

На правах рукописи

**МИХАЙЛЕНКО Дмитрий Сергеевич**

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ,  
АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ  
НОВООБРАЗОВАНИЙ ПОЧКИ**

03.00.15 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2008 год

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики Государственного учреждения  
Медико-генетический научный центр РАМН

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
Залетаев Дмитрий Владимирович

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор  
Мякоткин Валерий Андреевич  
доктор медицинских наук, профессор  
Шахтарин Владимир Васильевич

**Ведущая организация:** НИИ канцерогенеза Государственного  
учреждения Российский онкологический  
научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

Защита состоится «    » \_\_\_\_\_ 2008 г. в \_\_\_\_ часов на заседании  
Диссертационного Совета Д.001.016.01 в ГУ МГНЦ РАМН по адресу: 115478,  
г. Москва, ул. Москворечье, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГУ МГНЦ РАМН.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета Д.001.016.01,  
доктор медицинских наук

**Зинченко Р.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Ежегодно в мире регистрируют около 200 тыс. новых случаев рака почки и почти 100 тыс. смертей от этого заболевания, что позволяет считать его одной из основных проблем современной онкоурологии. В России диагностируют до 9 тыс. случаев опухолей почки в год, более 90% которых приходится на почечно-клеточные карциномы – рак почки (РП). По темпам прироста заболеваемости РП уступает только новообразованиям предстательной и щитовидной желез [Алексеев Б.Я., 2007].

В настоящее время диагностика и прогноз РП основываются на данных инструментальных методов исследования и патоморфологических критериях, что далеко не всегда позволяет правильно оценить прогноз заболевания и возможности лечения [Yin-Goen Q., 2006]. Это обуславливает необходимость создания эффективных тест-систем для проведения своевременной лабораторной диагностики, мониторинга и определения прогноза течения РП. Необходимым этапом создания системы маркеров РП является анализ наиболее характерных и часто встречающихся молекулярно-генетических нарушений в первичных опухолях почки. В качестве таких повреждений генома опухолевых клеток могут выступать мутации, потеря гетерозиготности и аберрантное метилирование ряда генов-супрессоров.

Ген *VHL* инактивируется в большинстве случаев самого распространенного морфологического типа РП – светлоклеточного рака почки (СРП) вследствие соматических мутаций, метилирования промотора и потери гетерозиготности [Banks R.E., 2006]. Также при СРП выявляют аллельные делеции других генов-супрессоров. Вопрос о влиянии мутаций и метилирования *VHL* и делеций генов-супрессоров в области 3p (*VHL*, *RASSF1*, *FHIT*) на прогрессию первичной опухоли и прогноз заболевания остается открытым. Идентифицирован ряд генов-супрессоров, аберрантное метилирование которых наблюдается в различных морфологических типах опухолей [Lovisolo J.A., 2006]. Анализ наиболее часто метилируемых генов будет способствовать созданию системы диагностических и прогностических маркеров РП.

Опубликованы данные об исследованиях полиморфизмов различных генов при РП [Karami S., 2008]. Некоторые полиморфизмы могут представлять

интерес как потенциальные маркеры предрасположенности к спорадическому РП в популяции европейской части России или влиять на течение заболевания.

РП практически не чувствителен к лучевой и химиотерапии, поэтому хирургическое удаление опухоли является основным методом лечения РП. Определенные успехи связаны с внедрением в практику таргетных препаратов, механизм действия которых напрямую связан с генетическими нарушениями в опухолевых клетках [Costa L.J., 2007]. В связи с этим вопрос о лечении метастатического РП и местнораспространенных форм заболевания требует максимально точной оценки прогноза развития первичной опухоли, знания ее особенностей на молекулярно-генетическом уровне.

Таким образом, комплексное исследование соматических мутаций, потери гетерозиготности, метилирования 5'-регуляторных областей генов-супрессоров и полиморфных вариантов генов, задействованных в развитии РП, будет способствовать формированию системы новых молекулярно-генетических маркеров РП.

**Целью исследования** является комплексный молекулярно-генетический анализ при РП, направленный на выявление и характеристику диагностических и прогностических маркеров заболевания.

**Задачи исследования:**

1. Изучить мутации, аллельные делеции и метилирование промотора гена *VHL* и провести сравнительный анализ выявленных изменений относительно патологических параметров первичной опухоли и клинических особенностей заболевания.

2. Провести анализ потери гетерозиготности областей локализации генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* в парных образцах РП на различных стадиях заболевания и степенях дифференцировки первичной опухоли.

3. Оценить частоты aberrантного метилирования генов-супрессоров *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1* в образцах РП и провести сравнительный анализ метилирования этих генов относительно патологических параметров первичной опухоли и клинических особенностей заболевания.

4. Исследовать метилирование CpG-динуклеотидов в промоторной области гена *HOXB13*, построить карту aberrантного метилирования этого гена.

5. Определить частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *ABCB1*, *TGFBR1*, *IL10*, *VDR* в норме и у больных РП. Провести сравнительный анализ полученных данных между группами пациентов и контроля, а также между различными клиническими группами больных РП.

**Научная новизна.** Идентифицированы 33 новые мутации в гене *VHL*. Впервые исследованы сочетанные делеции генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* при СРП. Изучено метилирование 5'-регуляторных областей генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1* с помощью мультилокусной метилчувствительной ПЦР. Впервые показана ассоциация aberrантного метилирования *RASSF1* с прогрессией первичной опухоли на ранних стадиях РП ( $P = 0.047$ ). С помощью бисульфитного секвенирования построена карта метилирования промотора гена-кандидата *HOXB13* в первичных опухолях почки. С помощью нового метода – минисеквенирования с детекцией в режиме фрагментного анализа – изучены полиморфные варианты генов *ABCB1*, *TGFBR1*, *IL10* и *VDR*. Впервые в России определены в норме частоты генотипов исследуемых SNP генов *IL10* и *TGFBR1*, получены данные о возможном влиянии полиморфизмов в генах *VDR* и *TGFBR1* на развитие опухолей почки.

**Практическая значимость.** Проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование 127 первичных опухолей почки (светлоклеточных, папиллярных и хромофобных карцином). Оптимизирован метод комплексной оценки молекулярно-генетических нарушений *VHL* (соматических мутаций, aberrантного метилирования и потери гетерозиготности) при СРП. Выявлена высокая частота повреждений гена *VHL* при СРП. Разработаны системы из двух STR-маркеров для тестирования аллельных делеций в областях локализации генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* при РП. Определена ассоциация множественных аллельных делеций генов-супрессоров на 3p ( $P = 0.036$ ), а также метилирования генов *RASSF1* и *CDH1* с клинико-морфологическими характеристиками опухоли ( $P = 0.001$ ), что позволит использовать анализ этих генов в качестве маркеров прогрессии на различных стадиях РП. Результаты, полученные в представленной работе, могут быть использованы в разработке

системы молекулярно-генетических маркеров РП, в частности, определение мутаций и метилирования гена *VHL* – при оптимизации таргетной терапии.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Мутации, потеря гетерозиготности и/или метилирование гена *VHL* происходят на ранних стадиях СРП в большинстве случаев заболевания.
2. Потеря гетерозиготности двух и более генов-супрессоров, локализованных в области 3p, отражает прогрессию первичной опухоли.
3. Аберрантное метилирование является существенным механизмом инактивации генов-супрессоров *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1*, *CDH1* и наблюдается в 85% первичных почечно-клеточных карцином. Построена карта метилирования промотора гена-кандидата *HOXB13* при спорадическом РП.
4. Метилирование генов *RASSF1* и *CDH1* ассоциировано с прогрессией и метастазированием первичной опухоли, соответственно, что позволяет рассматривать их как составную часть системы молекулярных маркеров РП.

**Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации.** Все эксперименты и методики были разработаны и проведены автором лично. Автор провел статистический анализ всех полученных данных и сформулировал выводы. Описание собственных исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором самостоятельно.

**Апробация работы.** Результаты исследования были представлены на ежегодных Европейских конференциях по генетике человека в 2007-2008 гг., на конгрессах Российского общества онкоурологов в 2006-2007 гг., на Российском онкологическом конгрессе в 2007 г., конференции «Генетика в России и в мире» в 2006 г., конференции по биологии и генетике в 2007 г., конференции «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» в 2008 г., а также на межлабораторных семинарах ГУ МГНЦ РАМН. Прочитана лекция на кафедре генетики Факультета усовершенствования врачей Российского государственного медицинского университета Росздрава.

**Публикации.** Результаты диссертационной работы отражены в 14 печатных работах соискателя, в том числе, 6 статей опубликовано в журналах,

рекомендованных ВАК МОН РФ соискателям ученой степени кандидата медицинских наук.

**Внедрение результатов работы в клиническую практику.** На основании результатов проведенной работы разработаны новые медицинские ДНК-технологии «Молекулярно-генетическая методика оценки прогрессии первичной опухоли при светлоклеточном раке почки» и «Молекулярно-генетическая методика оптимизации таргетной терапии при светлоклеточном раке почки» (Разрешения на применение новой медицинской технологии ФС № 2008/150 от 22.07.2008 и ФС № 2008/152 от 23.07.2008, соответственно). Методические подходы, разработанные в диссертационной работе, используются в Межклинической лаборатории молекулярных методов диагностики ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова: анализ герминальных мутаций в гене *VHL* при диагностики синдрома Хиппеля-Линдау, определение аллельных делеций генов-супрессоров в области 3p при спорадическом РП.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста, состоит из оглавления, введения, списка сокращений, обзора литературы, подробного изложения использованных материалов и методов, описания собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы, включающего 143 ссылки. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 18 рисунками.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы опухолей почки** предоставлены Урологической клиникой им. Р.М. Фронштейна ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, ГУ МРНЦ РАМН и ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена (всего 127 образцов РП). Все случаи РП классифицированы по TNM согласно требованиям Международного противоракового союза (UICC, версия 1997 г.). Из них 53% (67/127) соответствовали I стадии заболевания, 12% (15/127) – II, 21% (27/127) – III и 14% (18/127) – IV. На момент постановки диагноза 17% (21/127) пациентов в изучаемой выборке имели метастазы в регионарных лимфатических узлах и/или отдаленные метастазы.

**Геномную ДНК** из замороженных образцов опухолей и соответствующих им участков гистологически не измененной ткани выделяли с

помощью протеиназы К с последующей фенол-хлороформной экстракцией. Архивные образцы опухолей, заключенные в парафиновые блоки, предварительно депарафинизировали с помощью ксилола и этанола.

**Мутации *VHL*** выявляли с помощью ПЦР экзонов 1-3, SSCP-анализа ПЦР-продуктов и последующего секвенирования. При анализе ДНК, полученной из парафиновых блоков, амплифицировали 3'-часть 1-го экзона.

**Для анализа потери гетерозиготности (ПГ)** генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* была разработана оригинальная система из STR-маркеров (по два микросателлитных локуса на каждый ген): D3S1317 и D3S1038 (*VHL*), D3S1568 и D3S966 (*RASSF1*), D3S1234 и D3S1300 (*FHIT*), D17S1353 и IVS1 (*TP53*). Проводили ПЦР переменных локусов, затем ПЦР-продукты разделяли в 10% денатурирующем ПААГ (IVS1-TP53 – в 8% ПААГ).

**Метилирование** генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1* определяли с помощью метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Дизайн праймеров осуществлен в настоящем исследовании с помощью программ PerlPrimer и Vector NTI. Предварительно проводили обработку геномной ДНК метилчувствительной рестриктазой BstHNI («СибЭнзим», Новосибирск).

**При подготовке к бисульфитному секвенированию** геномную ДНК обрабатывали бисульфитом натрия, который вызывает переход неметилированных остатков цитозина в урацил, но не изменяет метилированные цитозины. Дизайн метилспецифических праймеров был выполнен с помощью интерактивной программы MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>).

**ПЦР-продукты, предназначенные для секвенирования**, подвергали электрофорезу в 1%-ом агарозном геле, затем элюировали с помощью колонок Quantum Prep® Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns («Bio-Rad Laboratories»). Секвенирование проводили с использованием BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI3100 в соответствии с протоколами фирмы «Applied Biosystems».

**Мультилокусную ПЦР полиморфизмов *ABCBI*, *TGFBR1*, *IL10*, *VDR*** проводили с использованием праймеров, фланкирующих исследуемые SNP в каждом из генов (методика разработана в ходе настоящей работы). Не вошедшие в реакцию праймеры и dNTP инактивировали экзонуклеазой I из

*E.coli* и щелочной фосфатазой (“Fermentas”, Литва). Далее к ПЦР-продуктам добавляли внутренние праймеры для каждого SNP и проводили реакцию с использованием ABI Prism<sup>®</sup> SNaPshot<sup>™</sup> Multiplex Kit (“Applied Biosystems”), затем проводили обработку продуктов реакции щелочной фосфатазой. Детекцию проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”).

**Статистический анализ** частот аллелей и генотипов полиморфизмов, метилирования и ПГ проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера. Комплексный анализ встречаемости генетических нарушений в нескольких группах осуществляли при использовании критерия  $\chi^2$ .

**Программное обеспечение** для секвенированных последовательностей: Sequencing Analysis v 5.1. (“Applied Biosystems”), Chromas v.2.31. Анализ мутаций сплайсинга осуществляли с помощью программы, доступной на сайте [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). При сравнении выявленных мутаций с уже известными мутациями использовали интерактивные базы данных UMD (<http://www.umd.be:2020/>) и HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Сравнительный анализ выявленных генетических изменений в различных группах пациентов проводили с помощью программы GraphPadInStat v.3.05 и STATISTICA v. 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Изучение инактивации гена *VHL* при спорадическом раке почки**

Инактивация гена *VHL* вследствие молекулярно-генетических нарушений выявляется в большинстве светлоклеточных карцином почки, при этом влияние инактивирующих событий на развитие опухоли неоднозначно. В настоящей работе определяли мутации (рис. 1), аллельные делеции и метилирование как причины инактивации *VHL*. Мутации *VHL* были определены в 31.7% (39/123) СРП. Все выявленные мутации соматические, что, наряду с клиническими данными, позволило исключить синдром Хиппеля-Линдау и рассматривать имеющиеся образцы как выборку спорадического СРП. Среди мутаций 69.2% (27/39) составляли делеции, протяженность которых варьировала от 1 до 42 п.н., 18.0% (6/39) – инсерции, дупликации и комплексная мутация, оставшиеся 12.8% (5/39) приходятся на однонуклеотидные замены. Впервые идентифицированные мутации определены в 84.6% (33/39) образцов СРП.

Большинство делеций и инсерций, а также дупликации и комплексная мутация, составляющие 56.4% (22/39), приводили к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов.

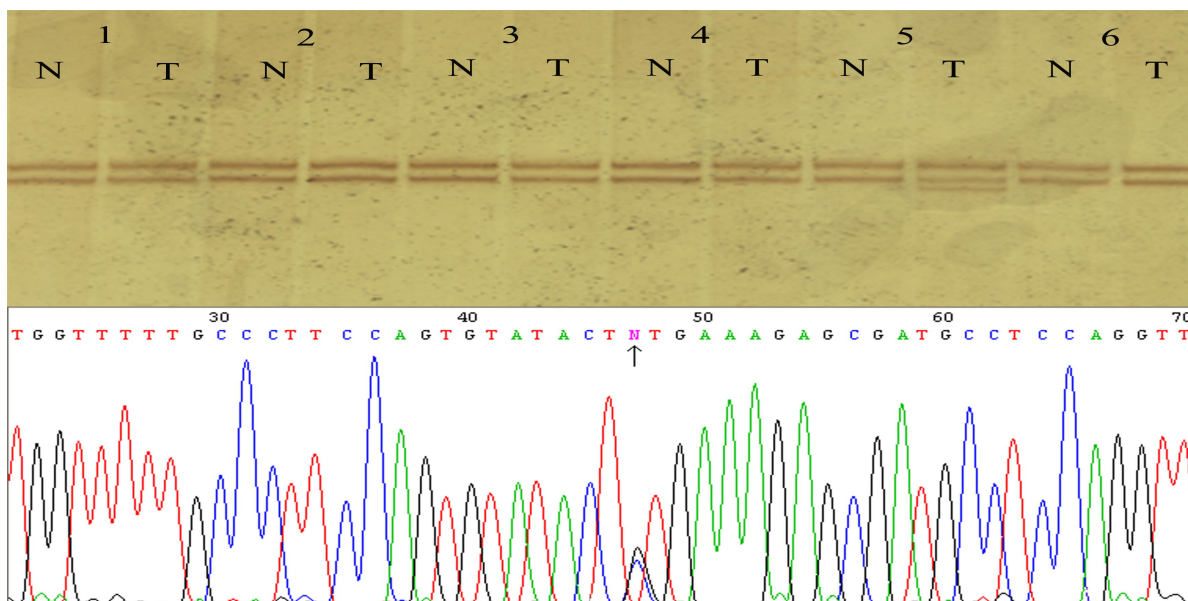


Рисунок 1. Определение мутации с.472C→G. Вверху – результат SSCP-анализа экзона 3 гена *VHL* (N и T – нормальная и опухолевая ткани, соответственно), ПЦР-продукт с аномальной подвижностью в образце 5T; секвенирование ПЦР-продукта 5T с обратного праймера, идентификация мутации.

Аллельные делеции *VHL* при СРП определяли по STR-маркерам D3S1317 и D3S1038. Проанализированы 94 образца замороженных тканей опухолей и соответствующих им образцов нормальной почечной паренхимы, взятых на расстоянии не менее 1.5 см от края новообразования. Информативность используемых микросателлитных локусов составила 47.9% (45/94) для D3S1317 и 77.7% (73/94) – для D3S1038. Система из двух STR-маркеров позволяла определять аллельные делеции в 91.5% (86/94) случаев. ПГ обнаружена в 27.9% (24/86) информативных образцов СРП.

Метилирование промотора *VHL* исследовали с помощью МЧ-ПЦР (рис. 2). Исследовали 94 парных образца тканей опухолей и почечной паренхимы, а также 29 парафиновых блоков с архивными образцами СРП (всего 123 опухоли). Метилирование промотора гена определено только в образцах СРП и не выявлено в гистологически нормальной ткани. Частота aberrантного метилирования составила 14.6% (18/123) выборки СРП.

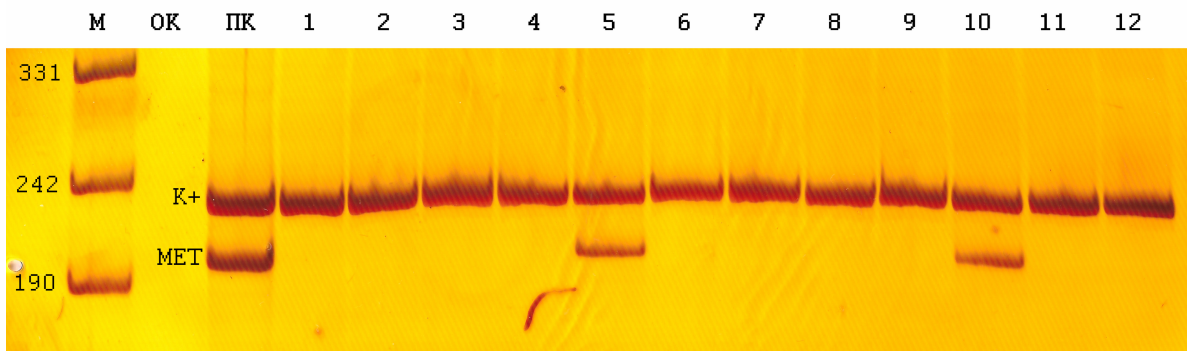


Рисунок 2. Анализ метилирования *VHL*. М – маркер молекулярной массы (pUC19/MspI, размеры фрагментов в п.н. указаны слева), ОК – отрицательный контроль амплификации, ПК – положительный контроль амплификации, К+ – внутренний контроль ПЦР (экзон 2 гена *VHL*), MET – анализируемый участок промотора *VHL*, 1-12 – анализируемые образцы опухолей. Аберрантное метилирование выявлено в образцах 5 и 10.

Сопоставлены участки CpG-островка, анализируемого в представленной работе и у других авторов. Показано, что все праймеры для метилспецифической ПЦР (МС-ПЦР) в других исследованиях локализованы внутри участка, изученного в настоящей работе. Один из праймеров всегда содержал CpG-динуклеотиды в позициях -162, -164 и -168, два из которых (-162 и -168) входят в сайты узнавания метилчувствительной рестриктазы BstHNI. Методом МС-ПЦР изучали метилирование 8 остатков цитозина в области с.-24\_-168. В настоящей работе проведен анализ метилирования с помощью МЧ-ПЦР семи CpG-динуклеотидов на том же участке. Таким образом, МЧ- и МС-ПЦР могут служить альтернативными методами определения метилирования промотора *VHL*.

У больных на I стадии СРП соматические мутации в гене *VHL* выявлены в 35.4% (23/65) случаев, ПГ – в 28.2% (11/39) информативных случаев и аберрантное метилирование – в 20.0% (13/65) образцов. В целом, хотя бы одно из нарушений гена *VHL* обнаружено у 53.8% (35/65) больных с I стадией заболевания, что свидетельствует в пользу инактивации *VHL* на ранних стадиях СРП.

Следует отметить, что инактивация *VHL* влияет не только на развитие первичной опухоли, но и может определять тактику лечения СРП. В последние 3 года в лечении метастатического СРП произошли существенные изменения, и в настоящее время это заболевание можно считать одним из наиболее удачных

примеров применения таргетных препаратов. Эти препараты представляют собой ингибиторы определенных тирозинкиназ или факторов роста, которые взаимодействуют лишь с определенными молекулами, играющими ключевую роль в развитии РП. Наиболее эффективные из них – Сутент и Нексавар, ключевые мишени которых (VEGFR 1-го и 2-го типов, PDGFR) гиперэкспрессируются в ответ на инактивацию *VHL*. Следовательно, СРП, несущий молекулярно-генетические нарушения *VHL*, может представлять собой наиболее оптимальный случай для терапии одним из этих препаратов. Выдвинутое предположение нашло подтверждение в первом исследовании, показавшем более выраженный эффект применения Сутента у пациентов с соматическими мутациями *VHL*, чем у пациентов без мутаций [Личиницер М.Р., 2007].

Таким образом, соматические мутации, ПГ и aberrантное метилирование промотора *VHL* могут рассматриваться как перспективные маркеры СРП. Указанные молекулярно-генетические нарушения присутствуют в первичной опухоли на ранних стадиях заболевания и влияют на чувствительность опухоли к таргетным препаратам.

### **Исследование аллельных делеций генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53***

Помимо *VHL*, для СРП характерны аллельные делеции других генов-супрессоров, которые могут оказывать влияние на развитие злокачественного новообразования. Для определения прогностической значимости аллельных делеций в настоящем исследовании определена ПГ областей локализации генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* (гены-супрессоры в области 3p) и *TP53* (рис. 3).

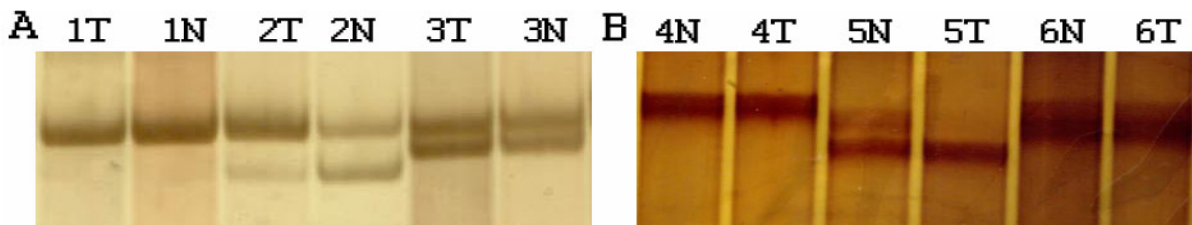


Рисунок 3. Выявление ПГ. А – результат электрофореза в 8% ПААГ пентануклеотидного повтора IVS1 гена *TP53* (Т и N – опухолевая и нормальная ткани, соответственно), 1 – гомозигота, 2 – ПГ в опухолевой ткани, 3 – нормальная гетерозигота; В – результат денатурирующего электрофореза в ПААГ микросателлита D3S1568 (образцы нанесены на гель в обратном порядке), 4 – гомозигота, 5 – ПГ в опухолевой ткани (область гена *RASSF1*), 6 – нормальная гетерозигота.

Информативность STR-локуса D3S1568 составила 58.5% (55/94), D3S966 – 62.8% (59/94), D3S1300 – 67.0% (63/94), D3S1234 – 85.1% (80/94), D17S1353 – 67.0% (63/94) и IVS1 – 61.7% (58/94), информативность и характеристики систем из двух STR-маркеров для *VHL* указаны в предыдущем разделе. Системы из двух переменных локусов позволяли определять ПГ гена *RASSF1* в 85.1% (80/94), *FHIT* – 95.7% (90/94) и *TP53* – 89.4% (84/94) случаев.

ПГ гена *RASSF1* обнаружена в 27.5% (22/80), *FHIT* – 35.6% (32/90), *TP53* – 17.9% (15/84) и, как упоминалось ранее, *VHL* – 27.9% (24/86) информативных образцов СРП. Аллельные делеции хотя бы одного гена на 3p наблюдали в 56.4% (53/94), а в совокупности из четырех исследованных генов – в 60.6% (57/94) информативных случаев.

N = 94	<i>RASSF1</i> (N* = 80)		<i>FHIT</i> (N* = 90)		<i>TP53</i> (N* = 84)		≥ 2 гена на 3p (N* = 91)	
	частота	P	частота	P	частота	P	частота	P
S <sub>I-II</sub>	21.3% (10/47)	0.203	30.2% (16/53)	0.264	18.0% (9/50)	0.999	14.8% (8/54)	0.116
S <sub>III-IV</sub>	36.4% (12/33)		43.2% (16/37)		17.6% (6/34)		29.7% (11/37)	
G <sub>1-2</sub>	23.6% (13/55)	0.287	34.4% (21/61)	0.815	16.4% (9/55)	0.766	16.4% (10/61)	0.172
G <sub>3-4</sub>	36.0% (9/25)		37.9% (11/29)		20.7% (6/29)		30.0% (9/30)	
T <sub>1-2</sub>	22.9% (11/48)	0.311	30.9% (17/55)	0.267	17.6% (9/51)	0.999	16.1% (9/56)	0.189
T <sub>3-4</sub>	34.4% (11/32)		42.9% (15/35)		18.2% (6/33)		28.6% (10/35)	
T <sub>x</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	24.2% (16/66)	0.192	31.5% (23/73)	0.158	18.6% (13/70)	0.999	<b>16.0%</b> <b>(12/75)</b>	<b>0.036</b>
N и/или M полож.	42.9% (6/14)		52.9% (9/17)		14.3% (2/14)		<b>43.8%</b> <b>(7/16)</b>	

Таблица 1. ПГ генов-супрессоров в различных клинических группах (результаты по *VHL* приведены в тексте ранее). N – объем выборки СРП, N\* - количество информативных случаев для каждого из исследуемых генов, S – стадия заболевания, G – степень дифференцировки первичной опухоли, T – размер первичной опухоли по TNM-классификации, N – метастазы в регионарных лимфоузлах, M – отдаленные метастазы.

Выявлена ассоциация аллельных делеций по двум и более генам-супрессорам, локализованным на коротком плече хромосомы 3, с наличием метастазов на момент постановки диагноза:  $P = 0.036$ ,  $OR = 1.49$  (95% CI: 1.01-2.33). Можно предположить, что ПГ нескольких генов-супрессоров на 3p связана с опухолевой прогрессией, в отличие от аллельных делеций одного из исследованных генов в области 3p или гена *TP53* (табл. 1).

Следует отметить, что в последнее время много внимания уделяют комплексным исследованиям аллельного дисбаланса (ПГ и амплификации), экспрессионному профилю генов в зонах аллельного дисбаланса и соотношению выявленных изменений с клинико-патологическими характеристиками опухоли. Выявленная в настоящей работе ассоциация множественных аллельных делеций с метастазированием первичной опухоли может быть учтена при выборе прогностических критериев спорадического СРП.

### **Изучение метилирования генов-супрессоров *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1* в опухолях почки**

В настоящем исследовании изучено метилирование 5'-регуляторных областей генов-супрессоров, локализованных в области 3p (*VHL*, *RASSF1* и *FHIT*), а также генов *SFRP1* и *CDH1*. Метилирование определено МЧ-ПЦР (рис. 3). Исследованы 98 парных образцов светлоклеточных, папиллярных и хромофобных карцином, 29 парафиновых блоков СРП. В образцах гистологически не измененной почечной паренхимы гиперметилирование генов-супрессоров не выявлено.

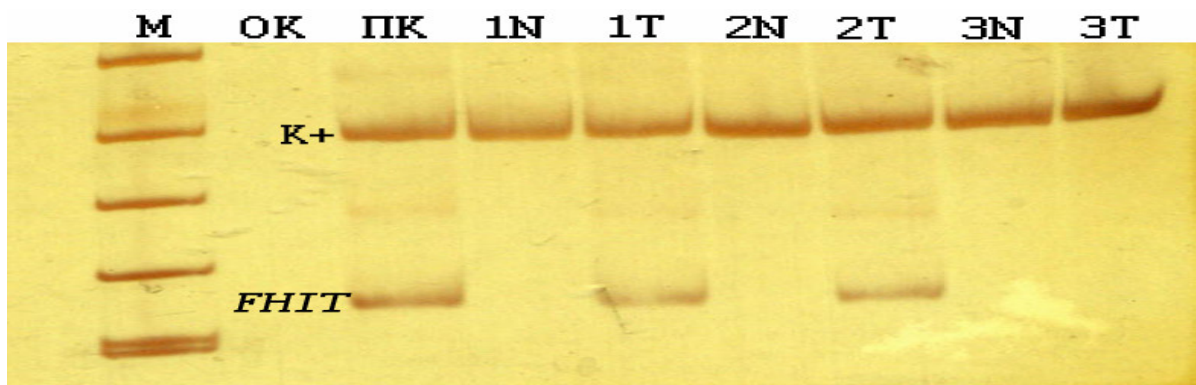


Рисунок 3. Определение метилирования генов-супрессоров (на примере *FHIT*). М – маркер молекулярной массы (pUC19/MspI), ОК – отрицательный контроль амплификации, ПК – положительный контроль амплификации, К+ – внутренний контроль ПЦР, N и T – нормальная и опухолевая ткани соответственно, 1-3 – анализируемые образцы. Аберрантное метилирование выявлено в образцах опухолей 1 и 2.

В опухолях aberrантное метилирование *VHL* определено в 14.2% (18/127), *RASSF1* – 52.8% (67/127), *FHIT* – 54.3% (69/127), *SFRP1* – 33.1% (42/127) и *CDH1* – 41.7% (53/127) случаев. Результаты, полученные методом МЧ-ПЦР, подтверждены бисульфитным секвенированием гиперметилованных образцов. В более редких, чем СРП, типах РП были метилированы гены: *RASSF1* – в 1 из 2 папиллярных карцином, *FHIT* – в 1 из 2 папиллярных и в 1 из 2 хромофобных карцином. Метилирование двух указанных генов можно рассматривать как распространенное событие в канцерогенезе опухолей почки.

В настоящем исследовании наблюдаемая частота метилирования гена *SFRP1* отличалась от данных, опубликованных ранее (33% против 68%) [Dahl E., 2007]. Это может быть объяснено различными методическими подходами в анализе CpG-островка и репрезентативностью выборок (123 светлоклеточных карциномы в настоящем исследовании и 38 – у других авторов). Частота метилирования другого исследованного в этой работе гена – *CDH1* – близка к данным литературы [Costa V.L., 2007]. Проведен сравнительный анализ частот метилирования в парных клинических группах в зависимости от стадии заболевания, степени дифференцировки первичной опухоли и метастазирования (табл. 2). Показана ассоциация метилирования *CDH1* с проращением опухолью капсулы почки ( $P = 0.024$ , OR = 2.40 95% CI: 1.13-5.08) и наличием метастазов на момент постановки диагноза ( $P = 0.001$ , OR = 5.98 95% CI: 2.03-17.59). Продукт гена *CDH1*, E-кадгерин, участвует в обеспечении контактного торможения пролиферации в эпителиальных тканях, в том числе, в эпителии почечных канальцев. Инактивацию гена *CDH1* вследствие метилирования можно рассматривать как событие, способствующее инвазивному росту и метастазированию первичной опухоли. Анализ aberrантного метилирования *CDH1* на сегодняшний день представляется одним из перспективных прогностических маркеров РП, чему соответствуют результаты настоящего исследования.

Помимо молекулярно-генетических изменений, характеризующих инвазию и метастазирование, не меньший интерес вызывают потенциальные маркеры прогрессии опухоли, которые могут быть выявлены на ранних стадиях заболевания. В работе выбраны гены-кандидаты с наибольшей абсолютной частотой метилирования (>40 образцов) на ранних стадиях РП – гены *RASSF1* и

*FHIT*. Показано, что метилирование *RASSF1* чаще встречается в умеренно-, чем в высокодифференцированных первичных опухолях ( $P = 0.047$ ,  $OR = 2.58$ , 95% CI: 1.04-6.35). Можно предположить, что метилирование *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *SFRP1* встречается в значительной доле случаев РП уже на первой стадии, тогда как с прогрессией первичной опухоли ассоциировано aberrантное метилирование *RASSF1*, которое может считаться потенциальным неблагоприятным маркером на ранних стадиях РП.

Ген	S <sub>I-II</sub> : S <sub>III-IV</sub> 82 : 45	P <sub>S</sub>	G <sub>1-2</sub> : G <sub>3-4</sub> 89 : 38	P <sub>G</sub>	T <sub>1-2</sub> : T <sub>3-4</sub> 84 : 43	P <sub>T</sub>	M- : M+ 106 : 21	P <sub>M</sub>
<i>VHL</i>	14 : 4	0.289	14 : 4	0.582	15 : 3	0.113	16 : 2	0.735
<i>RASSF1</i>	38 : 29	0.064	45 : 22	0.561	41 : 26	0.261	52 : 15	0.093
<i>FHIT</i>	46 : 23	0.710	47 : 22	0.698	47 : 22	0.707	55 : 14	0.240
<i>SFRP1</i>	22 : 20	0.051	25 : 17	0.100	23 : 19	0.073	32 : 10	0.134
<i>CDH1</i>	29 : 24	0.061	33 : 20	0.119	29 : 24	<b>0.024</b>	37 : 16	<b>0.001</b>

Таблица 2. Метилирование генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1* в парных клинических группах (указаны абсолютные частоты нарушений в каждой из групп). S – стадии заболевания, G – степень дифференцировки первичной опухоли, T – размер первичной опухоли по TNM-классификации, M – метастазы в регионарных лимфатических узлах и/или отдаленные метастазы (рядом указано количество случаев в каждой из групп). P<sub>S</sub>, P<sub>G</sub>, P<sub>T</sub>, P<sub>M</sub> – вероятности нулевой гипотезы при сравнении соответствующих парных групп.

Несмотря на то, что у большинства пациентов РП выявляют на стадии локализованного опухолевого процесса, в 20% случаев заболевание характеризуется как местнораспространенное. Основным методом лечения локализованного РП – хирургический, который может дополняться адьювантной неспецифической иммунотерапией препаратами ИЛ-2 и ИФН- $\alpha$  в случае местнораспространенного СРП с учетом соматического статуса пациента, в связи с чем особенно актуальным вопросом является оценка прогрессии первичной опухоли [Wood C.G., 2007]. Можно предположить, что исследование ПГ генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, и метилирования гена *CDH1* может быть использовано вместе с другими необходимыми тестами при назначении

адьювантной иммунотерапии после удаления первичной опухоли при местнораспространенном СРП.

В настоящее время анализ метилирования становится особенно актуальным в связи с поиском маркеров РП, выявляемых в биологических жидкостях пациента. Фрагменты ДНК опухолевых клеток попадают в кровоток, и aberrантное метилирование, специфичное для опухоли, может быть выявлено с помощью ПЦР в плазме (сыворотке) крови. Также описаны успешные примеры обнаружения aberrантного метилирования генов-супрессоров в моче пациентов. Однако применяемые методологические подходы нуждаются в повышении диагностической и аналитической чувствительности, а панели тестируемых генов – в пополнении новыми генами-кандидатами. Частота aberrантного метилирования исследованных в настоящей работе генов варьировала от 14.2 до 54.3%. Метилирование как минимум одного из исследованных генов обнаружено в 85.0% (108/127) образцов. При объединении генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1* и *CDH1*, изученных в настоящей работе, с такими генами как *CDKN2A*, *RARB2*, *PTGS2*, *CTNNB1*, представляется возможным сформировать систему маркеров метилирования с чувствительностью более 95%. Это будет способствовать развитию неинвазивной высокоинформативной диагностики РП.

#### **Метилирование гена *HOXB13* при спорадическом раке почки**

Среди новых генов-супрессоров, которые могут быть метилированы при РП, привлекает внимание ген *HOXB13*, участвующий в развитии и дифференцировке органов мочеполовой системы [Okuda H., 2006]. В настоящей работе проведено бисульфитное секвенирование промотора гена *HOXB13* в 5 образцах СРП и соответствующих им образцах гистологически не измененной ткани (рис. 4).

Показано, что в опухолях подвергаются aberrантному гиперметилированию цитозины в составе CpG-динуклеотидов, преимущественно, в позициях -139, -160, -176 и -178 от стартового кодона ATG. Можно предположить, что анализ этих четырех CpG-динуклеотидов позволит достоверно оценивать метилирование промотора *HOXB13* в опухолях почки.

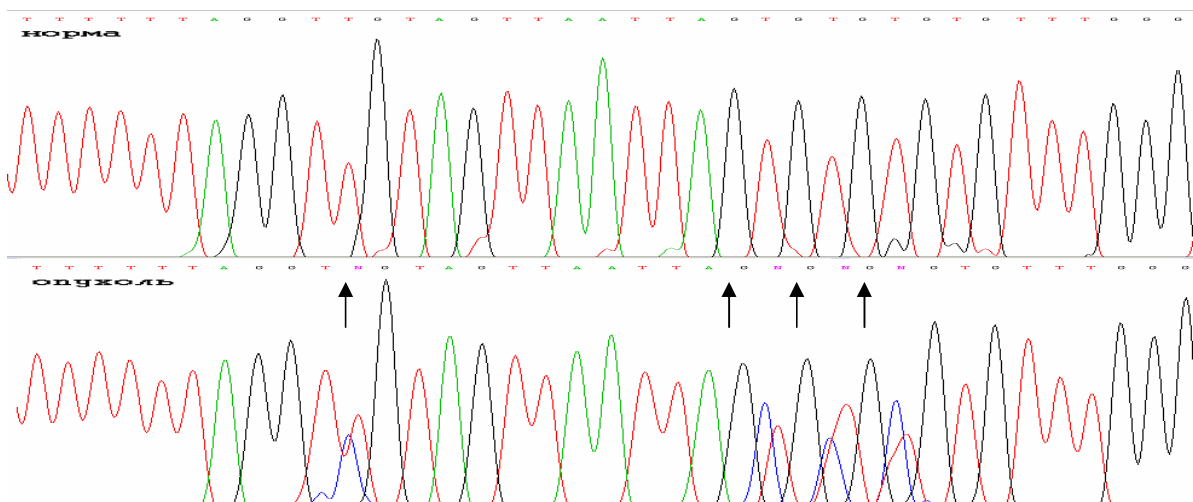


Рисунок 4. Бисульфитное секвенирование промотора гена *HOXB13* (N – позиции aberrантно метилированных цитозинов, указаны стрелками).

### **Анализ полиморфных вариантов генов *ABCB1*, *TGFBR1*, *IL10* и *VDR***

Предрасположенность к РП может быть обусловлена аллельными вариантами ряда генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, метаболизме ксенобиотиков и противоопухолевом иммунитете. Для настоящего исследования предрасположенности к РП были выбраны SNP в четырех генах – *ABCB1* (C3435T), *TGFBR1* (int7G24A), *IL10* (G-1082A) и *VDR* (Taq1). Сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах контроля и больных РП, а также в различных клинических группах пациентов, в том числе, в многофакторном анализе. Полиморфизмы анализировали с помощью минисеквенирования (рис. 5).

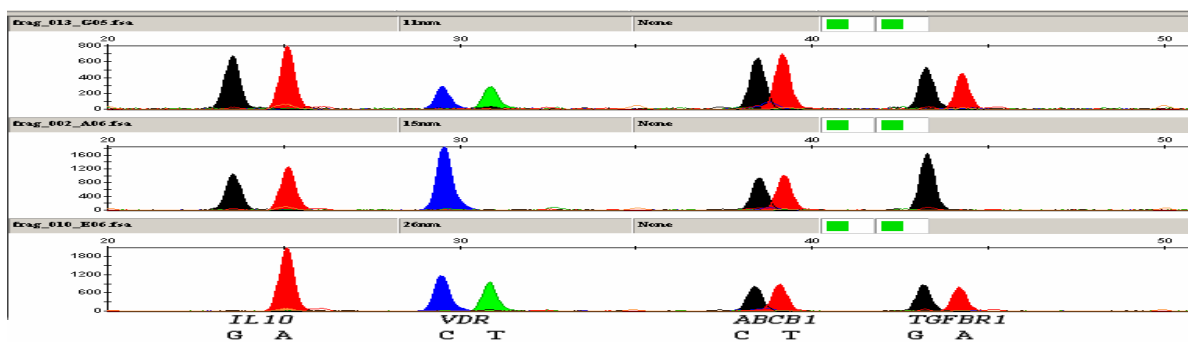


Рисунок 5. Определение полиморфизмов в генах *ABCB1*, *TGFBR1*, *IL10* и *VDR* методом минисеквенирования. Показаны три образца, позиции аллелей обозначены внизу. Генотипы *ABCB1-TGFBR1-IL10-VDR*: 1 (TC-GA-AG-TC), 2 (TC-GG-AG-CC), 3 (TC-GA-AA-TC).

В качестве популяционного контроля исследовали 151 образец ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови здоровых индивидуумов. Выборка пациентов с РП составила 98 человек, исследовали ДНК, выделенную из участков нормальной почечной паренхимы. Впервые в России определены в норме частоты генотипов исследуемых SNP гена *TGFBR1*: 56% (G/G), 40% (G/A) и 4% (A/A); *IL10*: 51% (A/G), 32% (A/A) и 17% (G/G) .

Генотип	S <sub>I-II</sub> : S <sub>III-IV</sub> 59 : 39	P <sub>S</sub>	G <sub>1-2</sub> : G <sub>3-4</sub> 66 : 32	P <sub>G</sub>	M- : M+ 83 : 15	P <sub>M</sub>
ABCB1-TC	27 : 23	0.360	36 : 14	0.338	43 : 7	0.852
ABCB1-TT	23 : 10	T: 0.999	19 : 14	T: 0.768	27 : 6	T: 0.999
ABCB1-CC	9 : 6	C: 0.196	11 : 4	C: 0.174	13 : 2	C: 0.567
TGFBR1-GG	34 : 30	0.086	39 : 25	0.115	50 : 14	<b>0.046</b>
TGFBR1-GA	23 : 7	G: 0.999	23 : 7	G: 0.300	29 : 1	G: 0.999
TGFBR1-AA	2 : 2	A: 0.055	4 : 0	A: 0.074	4 : 0	<b>A: 0.016</b>
IL10-AG	28 : 19	0.427	32 : 15	0.474	37 : 10	0.204
IL10-AA	16 : 14	A: 0.317	22 : 8	A: 0.299	26 : 4	A: 0.180
IL10-GG	15 : 6	G: 0.379	12 : 9	G: 0.487	20 : 1	G: 0.999
VDR-TT	22 : 15	0.945	24 : 13	0.537	30 : 7	0.718
VDR-TC	33 : 22	T: 0.999	39 : 16	T: 0.389	48 : 7	T: 0.999
VDR-CC	4 : 2	C: 0.999	3 : 3	C: 0.825	5 : 1	C: 0.564

Таблица 3. Полиморфные варианты генов *ABCB1*, *TGFBR1*, *IL10* и *VDR* в различных клинических группах. Обозначения: S – стадии заболевания, G – степень дифференцировки первичной опухоли, M – метастазы (рядом указано количество случаев в каждой из групп). P<sub>S</sub>, P<sub>G</sub>, P<sub>M</sub>, – вероятности нулевой гипотезы при сравнении соответствующих парных групп, в ячейках сверху указана P при сравнении частот генотипов, ниже – P при сравнении частот встречаемости определенных аллелей.

Выявлены достоверные различия частот генотипов *VDR* при РП относительно контроля (P = 0.025). В группе РП наблюдалась тенденция к увеличению частоты встречаемости аллеля Т и снижению – аллеля С (генотипа

C/C – почти в 1.85 раза). Возможно, снижение частоты протективного аллеля С и/или генотипа C/C связано с предрасположенностью к развитию РП в исследуемой популяции. Недавно опубликованы данные, подтверждающие протективную роль аллеля С в популяциях центральной и восточной Европы при наличии фактора риска – онкологических заболеваний у родственников [Karami S., 2008]. Показано, что частота аллеля А гена *TGFBR1* снижена у пациентов с регионарными и/или отдаленными метастазами  $P = 0.012$ ,  $OR = 0.804$  (95% CI: 0.724-0.893). Достоверно уменьшена в группе больных с метастазами и частота встречаемости этого аллеля в составе гомо- и гетерозиготных носителей (табл. 3). Полученные результаты способствуют формированию системы прогностических маркеров для sporадического РП.

Настоящая работа представляет собой комплексное исследование инактивации гена *VHL*, ПГ генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53*, aberrантного метилирования генов *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1*, *CDH1* и *HOXB13*, а также полиморфизмов в генах *ABCBI*, *TGFBR1*, *IL10* и *VDR* при РП. Проведен сравнительный анализ выявленных в первичных опухолях молекулярно-генетических нарушений между группами пациентов, которые были сформированы в зависимости от стадии заболевания, наличия метастазов, степени дифференцировки первичной опухоли. Нарушения в гене *VHL* выявлены у 54% пациентов на I стадии СРП, что указывает на раннюю инактивацию *VHL* при этом заболевании. Следует отметить, что определение мутаций и метилирования *VHL* целесообразно использовать при оптимизации таргетной терапии у больных метастатическим СРП. Получены результаты, указывающие на возможность использования метилирования *CDH1* и ПГ генов-супрессоров на 3p в качестве прогностических маркеров sporадического РП. Построена карта метилирования нового гена-супрессора *HOXB13*. Выявлена ассоциация полиморфных вариантов *VDR* и *TGFBR1* с развитием заболевания.

Поиск и характеристика молекулярно-генетических маркеров, выполненные в настоящем исследовании, вместе с изучением потенциальных иммуногистохимических и биохимических особенностей почечно-клеточных карцином, позволят сформировать систему диагностических и прогностических маркеров РП. На сегодняшний день, проведение молекулярно-генетических

исследований, направленных на поиск маркеров злокачественных новообразований, представляет собой одну из приоритетных задач молекулярной медицины.

## ВЫВОДЫ

1. Соматические мутации, потеря гетерозиготности и метилирование гена *VHL* выявлены у 54% пациентов на первой стадии СРП, что указывает на раннюю инактивацию *VHL* при этом заболевании. Впервые идентифицированы 33 новые мутации *VHL*.
2. Аллельные делеции двух и более генов-супрессоров (*VHL*, *RASSF1*, *FHIT*), локализованных на коротком плече хромосомы 3, ассоциированы с наличием метастазов на момент постановки диагноза ( $P = 0.036$ ), что может отражать прогрессию первичной опухоли.
3. Абберрантное метилирование 5'-регуляторных областей гена *VHL* составляет 14%, *RASSF1* – 53%, *FHIT* – 54%, *SFRP1* – 33% и *CDH1* – 42% случаев РП. Метилирование хотя бы одного из исследованных генов происходит в 85% случаев рака почки. Метилирование *CDH1* ассоциировано с прорастанием опухоли капсулы почки ( $P = 0.024$ ) и наличием метастазов на момент постановки диагноза ( $P = 0.001$ ). Метилирование *RASSF1* чаще встречается в умеренно-, чем в высокодифференцированных первичных опухолях ( $P = 0.047$ ). Метилирование *RASSF1* и *CDH1* может служить в качестве неблагоприятного прогностического маркера на различных стадиях РП.
4. Построена карта метилирования CpG-островка гена *HOXB13* при СРП. Абберрантному метилированию, преимущественно, подвергаются цитозины в позициях -139, -160, -176 и -178 от стартового кодона АТГ, что может быть использовано при определении частоты метилирования *HOXB13* в опухолях почки.
5. Частоты генотипов исследуемых SNP гена *TGFBR1* в норме составляют 56% (G/G), 40% (G/A) и 4% (A/A); *IL10* – 51% (A/G), 32% (A/A) и 17% (G/G). Частоты генотипов *VDR* при РП достоверно отличаются от контроля ( $P = 0.025$ ). У больных РП с метастазами уменьшена частота встречаемости аллеля А гена *TGFBR1* ( $P = 0.016$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В настоящей работе получены данные об инактивации гена *VHL* на различных стадиях рака почки, выявлены ассоциации множественных аллельных делеций генов-супрессоров в области 3p и метилирования генов *RASSF1* и *CDH1* с прогрессией первичной опухоли, причем aberrантное метилирование как минимум одного из исследованных генов наблюдалось в 85% случаев рака почки. Комплексный анализ полученных данных и сопоставление их с данными из литературных источников позволили предложить практические рекомендации по использованию некоторых результатов настоящей диссертационной работы в клинической практике:

1. Определение потери гетерозиготности генов *VHL*, *RASSF1* и *FHIT* вместе с исследованием метилирования промоторной области *CDH1* в материале первичной опухоли целесообразно проводить наряду с патоморфологическим исследованием при оценке прогноза РП.
2. Исследование соматических мутаций и метилирования гена *VHL* как комбинированный молекулярно-генетический анализ рекомендуется осуществлять для оптимизации таргетной терапии СРП при использовании мультикиназных ингибиторов, связанных с патогенетическим путем инактивации *VHL*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Д.С. Михайленко**, М.В. Немцова. Молекулярно-генетические маркеры рака почки // **Российский онкологический журнал**. – 2007. – № 4. – С.48-51.
2. **Д.С. Михайленко**, Р.В. Курынин, А.М. Попов, О.Б. Карякин, М.Э. Еникеев, Ю.Г. Аляев, М.В. Немцова, Д.В. Залетаев. Инактивация гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном раке почки // **Молекулярная биология**. – 2008. – Т.42. – №1. – С.71-77.
3. **Михайленко Д.С.**, Попов А.М., Курынин Р.В., Аляев Ю.Г., Завалишина Л.Э., Залетаев Д.В. Анализ молекулярно-генетических нарушений в генах *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* при светлоклеточном раке почки // **Медицинская генетика**. – 2008. – № 4. – С. 9-14.

4. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В., Бабенко О.В., Пальцева Е.М., Землякова В.В., Кузнецова Е.Б., Кекеева Т.В., **Михайленко Д.С.**, Манохина И.К. Эпигенетические маркеры в диагностике онкозаболеваний // **Молекулярная медицина.** – 2008. – №4. – С.46-51.
5. Курынин Р.В., **Михайленко Д.С.**, Залетаев Д.В., Аляев Ю.Г. Молекулярные маркеры в диагностике и лечении рака почки // **Молекулярная медицина.** – 2008. – №4. – С.24-28.
6. М.В. Немцова, **Д.С. Михайленко**, Т.В. Кекеева, О.А. Кузнецова, С.В. Башкатов, Р.В. Курынин, А.М. Попов, О.П. Попова, П.В. Шегай, Ю.Ю. Андреева, Б.Я. Алексеев, М.Э. Еникеев, Ю.Г. Аляев, О.Б. Карякин, И.Г. Русаков, Г.А. Франк, Д.В. Залетаев. Молекулярно-генетические маркеры в онкоурологии // **Молекулярная медицина.** – 2007. – №3. – С.43-54.
7. **Д.С. Михайленко**, А.М. Попов, Р.В. Курынин, О.Б. Карякин, К.Н. Сафиуллин, Е.Ф. Лушников, С.Д. Фомин, Ю.Г. Аляев, В.А. Григорян, М.Э. Еникеев, Д.В. Залетаев. Структурно-функциональные изменения генов-супрессоров короткого плеча хромосомы 3 при спорадическом светлоклеточном раке почки // Тезисы I-го конгресса Российского общества онкоурологов, Москва, Россия. – 2006. – С.150.
8. **Михайленко Д.С.**, Курынин Р.В., Попов А.М., Еникеев М.Э., Григорян В.А., Аляев Ю.Г., Карякин О.Б., Залетаев Д.В. Изучение потерь гетерозиготности в областях локализаций генов VHL, RASSF1 и FHIT при светлоклеточном раке почки // Сборник тезисов международной конференции «Генетика в России и в мире», Москва, Россия. – 2006. – С.126.
9. **Д.С. Михайленко**, Р.В. Курынин, А.М. Попов, М.Э. Еникеев, Ю.Г. Аляев, О.Б. Карякин, Л.Э. Завалишина, Г.А. Франк, Д.В. Залетаев. Поиск молекулярно-генетических маркеров светлоклеточного рака почки // Тезисы II-го конгресса Российского общества онкоурологов, Москва, Россия. – 2007. – С.133.
10. **Д.С. Михайленко**, Р.В. Курынин, А.М. Попов, М.Э. Еникеев, Ю.Г. Аляев, О.Б. Карякин, Л.Э. Завалишина, Г.А. Франк, Д.В. Залетаев. Молекулярно-генетический анализ инактивации гена VHL при спорадическом

светлоклеточном раке почки // Тезисы XI-го Российского онкологического конгресса, Москва, Россия. – 2007. – С.226.

11. **Михайленко Д.С.** Поиск молекулярно-генетических маркеров прогрессии светлоклеточного рака почки. Тезисы докладов конференции «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2008. - №6. – С.297.
12. **D. Mikhaylenko**, R. Kurynin, A. Popov, O. Karyakin, M. Enikeev, Y. Alayev, M. Nemtsova, D. Zaletayev. Inactivation of the VHL gene in sporadic clear cell renal cancer. Abstract of European Human Genetics Conference, Nice, France // European Journal of Human Genetics. – 2007. – Vol.15. – Suppl.1. – P.173.
13. **D.S. Mikhaylenko**, R.V. Kurynin, A.M. Popov, D.V. Zaletayev. Molecular genetic aberrations of the genes VHL, RASSF1, FHIT in patients with renal cancer. Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, Kyiv, Ukraine // Abstract book. – 2007. – P.177.
14. **D.S. Mikhaylenko**, A.M. Popov, R.V. Kurynin, D.V. Zaletayev. Analysis of the molecular-genetic alterations in the genes VHL, RASSF1, and FHIT in clear cell renal carcinomas. Abstract of European Human Genetics Conference, Barcelona, Spain // European Journal of Human Genetics. – 2008. – Vol. 16. – Suppl.2. – P.235.