

На правах рукописи

Цой Лариса Валерьевна

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

14.03.02 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Варшавский Владимир Анатольевич

Научный консультант:

Доктор биологических наук, доцент

Замятнин Андрей Александрович

Официальные оппоненты:

Карселадзе Аполлон Иродионович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, патологоанатомическое отделение отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей, главный научный консультант

Макарова Ольга Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», лаборатория иммуноморфологии воспаления отдела патологической морфологии, заведующий лабораторией

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «17» мая 2021 года в 14:00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991 Москва, Трубецкая ул., д.8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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 (Siegel, 2018).

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 (Rawla, 2019).

Доля рака предстательной железы в структуре заболеваемости мужского населения России 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% (Axel, 2019).

Таким образом, ранняя диагностика РПЖ и ПКР является актуальной. Для решения этого вопроса, в настоящее время большое значение имеет поиск новых молекулярных 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. (Are, 2013).

К антигенам, которые могут аберрантно экспрессироваться в клетке 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. (А. М. Dizhoor, 1993) (Polans, 1991). 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.

Некоторые виды CRA были признаны опухолеспецифическими антигенами (Bazhin, 2004).

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 (Gurevich, 2006) (Peterson, 2017).

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). Arr-1 может быть классифицирован как CRA (Potter, 1999).

Рековерин (Rec) - Ca²⁺-связывающий белок позвоночных животных с молекулярной массой 23,3 кДа, состоящий из 201 аминокислотного остатка (A. Dizhoor, 2006) (Lambrecht, 1991). В норме рековерин локализован в фоторецепторных клетках сетчатки глаза, где Ca²⁺-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 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 рековерина 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 раке 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.

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

Теоретическая и 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.

Методология и методы исследования. Представленная на защиту научно-исследовательская работа выполнена с соблюдением этических норм и принципов доказательной медицины. Методология 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 диагностические методы обследования пациентов.

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).

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.

Личный вклад автора. Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе автора, получены ею самостоятельно на базе ЦПАО клинического центра и НИИ молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления диссертационного исследования. Планирование работы, поиск и анализ литературы по теме диссертации, набор материала, формирование базы данных, статистическая обработка, обобщение и анализ полученных результатов, формулировка выводов, написание статей и диссертации выполнены лично автором. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от определения цели и постановки задач до реализации исследования, анализа результатов и предложения практических рекомендаций

Апробация результатов работы. 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 международными базами SCOPUS, в том числе 2 статьи в Web of Science.

Объём 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.

Содержание работы

Материалы и методы

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.

Гистологическое исследование проводилось на срезах, толщиной 3-4 мкм. Изучение препаратов проводилось на световом микроскопе Leica DM2000. Цифровые изображения гистологических срезов получали посредством сканирования на Aperio ScanScore CS2 с объективом x20, разрешением 0,50 мкм/пикс.

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 (Epstein, 2016) 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 (Moch, 2016).

Иммуногистохимическое исследование с антителами к RCC, Vimentin, CD10, PAX8, CK7, EMA, E-cadherin, S100A, AMACR (P504S), PSA, PSAP, p63 проведено по стандартной методике, описанной в протоколе фирмы-производителя, при помощи автоматизированного иммуногистостейнера Leica Bond Max (Германия).

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

Антитела к реверину 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).

Электронномикроскопическое исследование было проведено на ультратонких срезах, приготовленных по стандартной методике. Изучение готовых препаратов выполнялось на электронном микроскопе Philips TECNAI 12 Bio Twin D-265 (FEI Company, Голландия).

Генетическое исследование проводилось на базе института молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (директор института д.б.н., профессор Андрей Александрович Замятнин), при помощи метода бисульфитного секвенирования.

Иммунологическое исследование сыворотки крови осуществлялось на базе института молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Получение сыворотки крови пациентов выполнено по стандартной методике. Далее выделились ААА-1 и ААР при помощи Western blot.

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 (М) и стандартных отклонений (σ). В случае отсутствия нормального распределения переменных, в описательной статистике использовались медиана (Me) и квартили (Q25, Q75).

Использовались критерий Шапиро-Уилка, t-критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни, критерий χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность, точный критерий Фишера, критерий V Крамера, коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент корреляции Спирмена.

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

Для оценки степени влияния факторных признаков на результативные производили оценку отношения шансов с расчетом доверительных интервалов (ДИ).

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

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологическая характеристика

При светооптическом исследовании опухолей почек (n=121, 100%) были диагностированы следующие гистологические варианты: онкоцитомы (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

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» (Bankhead, 2017) 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% (рис. 1а), 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 (рис. 1б), 66,7% для папиллярного ПКР (рис. 1в), 75,0% для хромофобного ПКР (рис. 1г).

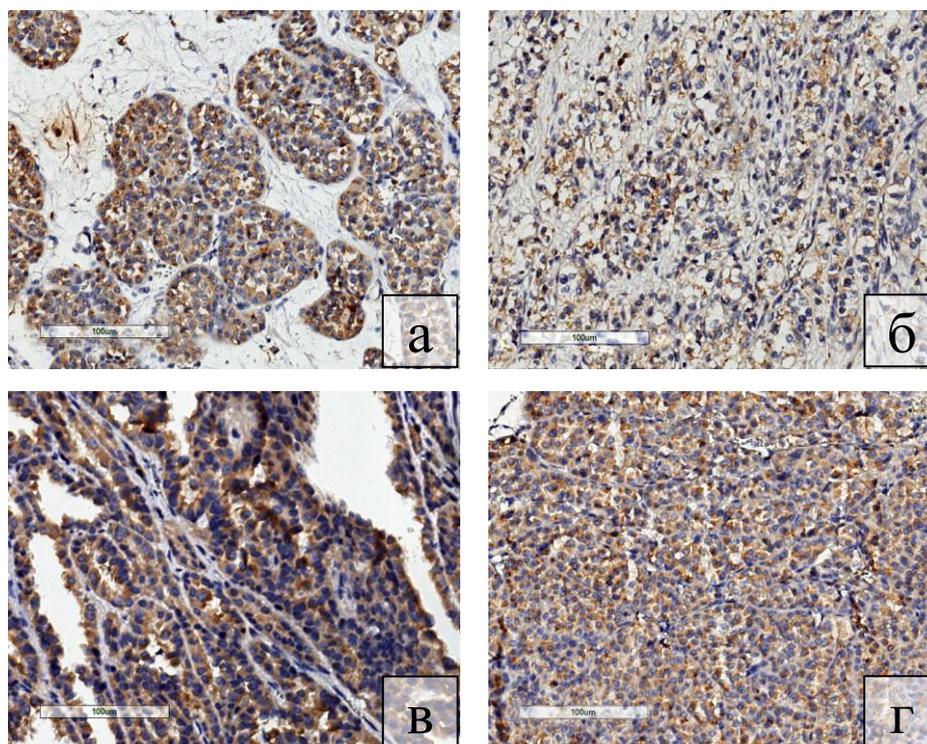


Рисунок 1. ИГХ исследование с антителами к Arr-1, x200: а – онкоцитомы; б – светлоклеточный ПКР; в – папиллярный ПКР; г – хромофобный ПКР.

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 реверина было обнаружено, что в группах с одинаковым гистологическим типом опухолей почек есть как Res-позитивные, так и негативные образцы.

Позитивная реакция с антителами к Res наблюдалась в 69,4% опухолей почек. При этом в онкоцитомах абберрантная экспрессия реверина наблюдалась чаще, в 94,1% случаев, по сравнению с экспрессией в группе ПКР (65,4%) (рис. 2а).

Соотношение Res-положительных образцов каждого оцениваемого подтипа ПКР составляло: 68,6% в группе светлоклеточных ПКР (рис. 2б), 72,2% в группе папиллярных ПКР (рис. 2в), 43,7% в группе хромофобного ПКР (рис. 2г).

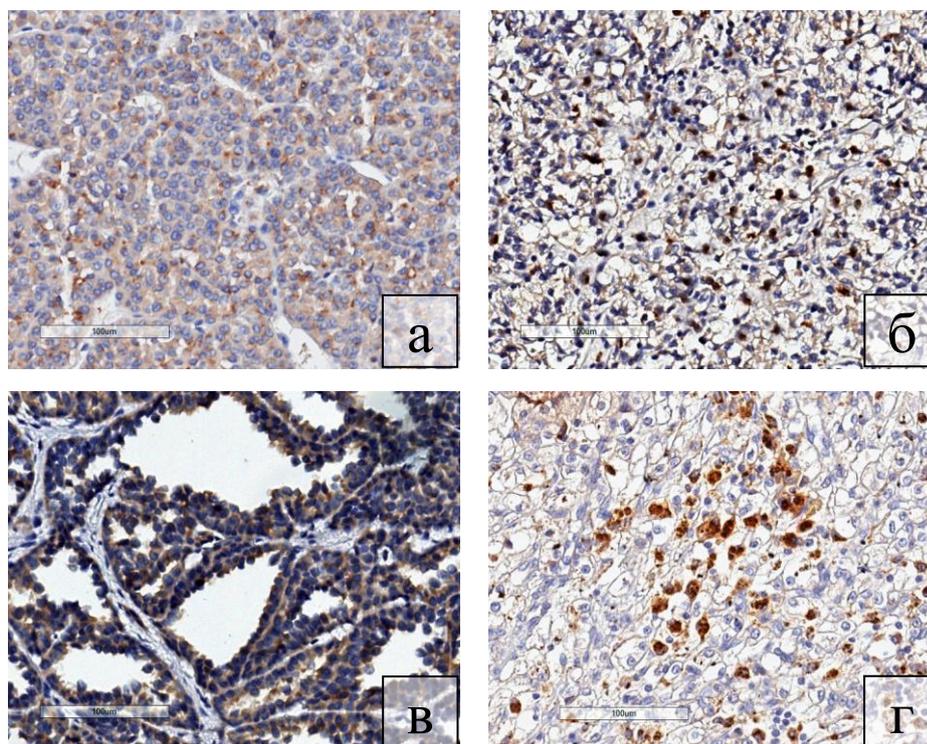


Рисунок 2. ИГХ исследование с антителами к Res, x200: а – онкоцитома; б – светлоклеточный ПКР; в – папиллярный ПКР; г – хромофобный ПКР.

При статистической обработке данных было отмечено, что частота положительной экспрессии реверина 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 Ang-1 и Res как в ткани первичных опухолей, так и в ткани метастазов. Отмечался сходный с первичными опухолями иммуногистохимический профиль: если в первичных опухолях наблюдалась

положительная экспрессия Rec и/или Arg-1, то в соответствующих им метастазах также наблюдалась 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.

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 АМАСР 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 АМАСР наблюдалась в 81,3% опухолей (n=13) и во всех случаях ацинарной аденокарциномы отмечалось исчезновение экспрессии рб3 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. (табл. 1).

Таблица 1. 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		

Для данной модели коэффициент детерминации (R²) 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%. По результатам построения ROC-кривой показатель AUC составил 0,691±0,058 (ДИ 95% 0,578-0,804; p=0,002), что указывает на среднее качество прогностической модели (рис. 3а).

Из остальных маркеров статистически значимыми предикторами в регрессионных моделях показали себя экспрессия CD10 для аррестина-1 (табл. 2) и экспрессия СК7 для рековерина. Но модель прогнозирования экспрессии рековерина на основании СК7 имела недостаточную статистическую значимость по результатам ROC-анализа из-за отсутствия специфичности.

Таблица 2. 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%. 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 (рис. 3б).

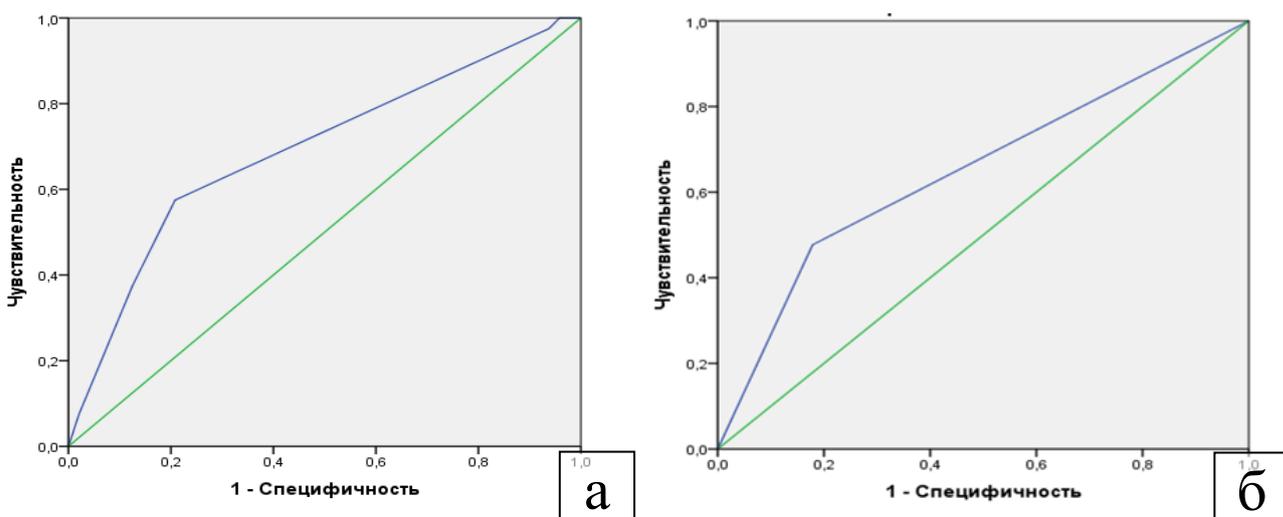


Рисунок 3. ROC-кривая прогнозирования экспрессии аррестина-1: а – на основании характеристик опухоли почки; б – на основании экспрессии CD10.

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 Arg-1 и Res-позитивных хромофобных ПКР было 6, негативных – 4; Arg-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 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 Arg-1 и Res –позитивных опухолей обнаружено не было ни в случаях хромофобного ПКР, ни в случаях онкоцитом.

Иммунологическое исследование сыворотки крови

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 (Desmetz, 2011). К тому же даже низкого уровня опухолеспецифических антигенов достаточно для развития выраженного гуморального ответа иммунной системы против данного антигена.

Таким образом, обнаружение экспрессии Arg-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 15 образцов сыворотки больных с мочекаменной болезнью (контрольная группа).

В контрольной группе AAA-1 и AAR найдены не были (n=15, 100%). 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 (табл. 3).

Таблица 3. Частота обнаружения AAA-1 в крови пациентов с опухолью почек.

	Группы наблюдения		p	Cramer's V
	Есть AAA1 (n=84)	Нет AAA1 (n=37)		
Онкоцитомы	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 AAA-1 в сыворотки 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 пациента были положительными по экспрессии Arg-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 Arg-1 в опухоли.

При проведении вестерн блот анализа на наличие AAR, 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.

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, раннее в литературе встречалось описание дифференциального метилирования диссеминированных CpG-пар в промоторах тканеспецифических экспрессирующих генов (например, в промоторе гена инсулина (Kuroda, 2009)).

В данной работе был проведен анализ статуса метилирования отдельных CpG пар в промотерном 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 (Wang, 2012). 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 (n=10) 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 (табл. 4).

Таблица 4. Статус метилирования локусов -1891 до -1627 промотера SAG у пациентов со светлоклеточным ПКР

	Аррестин-1-позитивные			Аррестин-1-негативные		
	С/С ¹	С/Т ²	Т/Т ³	С/С	С/Т	Т/Т
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%)		

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

¹ С/С – Биаллельное метилирование

² С/Т – Моноаллельное метилирование

³ Т/Т – Деметилирование

также самого первого экзона, вовлечено в механизмы регуляции aberrантной экспрессии в тканях меланомы и рака легких (Bazhin, 2010).

Несмотря на наличие большого количества работ, демонстрирующих aberrантную 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 aberrантное гипометилирование гена RCVRN участвует в его aberrантной экспрессии при меланоме и раке легких (Bazhin, 2010).

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 (n=10) 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 ($p>0,05$) (табл. 5).

Таблица 5. Экспрессия рековерина в опухолях и статус метилирования промотера 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%)

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 Arg-1 и Res 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 Arg-1 и Rec наблюдается у пациентов с онкоцитомой. При этом ни Arg-1, ни Rec не могут быть использованы в диагностике РПЖ, так как экспрессии данных белков в тканях не наблюдалось.
2. Аберрантная экспрессия Arg-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 значимым предиктором ($p < 0,05$) для экспрессии аррестина-1 и рековерина является гистологический тип опухоли. Для прогнозирования экспрессии аррестина-1 значимыми являются 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 Arg-1 и Rec в опухолях почки не связан с изменением статуса метилирования гена SAG и RCVRN.
5. Не обнаружено значимых различий в частоте экспрессии Arg-1 и Rec при доброкачественных и злокачественных опухолях почек. Arg-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Цой Л. В.**, Ходулапов А. В. Рековерин как молекулярный маркер опухолей почки // Материалы III Молодежного медицинского форума «MedWAYS – перспективные научные направления-2014». – Москва, 2014. – С. 86.
2. **Цой Л. В.**, Ходулапов А. В. Экспрессия рековерина в опухолях почки // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Медицинская весна-2015» посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. – 2015. – С. 466-467.
3. **Цой Л. В.** Рековерин как перспективный молекулярный маркер опухолей почки // Сборник статей V международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки XXI века» (15.12.2015г.). – Москва, 2015. – Ч. 1 – С. 101-103.
4. Marina O. Golovastova, **Larisa V. Tsoy**, Anna V. Bocharnikova, Dmitry O. Korolev, Olga S. Gancharova, Ekaterina A. Alekseeva, Ekaterina B. Kuznetsova, Lyudmila V. Savvateeva, Elena E. Skorikova, Vladimir V. Strelnikov, Vladimir A. Varshavsky, Andrey Z. Vinarov, Vladimir N. Nikolenko, Peter V. Glybochko, Evgeni Yu. Zernii, Andrey A. Zamyatnin Jr., Alexandr V. Bazhin & Pavel P. Philippov. The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors // **Tumor Biology**. – 2016. – V. 37. – № 7. – P. 9899-9907. – DOI: 10.1007/s13277-016-4885-5.
5. **Л. В. Цой**, А. В. Ходулапов. Экспрессия рековерина в опухолях почки // Сборник тезисов XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской медицинской конференции студентов и молодых ученых. – Москва, 2016. – С. 334.
6. Marina O. Golovastova, Dmitry O. Korolev, **Larisa V. Tsoy**, Vladimir A. Varshavsky, Wan-Hai Xu, Andrey Z. Vinarov, Evgeni Yu. Zernii, Pavel P. Philippov, Andrey A. Zamyatnin Jr. Biomarkers of renal tumors: the current state and clinical perspectives // **Current Urology Reports**. – 2017. – V. 18. № 1 – P. 3 – DOI: 10.1007/s11934-017-0655-1.
7. **Цой Л. В.** Диагностика опухолей почек с помощью молекулярных маркеров паранеопластических антигенов (рековерин) // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов с международным участием. – Челябинск, 2017. – С. 348-349.
8. Е. С. Сирота, Е. А. Безруков, Ю. В. Лернер, В. А. Варшавский, **Л. В. Цой**. Результаты морфологического исследования опухолей паренхимы почки при органосохраняющих операциях у пациентов в возрасте до 40 лет // Сборник тезисов 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. – С. 65-66.

9. **Л. В. Цой**, А. А. Замятнин, А. Н. Гришина, В. А. Варшавский. Аутоантитела против аррестина-1 в качестве потенциального маркера почечно-клеточного рака // Сборник тезисов 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. – С. 79-80.
10. **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 – № 6. – С. 48-53.

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;

C – цитозин;

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

СК – цитокератин;

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

G – гуанин;

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

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

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;

T – тимин;

Vim – виментин;

ДИ – доверительный интервал;

ОШ – отношение шансов;

ПКР – почечно-клеточный рак;

ПНА – паранеопластический антиген;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РПЖ – рак предстательной железы.