

УДК 616.006-576.32

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА *VHL* ПРИ СПОРАДИЧЕСКОМ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ПОЧКИ**

Д.С. Михайленко<sup>1,2</sup>, Р.В. Курьинин<sup>3</sup>, А.М. Попов<sup>4</sup>, М.Э. Еникеев<sup>3</sup>, Ю.Г. Аляев<sup>3</sup>, О.Б. Карякин<sup>4</sup>, Л.Э. Завалишина<sup>5</sup>, Г.А. Франк<sup>5</sup>, Д.В. Залетаев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, <sup>2</sup>НИИ Молекулярной медицины при ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, <sup>3</sup>Урологическая клиника им. Р.М. Фронштейна ММА им. И.М. Сеченова, <sup>4</sup>ГУ Медицинский радиологический научный центр РАМН, <sup>5</sup>ФГУ МНИОИ им.

*П.А. Герцена Росздрава*

Адрес для переписки: Михайленко Дмитрий e-mail: [dimserg@mail.ru](mailto:dimserg@mail.ru)

Ключевые слова: молекулярная генетика, рак почки, онкология

**Резюме**

Светлоклеточная карцинома составляет 75% случаев злокачественных новообразований почек. Большинство светлоклеточных карцином характеризуются инактивацией гена-супрессора *VHL* вследствие мутаций, аллельных делеций и/или метилирования. Существуют противоречивые данные о влиянии инактивации *VHL* на прогноз заболевания. В настоящей работе проведен комплексный молекулярно-генетический анализ мутаций, потери гетерозиготности и аберрантного метилирования промотора *VHL* в 93 образцах светлоклеточного рака почки. Выявлено 30 соматических мутаций *VHL*, 23 из которых охарактеризованы впервые. В целом, инактивация *VHL* обнаружена в 48,4% случаев заболевания, а среди пациентов с I стадией рака почки – в 52,9% случаев, что свидетельствует в пользу инактивации *VHL* на ранних стадиях канцерогенеза. Проводили статистический анализ выявленных изменений относительно параметров первичной опухоли в различных группах пациентов. Результаты настоящего исследования могут способствовать выявлению диагностических и прогностических маркеров рака почки, например, созданию панели метилированных генов-супрессоров и оптимизации таргетной терапии.

**Введение**

Ежегодно в мире регистрируют около 200 тыс. новых случаев рака почки, что позволяет считать его одной из основных проблем современной онкоурологии [1]. Примерно 3% случаев заболевания имеют наследственный характер, тогда как подавляющее большинство наблюдений представляют собой спорадические случаи. Наиболее распространенный вариант рака почки – светлоклеточная карцинома, которую регистрируют у 75% пациентов. Большинство спорадических светлоклеточных карцином характеризуются инактивацией гена-супрессора *VHL* [2, 3]. Этот ген локализован в области хромосомы 3p25, содержит 3 экзона и кодирует белок длиной 213 аминокислотных остатков. Белковый

продукт гена *VHL* необходим для сборки убиквитин-лигазного комплекса, в котором осуществляется деградация индуцируемого гипоксией фактора  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [4]. Развитие светлоклеточной карциномы сопровождается инактивацией *VHL* согласно двухударной модели Кнадсена, где в качестве молекулярно-генетических нарушений выступают соматические мутации, потеря гетерозиготности и/или aberrантное метилирование промотора. Перечисленные нарушения приводят к блокированию экспрессии *VHL* или синтезу дефектного белкового продукта. В клетке при этом накапливается избыточное количество HIF-1 $\alpha$ , который активирует транскрипцию индуцируемых гипоксией генов (*VEGF*, *PDGF*, *TNF- $\alpha$*  и др.), участвующих в положительной регуляции клеточной пролиферации [3, 5]. Исследования инактивации *VHL* при спорадическом почечно-клеточном раке как прогностического критерия в различных клинических группах пациентов приводили к неоднозначным результатам [3, 6, 7, 8]. Показано, что мутации и aberrантное метилирование *VHL* специфичны для светлоклеточной карциномы почки [9, 10]. Частота метилирования *VHL* и гены, которые вместе с ним могли бы служить в качестве маркеров метилирования при раке почки, представляются на сегодняшний день дискуссионными вопросами [11, 12]. Целью настоящего исследования является изучение инактивации *VHL* в первичных опухолях при светлоклеточном раке почки в различных клинических группах пациентов и поиск на основе полученных данных прогностических критериев рака почки.

### **Материалы и методы**

**Клинический материал.** В работе исследовано 93 образца светлоклеточного рака почки. Из них 64 образца – парные (опухоли и соответствующие им образцы гистологически не измененной почечной паренхимы), 29 случаев – архивные образцы светлоклеточного рака почки (парафиновые блоки). Из 93 первичных опухолей 51 образец соответствовал I-ой стадии заболевания, 10 – II-ой, 18 – III-ей и 14 – IV-ой. На момент постановки диагноза 15 пациентов в изучаемой выборке имели метастазы в регионарных лимфатических узлах и/или отдаленные метастазы. По степени дифференцировки первичной опухоли образцы были распределены следующим образом: 21 – G<sub>1</sub>, 49 – G<sub>2</sub>, 22 – G<sub>3</sub> и 1 – G<sub>4</sub>. Выборка была также разделена на подгруппы в зависимости от размера первичной опухоли согласно TNM-классификации для новообразований почек: 51 – T<sub>1</sub>, 10 – T<sub>2</sub>, 25 – T<sub>3</sub> и 7 – T<sub>4</sub>. В дальнейшем пациенты были объединены в парные клинические группы по следующим признакам: начальные (I-II) и поздние (III-IV) стадии заболевания, наличие и отсутствие метастазов на момент постановки диагноза, локализованная (T<sub>1-2</sub>) и местно распространенная (T<sub>3-4</sub>) опухоли; по степени дифференцировки первичной опухоли – группы G<sub>I-II</sub> и G<sub>III-IV</sub>.

**Выделение ДНК.** Образцы замороженных тканей гомогенизировали для выделения ДНК, а из парафиновых блоков получали 3 среза толщиной 20 мкм каждый, которые затем

депарафинизировали с использованием ксилола и этанола [13]. Геномную ДНК выделяли методом обработки образцов протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией [14].

**Анализ мутаций в кодирующей части гена *VHL*** проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), SSCP-анализа ПЦР-продуктов и секвенирования; последовательности праймеров и условия ПЦР описаны ранее [15].

**Потерю гетерозиготности области локализации *VHL*** выявляли с помощью STR-маркеров D3S1317 и D3S1038, последовательности праймеров и сопутствующая информация для указанных микросателлитных локусов доступны в базе данных UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>). Разделение аллелей осуществляли в 6% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей окраской нитратом серебра.

**Метилирование *VHL*** определяли методом метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Предварительно геномную ДНК подвергали гидролизу метилчувствительной рестриктазой BstHNI, в качестве матрицы для МЧ-ПЦР использовали продукты рестрикции. Параметры ПЦР были идентичны таковым при изучении аллельных делеций. В МЧ-ПЦР применяли праймеры для 2-го экзона *VHL* в качестве внутреннего контроля амплификации [14] и праймеры для анализа метилирования *VHL*, разработанные в настоящем исследовании. Дизайн праймеров выполнен с помощью программы Oligo v. 6.0 и BLAST, амплифицируемая последовательность содержала 7 сайтов узнавания BstHNI. Контролем полноты гидролиза служила ПЦР при идентичных условиях рестрикции MspI – эндонуклеазы рестрикции, не чувствительной к метилированию. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 8% растворе ПААГ.

**Статистическую обработку экспериментальных данных**, которая включала анализ таблиц сопряженности с помощью двустороннего точного критерия Фишера, осуществляли с помощью программы GraphPad InStat v. 3.05.

### **Результаты и обсуждение**

Мутации в гене *VHL* были выявлены в 32.3% (30/93) случаев светлоклеточного рака почки (табл. 1). В образцах замороженных тканей и парафиновых блоках частоты мутаций составили 26.6% (17/64) и 44.8% (13/29), соответственно. Все найденные мутации соматические, т.е. присутствовали только в образцах опухолевой ткани и не выявлены в соответствующих им образцах нормальной почечной паренхимы. Из найденных мутаций 76.7% (23/30) составляли делеции, 13.3% (4/30) – однонуклеотидные замены, оставшиеся 10% представлены инсерциями (2/30) и комплексной мутацией (1/30).

Таблица 1.

Соматические мутации в различных частях гена *VHL*, выявленные в настоящем исследовании

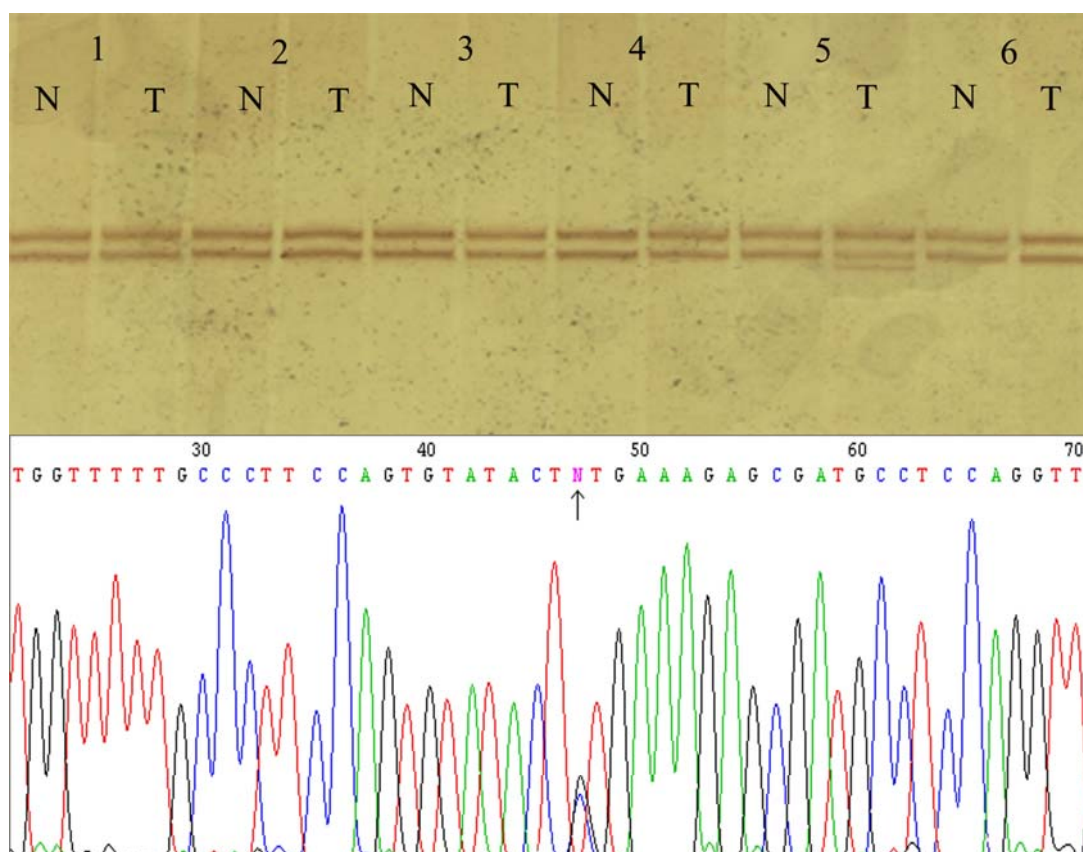
Экзон 1	Экзон 2	Экзон 3	Интроны 1, 2
<b>c.155_196del</b>	c.359_368del		
c.162_166del	c.377_381del		
c.165_169del	c.390delT		
<b>c.167_172del</b>	c.392_408del	<i>c.472C&gt;G</i>	
c.175_177delinsTC	c.395delA	c.478_481del	c.340+2_340+4del
<b>c.192_200del</b>	c.400_401insA	c.514_527del	c.464-1_469del
<i>c.234T&gt;G (2 случая)</i>	c.401delA	c.626_627insA	
c.263delG	c.421delA		
<i>c.293A&gt;T</i>	c.440_443del		
c.321delC	c.444_445del		
c.336_340del			

*Примечания: обычным шрифтом выделены мутации сдвига рамки считывания, полужирным – делеции, изменяющие структуру участка связывания HIF1-α, курсивом – миссенс-мутации.*

Все выявленные мутации были сопоставлены с банком данных мутаций UMD (<http://www.umd.be:2020/>), впервые охарактеризованные мутации присутствовали в 76.7% (23/30) случаев. Из них 13 новых мутаций обнаружено в образцах замороженных тканей и 11 – в архивных образцах опухолей. Большинство делеций – 78.3% (18/23), а также две инсерции и комплексная мутация приводили к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов, 13.0% (3/23) делеций не меняли рамку считывания, но повреждали участок, кодирующий сайт связывания HIF-1α. Делеции в первом интроне и во втором интроне нарушали сайты сплайсинга, анализ влияния мутаций на структуру первичного транскрипта проводился с помощью интерактивной программы поиска сайтов сплайсинга ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)).

Обнаруженные соматические мутации в виде однонуклеотидных замен представляли собой миссенс-мутации p.Asn78Lys (2 случая), p.Tyr98Phe и p.Leu158Val (рис. 1). Первые три из них изменяли структуру сайта связывания HIF-1α в β-домене белка VHL, тогда как p.Leu158Val затрагивала сайт связывания элонгина C в α-домене VHL.

Рисунок 1. Пример определения соматических мутаций в гене *VHL*.



*Примечания: верхняя часть – SSCP-анализ (N и T – нормальная и опухолевая ткани, соответственно), ПЦР-продукт с аномальной подвижностью в образце 5T, нижняя часть – прямое секвенирование образца 5T, идентификация мутации с.472C→G.*

Оба домена являются критическими для выполнения белком VHL своей функции. В настоящем исследовании спорадического светлоклеточного рака почки выявленные мутации представлены, в основном, делециями, что согласуется с данными других авторов [3, 9]. В литературе описаны мутации *VHL*, представляющие собой делеции, протяженность которых превышает один экзон, но не распространяется на весь ген и смежные с ним области. Такие делеции не доступны для исследования методом SSCP или с помощью STR-маркеров, но могут быть выявлены с помощью ПЦР в реальном времени в ДНК изолированных опухолевых клеток [16, 17]. Не исключено, что применение ПЦР в реальном времени позволит повысить эффективность выявления делеций *VHL*.

Анализ потери гетерозиготности области локализации гена *VHL* оценивали по STR-маркерам D3S1317 и D3S1038. Информативность каждого из микросателлитных локусов составила 51.6% (33/64) и 73.4% (47/64) соответственно. Используемая система из 2-х STR-маркеров позволяла анализировать аллельные делеции в 89.1% (57/64) случаев. Потеря гетерозиготности обнаружена в 31.6% (18/57) информативных образцов светлоклеточного рака почки. Это можно объяснить тем, что в клинических образцах тканей светлоклеточных карцином помимо опухолевых клеток присутствовали клетки стромы, что затрудняет

выявление потерь гетерозиготности в образце. Кроме того, возможна инактивация *VHL* вследствие биаллельных делеций и потеря гетерозиготности в неинформативных случаях, доля которых в настоящем исследовании составила 10.9% (7/64). Тем не менее, полученная частота аллельных делеций может быть учтена при исследовании молекулярно-генетических маркеров в гетерогенном опухолевом материале при раке почки.

Метилирование *VHL* обнаружено в 14.0% (13/93) исследованных образцов. Из них aberrантное метилирование промотора выявлено в 5 первичных опухолях из выборки парных образцов и 8 – из парафиновых блоков. Методом метилспецифической ПЦР другие авторы изучали статус метилирования 8 цитозиновых остатков в области с.-24\_-168, в настоящем исследовании проводился анализ метилирования МЧ-ПЦР 7 CpG-динуклеотидов на том же участке *VHL* [3, 11, 12, 18]. Причем 4 из 8 участков с максимальной плотностью CpG-островков были доступны для анализа МЧ-ПЦР, тогда как предложенные варианты метилспецифической ПЦР могли определять метилирование 2 таких участков. Приведенные выше факты могут указывать на взаимозаменяемость использованной здесь метилчувствительной и описанной в литературе метилспецифической ПЦР как методических подходов в анализе метилирования CpG-островка *VHL*. Одно из интенсивно разрабатываемых в настоящее время направлений исследований при светлоклеточном раке почки – это поиск молекулярно-генетических маркеров, в частности, метилирования, выявляемых в биологических жидкостях [11, 19, 20]. Создание панели маркеров метилирования позволит проводить неинвазивную диагностику рака почки. Несмотря на относительно низкую частоту, изучение метилирования *VHL* в сыворотке крови и/или моче представляется перспективной задачей вследствие его высокой специфичности для светлоклеточного рака почки [11, 12]. При этом метилирование *VHL* выступает не в роли индивидуального маркера канцерогенеза, а в качестве одной из составляющих панели метилированных генов при раке почки.

В парных клинических группах провели анализ встречаемости мутаций, аллельных делеций и метилирования (табл. 2). Кроме того, учитывая влияние гетерогенности опухолей на чувствительность выявления потери гетерозиготности, в исследуемых группах оценивали распределение случаев с любым из вышеперечисленных трех инактивирующих событий. Молекулярно-генетические нарушения в гене *VHL* найдены у 48.4% (45/93) пациентов. Показано, что пациенты с I-ой стадией рака почки характеризуются наличием соматических мутаций *VHL* в 37.3% (19/51) случаев, потери гетерозиготности – в 36.0% (9/25) информативных случаев и aberrантного метилирования – в 21.6% (11/51) наблюдений.

Таблица 2. Сравнительный анализ инактивирующих событий гена *VHL* в различных клинических группах.

Группы	Соматические мутации, (F, P)		Аллельные делеции, (F, P)		Метилирование, (F, P)		Хотя бы одно нарушение, (F, P)	
Стадии I-II	20/61	0.999	10/33	0.999	11/61	0.052	29/61	0.831
Стадии III-IV	10/32		8/24		1/32		16/32	
Без метастазов	24/78	0.551	14/48	0.443	11/78	0.683	36/78	0.403
С метастазами	6/15		4/9		1/15		9/15	
G <sub>1-2</sub>	19/70	0.072	11/42	0.196	11/70	0.282	30/70	0.092
G <sub>3-4</sub>	11/23		7/15		1/23		15/23	
T <sub>1-2</sub>	20/61	0.999	10/34	0.774	11/61	0.052	29/61	0.831
T <sub>3-4</sub>	10/32		8/23		1/32		16/32	

Примечание: F – абсолютная частота мутаций, потери гетерозиготности (аллельных делеций) и метилирования, P – вероятность нулевой гипотезы.

В целом, хотя бы одно из молекулярно-генетических нарушений *VHL* встречается у 52.9% (27/51) пациентов с I-ой стадией заболевания (51.7 % (15/29) – среди парных образцов), что свидетельствует в пользу инактивации *VHL* на ранних стадиях опухолевого процесса при светлоклеточном раке почки. Не выявлено каких-либо ассоциаций мутаций, аллельных делеций и/или метилирования с клинико-патологическими параметрами при раке почки, что подтверждает результаты одних и противоречит данным других авторов. Так, в работе Yao et al. мутации и гиперметилирование *VHL* ассоциированы с благоприятным прогнозом в послеоперационном периоде, тогда как Brauch et al. обнаружили достоверное увеличение случаев инактивации *VHL* среди пациентов с III стадией рака почки [6, 7]. В литературе при обсуждении молекулярной патологии *VHL* высказывается мнение о том, что инактивация этого гена представляет собой ранее событие в канцерогенезе светлоклеточного рака почки и не ассоциировано со стадией заболевания, чему соответствуют данные настоящего исследования [3, 9].

В проведенном исследовании повреждения гена *VHL* обнаружены примерно в половине случаев. При объяснении этого факта, помимо гетерогенности клинических образцов, целесообразно отметить следующее. По оценкам различных авторов, около 40% спорадических светлоклеточных карцином почки развиваются без ранней инактивации *VHL*, на основании чего опухоли почки условно подразделяют на *VHL*-зависимые и *VHL*-

независимые [6, 21, 22]. Помимо неодинакового статуса *VHL*, эти два вида карцином почки различаются по аллельным делециям других опухолевых супрессоров и профилям экспрессии большого числа генов [21, 22]. Следовательно, в качестве инициирующих событий канцерогенеза в *VHL*-независимых светлоклеточных карциномах могут выступать нарушения других путей регуляции клеточной пролиферации.

В настоящее время в лечении метастатического рака почки все больший акцент ставится на использовании таргетных препаратов. Некоторые из них представляют собой моноклональные антитела к специфическим антигенам светлоклеточной карциномы (CA9) или эндотелиальному сосудистому фактору роста (VEGF – Авастин, Бевацизумаб). Однако большая их часть представляет собой ингибиторы одной или нескольких тирозинкиназ, непосредственно участвующих в положительной регуляции клеточного цикла при развитии светлоклеточной карциномы. При этом опухоли с инактивацией *VHL* наиболее предпочтительны для терапии этими таргетными препаратами, т.к. многие молекулы-мишени экспрессируются в опухолевых клетках в ответ на возрастание концентрации HIF1- $\alpha$  [23]. Например, пазопаниб ингибирует VEGFR-рецепторы, сунитиниб – VEGFR и PDGFR. Один из наиболее перспективных препаратов, мультикиназный ингибитор Сорафениб (Нексавар), блокирует клеточную пролиферацию и ангиогенез в результате ингибирования протеинкиназ RAF, KIT и рецепторов VEGFR и PDGFR [24]. Определение статуса *VHL* могло бы служить в качестве дополнительного теста при выборе того или иного таргетного препарата.

Таким образом, в настоящем исследовании мутации, аллельные делеции и/или метилирование *VHL* обнаружены в 48.4% случаев sporadic светлоклеточного рака почки, а среди пациентов с I стадией заболевания – в 52.9%. Выявлено 30 соматических мутаций *VHL*, из которых 23 мутаций описаны впервые. Не обнаружено каких-либо ассоциаций мутаций, потери гетерозиготности и метилирования с клинико-патологическими параметрами заболевания. Результаты настоящего исследования могут способствовать выявлению диагностических и прогностических маркеров рака почки, например, созданию панели метилированных генов-супрессоров и оптимизации таргетной терапии.

#### Список литературы

1. Носов А.К. Клинические проявления, диагностика и стадирование рака паренхимы почки. Практическая онкология, т. 6, № 3, с. 148-155, 2005.
2. Bodmer D., Hurk W., Groningen J. et al. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. Human Molecular Genetics, vol. 11, no. 20, pp. 2489-2498, 2002.



3. Banks R.E., Tirukonda P., Taylor C. et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (*VHL*) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Research*, vol. 66, no. 4, pp. 2000-2011, 2006.
4. Maynard M.A., Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *American Journal of Nephrology*, vol. 24, pp. 1-13, 2004.
5. Linehan W.M., Walther M.M., Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *The Journal of Urology*, vol. 170, pp. 2163-2172, 2003.
6. Yao M., Yoshida M., Kishida T. et al. *VHL* tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 94, no. 20, pp. 1569-1575, 2002.
7. Brauch H., Weirich G., Brieger J. et al. *VHL* alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and novel hot spot mutation. *Cancer Research*, vol. 60, pp. 1942-1948, 2000.
8. Velickovic M., Delahunt B., Storkel S. et al. *VHL* and *FHIT* locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Research*, vol. 61, pp. 4815-4819, 2001.
9. Kim Y.W., Kaelin W.G. Role of *VHL* gene mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 22, no. 24, pp. 4991-5004, 2004.
10. Yin-Goen Q., Dale J., Yang W.L. et al. Advances in molecular classification of renal neoplasms. *Histology and Histopathology*, vol. 21, pp. 325-339, 2006.
11. Battagli C., Uzzo R.G., Dulaimi E. et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Research*, vol. 63, pp. 8695-8699, 2003.
12. Dulaimi E., Caceres I.I., Uzzo R.G. et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clinical Cancer Research*, vol. 10, pp. 3972-3979, 2004.
13. Молекулярная клиническая диагностика. Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. М.: Мир, пер. с англ., 1999, 558 с.
14. Molecular cloning: A laboratory manual (3<sup>rd</sup> ed.). Sambrook J., Russell D.W. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
15. Kuwai T., Kitadai Y., Tanaka S. et al. Mutation of the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene in human colorectal carcinoma: association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *Cancer Science*, vol. 95, no. 2, pp. 149-153, 2004.
16. Hoebeeck J., Luijt R., Poppe B. et al. Rapid detection of *VHL* exon deletions using real-time quantitative PCR. *Laboratory Investigation*, vol. 85, pp. 24-33, 2005.

17. Hattori K., Teranishi J., Stolle C. et al. Detection of germline deletions using real-time quantitative polymerase chain reaction in Japanese patients with von Hippel-Lindau disease. *Cancer Science*, vol. 97, no. 5, pp. 400-405, 2006.
18. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Protocols of National Academy of Sciences*, vol. 93, pp. 9821-9826, 1996.
19. Hoque M.O., Begum S., Topaloglu O. et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Research*, vol. 64, pp. 5511-5517, 2004.
20. Gonzalgo M.L., Eisenberger C.F., Lee S.M. et al. Prognostic significance of preoperative molecular serum analysis in renal cancer. *Clinical Cancer Research*, vol. 8, pp. 1878-1881, 2002.
21. Martinez A., Fullwood P., Kondo K. et al. Role of chromosome 3p12-p21 tumor suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *The Journal of Clinical Pathology*, vol. 53, pp. 137-144, 2000.
22. Jiang Y., Zhang W., Kondo K. et al. Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Molecular Cancer Research*, vol. 1, pp. 453-462, 2003.
23. Rathmell W.K., Wright T.M., Rini B.I. Molecularly targeted therapy in renal cell carcinoma. *Expert reviews in anticancer therapy*, vol. 5, no. 6, pp. 1031-1040, 2005.
24. Алексеев Б.Я., Шегай П.В. Таргетная терапия распространенного рака почки. *Онкоурология*, № 4, с. 6-11, 2007.