ekici S., Ergen A., Ozen H. Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) as an independent prognostic marker in patients after prostatectomy: a comparison of PCNA and Ki-67. *BJU Int.* 2005/02/12. 95 (4) : 650–654. 2005.

198. Taki A., Nakatani Y., Misugi K., Yao M., Nagashima Y. Chromophobe renal cell carcinoma: an immunohistochemical study of 21 Japanese cases. *Mod Pathol.* 1999/04/02. 12 (3) : 310–317. 1999.
199. Tanaka T., Kitamura H., Torigoe T., Hirohashi Y., Sato E., Masumori N., Sato N., Tsukamoto T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010/08/03. 137 (5) : 789–794. 2011.
200. Taplin M.E., Rajeshkumar B., Halabi S., Werner C.P., Woda B.A., Picus J., Stadler W., Hayes D.F., Kantoff P.W., Vogelzang N.J., Small E.J. Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol.* 2003/07/16. 21 (14) : 2673–2678. 2003.
201. Taylor B.S., Schultz N., Hieronymus H., Gopalan A., Xiao Y., Carver B.S., Arora V.K., Kaushik P., Cerami E., Reva B., Antipin Y., Mitsiades N., Landers T., Dolgalev I., Major J.E., Wilson M., Socci N.D., Lash A.E., Heguy A., Eastham J.A., Scher H.I., Reuter V.E., Scardino P.T., Sander C., Sawyers C.L., Gerald W.L. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010/06/29. 18 (1) : 11–22. 2010.
202. Teratani T., Watanabe T., Kuwahara F., Kumagai H., Kobayashi S., Aoki U., Ishikawa A., Arai K., Nozawa R. Induced transcriptional expression of calcium-binding protein S100A1 and S100A10 genes in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2001/12/06. 175 (1) : 71–77. 2002.
203. Thirkill C.E., Roth A.M., Keltner J.L. Cancer-associated retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1987/03/01. 105 (3) : 372–375. 1987.
204. Tiuriaeva II. [Tumor antigens]. *Tsitologiya.* 2008/07/31. 50 (3) : 189–209. 2008.
205. Toledo G., Sola J.J., Lozano M.D., Soria E., Pardo J. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in

- non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol*. 2004/02/21. 17 (4) : 440–448. 2004.
206. Toma M.I., Grosser M., Herr A., Aust D.E., Meye A., Hoefling C., Fuessel S., Wuttig D., Wirth M.P., Baretton G.B. Loss of heterozygosity and copy number abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism mapping array. *Neoplasia*. 2008/07/02. 10 (7) : 634–642. 2008.
 207. Tomlins S.A., Laxman B., Dhanasekaran S.M., Helgeson B.E., Cao X., Morris D.S., Menon A., Jing X., Cao Q., Han B., Yu J., Wang L., Montie J.E., Rubin M.A., Pienta K.J., Roulston D., Shah R.B., Varambally S., Mehra R., Chinnaiyan A.M. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*. 2007/08/03. 448 (7153) : 595–599. 2007.
 208. Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., Lee C., Montie J.E., Shah R.B., Pienta K.J., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* (80-.). 2005/10/29. 310 (5748) : 644–648. 2005.
 209. Tong G.X., Yu W.M., Beaubier N.T., Weeden E.M., Hamele-Bena D., Mansukhani M.M., O'Toole K.M. Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study. *Mod Pathol*. 2009/06/16. 22 (9) : 1218–1227. 2009.
 210. Topalian S.L., Drake C.G., Pardoll D.M. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012/01/13. 24 (2) : 207–212. 2012.
 211. Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R., Gettinger S.N., Smith D.C., McDermott D.F., Powderly J.D., Carvajal R.D., Sosman J.A., Atkins M.B., Leming P.D., Spigel D.R., Antonia S.J., Horn L., Drake C.G., Pardoll D.M., Chen L., Sharfman W.H., Anders R.A., Taube J.M., McMiller T.L., Xu H., Korman A.J., Jure-Kunkel

- M., Agrawal S., McDonald D., Kollia G.D., Gupta A., Wigginton J.M., Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012/06/05. 366 (26) : 2443–2454. 2012.
212. Topalian S.L., Sznol M., McDermott D.F., Kluger H.M., Carvajal R.D., Sharfman W.H., Brahmer J.R., Lawrence D.P., Atkins M.B., Powderly J.D., Leming P.D., Lipson E.J., Puzanov I., Smith D.C., Taube J.M., Wigginton J.M., Kollia G.D., Gupta A., Pardoll D.M., Sosman J.A., Hodi F.S. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol.* 2014/03/05. 32 (10) : 1020–1030. 2014.
213. Tretiakova M.S., Sahoo S., Takahashi M., Turkyilmaz M., Vogelzang N.J., Lin F., Krausz T., Teh B.T., Yang X.J. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in papillary renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2004/01/07. 28 (1) : 69–76. 2004.
214. Tsoy L. V., Korolev D.O., Vinarov A.Z., Enikeev M.E., Lerner Y. V., Tsarichenko D.G., Popov N.A., Abdusalamov A.F., Gorobets Y.P., Demidko Y.L., Varshavskiy V.A., Zamyatnin A.A., Rapoport L.M. Aberrant expression of arrestin-1 and recoverin in kidney tumors. *Urologiia.* 2019.
215. Turaka K., Kietz D., Krishnamurti L., Mitchell E., Scanga H., Fu V.L., Sylvester C. Carcinoma-associated retinopathy in a young teenager with immature teratoma of the ovary. *J AAPOS.* 2014/09/01. 18 (4) : 396–398. 2014.
216. Tureci O., Sahin U., Schobert I., Koslowski M., Scmitt H., Schild H.J., Stenner F., Seitz G., Rammensee H.G., Pfreundschuh M. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* 1996/10/15. 56 (20) : 4766–4772. 1996.
217. Varambally S., Dhanasekaran S.M., Zhou M., Barrette T.R., Kumar-Sinha C., Sanda M.G., Ghosh D., Pienta K.J., Sewalt R.G., Otte A.P., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of

- prostate cancer. *Nature*. 2002/10/11. 419 (6907) : 624–629. 2002.
218. Vecchione A., Seignani C., Giarnieri E., Zanesi N., Ishii H., Cesari R., Fong L.Y., Gomella L.G., Croce C.M., Baffa R. Inactivation of the FHIT gene favors bladder cancer development. *Clin Cancer Res*. 2004/12/01. 10 (22) : 7607–7612. 2004.
 219. Vigneron N., Van den Eynde B.J. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cell Mol Life Sci*. 2011/03/10. 68 (9) : 1503–1520. 2011.
 220. Vigneron N., Ooms A., Morel S., Ma W., Degiovanni G., Van den Eynde B.J. A peptide derived from melanocytic protein gp100 and presented by HLA-B35 is recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on melanoma cells. *Tissue Antigens*. 2005/02/17. 65 (2) : 156–162. 2005.
 221. Visseren M.J., van Elsas A., van der Voort E.I., Rensing M.E., Kast W.M., Schrier P.I., Melief C.J. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J Immunol*. 1995/04/15. 154 (8) : 3991–3998. 1995.
 222. Wang H., Maurano M.T., Qu H., Varley K.E., Gertz J., Pauli F., Lee K., Canfield T., Weaver M., Sandstrom R., Thurman R.E., Kaul R., Myers R.M., Stamatoyannopoulos J.A. Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res*. 2012/09/08. 22 (9) : 1680–1688. 2012.
 223. Wang H.Y., Mills S.E. KIT and RCC are useful in distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from the granular variant of clear cell renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005/04/16. 29 (5) : 640–646. 2005.
 224. Wang J., Cai Y., Ren C., Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006/09/05. 66 (17) : 8347–8351. 2006.

225. Wang R.F., Appella E., Kawakami Y., Kang X., Rosenberg S.A. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996/12/01. 184 (6) : 2207–2216. 1996.
226. Wang R.F., Parkhurst M.R., Kawakami Y., Robbins P.F., Rosenberg S.A. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med.* 1996/03/01. 183 (3) : 1131–1140. 1996.
227. Wasco M.J., Daignault S., Bradley D., Shah R.B. Nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 30 pure and mixed cases. *Hum Pathol.* 2009/10/06. 41 (2) : 163–171. 2010.
228. Weinberger R., Appel B., Stein A., Metz Y., Neheman A., Barak M. The pyruvate kinase isoenzyme M2 (Tu M2-PK) as a tumour marker for renal cell carcinoma. *Eur J Cancer Care.* 2007/06/26. 16 (4) : 333–337. 2007.
229. Weinreb I., Cunningham K.S., Perez-Ordóñez B., Hwang D.M. CD10 is expressed in most epithelioid hemangioendotheliomas: a potential diagnostic pitfall. *Arch Pathol Lab Med.* 2009/12/08. 133 (12) : 1965–1968. 2009.
230. Wiechmann A.F., Hammarback J.A. Expression of recoverin mRNA in the human retina: Localization by in situ hybridization. *Exp. Eye Res.* 1993.
231. Wolfel T., Van Pel A., Brichard V., Schneider J., Seliger B., Meyer zum Buschenfelde K.H., Boon T. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1994/03/01. 24 (3) : 759–764. 1994.
232. Wulfken L.M., Moritz R., Ohlmann C., Holdenrieder S., Jung V., Becker F., Herrmann E., Walgenbach-Brunagel G., von Ruecker A., Muller S.C., Ellinger J. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One.* 2011/10/11. 6 (9) : e25787. 2011.
233. Wykoff C.C., Beasley N.J., Watson P.H., Turner K.J., Pastorek J., Sibbain A.,

- Wilson G.D., Turley H., Talks K.L., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Harris A.L. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2001/01/13. 60 (24) : 7075–7083. 2000.
234. Yamaji Y., Matsubara S., Yamadori I., Sato M., Fujita T., Fujita J., Takahara J. Characterization of a small-cell-lung-carcinoma cell line from a patient with cancer-associated retinopathy. *Int J Cancer.* 1996/03/01. 65 (5) : 671–676. 1996.
235. Yamanaka K., Miyake H., Hara I., Gohji K., Arakawa S., Kamidono S. Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma. *Int J Mol Med.* 1998/12/17. 2 (1) : 57–60. 1998.
236. Yang Q., Nakamura M., Nakamura Y., Yoshimura G., Suzuma T., Umemura T., Shimizu Y., Mori I., Sakurai T., Kakudo K. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002/09/17. 8 (9) : 2890–2893. 2002.
237. Yang X.J., Zhou M., Hes O., Shen S., Li R., Lopez J., Shah R.B., Yang Y., Chuang S.T., Lin F., Tretiakova M.M., Kort E.J., Teh B.T. Tubulocystic carcinoma of the kidney: clinicopathologic and molecular characterization. *Am J Surg Pathol.* 2008/01/29. 32 (2) : 177–187. 2008.
238. Yao Y., Fan Y., Wu J., Wan H., Wang J., Lam S., Lam W.L., Girard L., Gazdar A.F., Wu Z., Zhou Q. Potential application of non-small cell lung cancer-associated autoantibodies to early cancer diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012/06/21. 423 (3) : 613–619. 2012.
239. Yee C., Thompson J.A., Roche P., Byrd D.R., Lee P.P., Piepkorn M., Kenyon K., Davis M.M., Riddell S.R., Greenberg P.D. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med.* 2000/12/06. 192 (11) : 1637–1644. 2000.
240. Young A.N., de Oliveira Salles P.G., Lim S.D., Cohen C., Petros J.A., Marshall F.F., Neish A.S., Amin M.B. Beta defensin-1, parvalbumin, and vimentin: a panel

- of diagnostic immunohistochemical markers for renal tumors derived from gene expression profiling studies using cDNA microarrays. *Am J Surg Pathol*. 2003/01/28. 27 (2) : 199–205. 2003.
241. Yusenko M. V, Kuiper R.P., Boethe T., Ljungberg B., van Kessel A.G., Kovacs G. High-resolution DNA copy number and gene expression analyses distinguish chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas. *BMC Cancer*. 2009/05/19. 9 : 152. 2009.
 242. Yusenko M. V, Zubakov D., Kovacs G. Gene expression profiling of chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas by Affymetrix GeneChip using pooled and individual tumours. *Int J Biol Sci*. 2009/08/15. 5 (6) : 517–527. 2009.
 243. Zarour H., De Smet C., Lehmann F., Marchand M., Lethe B., Romero P., Boon T., Renauld J.C. The majority of autologous cytolytic T-lymphocyte clones derived from peripheral blood lymphocytes of a melanoma patient recognize an antigenic peptide derived from gene Pmel17/gp100. *J Invest Dermatol*. 1996/07/01. 107 (1) : 63–67. 1996.
 244. Zhao A., Li G., Peoc'h M., Genin C., Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2012/10/16. 94 (1) : 115–120. 2013.