

Применение метода флуоресцентной гибридизации *in situ* на клетках осадка мочи для диагностики рака мочевого пузыря и его рецидивов

И.Е. Воробцова, З.Ж. Васильева, М.И. Школьник, Д.А. Тимофеев,
М.В. Одинцова, М.У. Гаппоев, А.И. Урбанский, М.И. Карелин

Национальный центр онкологии, Баку, Азербайджанская Республика

Контакты: Дмитрий Александрович Тимофеев d-tim@mail.ru

Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) определяли наличие опухолевых клеток в осадке мочи пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря (РМП). Для этого использовали набор флуоресцентных ДНК-зондов (UroVysion), позволяющих в слущенных клетках выявлять характерные для РМП цитогенетические аномалии — гиперплоидию по 3-, 7- и 17-й хромосомам и делецию 9p21 локуса. Обследованы 28 больных с первичным диагнозом РМП и 12 пациентов на предмет выявления рецидивов, а также 3 человека, не имевших РМП. Полученные данные сравнивали с результатами цистоскопического обследования больных после забора образцов мочи. Чувствительность UroVysion-теста суммарно для всех стадий первичного рака (pT1–pT4) составляла $78,5 \pm 9,7\%$, для ранней стадии pT1 — $87,5 \pm 1,6\%$, а для рецидивов РМП — 100%. Преобладающим типом цитогенетических нарушений в слущенных опухолевых клетках была гиперплоидия. Среди аномальных клеток чаще всего встречались варианты гиперплоидии (три-, тетрасомия) по 3-й и реже всего — по 7-й хромосомам. Таким образом, UroVysion-тест — неинвазивный высокочувствительный метод, который может применяться в клинике для улучшения диагностики РМП, выявления рецидивов и контроля эффективности лечения.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, диагностика рака мочевого пузыря

Use of fluorescence *in situ* hybridization assay on urine sediment cells to diagnose urinary bladder cancer and its recurrences

I.E. Vorobtsova, Z.Zh. Vasilyeva, M.I. Shkolnik, D.A. Timofeev, M.V. Odintsova, M.U. Gappoev, A.I. Urbanskiy, M.I. Karelin
Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assay was used to detect tumor cells in the urine sediment of patients diagnosed as having urinary bladder cancer (UBC). For this, the investigators applied a fluorescence DNA probe kit (UroVysion) that could reveal the cytogenetic abnormalities characteristic for UBC, such as hyperploidy for chromosomes 3, 7, and 17 and deletion of the 9p21 locus, in the cast-off cells. Twenty-eight patients with the primary diagnosis of UBC, 12 with its suspected recurrence, 3 subjects without UBC were examined. The findings were compared with cystoscopic data after urine samples were taken. The sensitivity of the UroVysion test totaled $78.5 \pm 9.7\%$ for all stages of primary cancer (pT1–pT4), $87.5 \pm 1.6\%$ for its early stage (pT1), and 100% for UBC recurrences. Hyperploidy was a predominant type of cytogenetic abnormalities in the cast-off tumor cells. Among the abnormal cells, the types of hyperploidy (tri-, tetrasomy) were most common for chromosome 3 and less for chromosome 7. Thus, the UroVysion test is a noninvasive highly sensitive tool that may be used in clinical practice to improve the diagnosis of UBC, to detect recurrences, and to monitor the efficiency of treatment.

Key words: urinary bladder cancer, fluorescence *in situ* hybridization assay, diagnosis of urinary bladder cancer

Введение

По эпидемиологическим данным, уротелиальная карцинома (УК) по сравнению с другими видами злокачественных новообразований встречается редко и составляет 4 и 1% всех опухолей у мужчин и женщин соответственно. В 90% случаев опухоль локализуется в мочевом пузыре и в 10% — в верхних отделах мочевыводящих путей. Факторами риска являются курение, вредные производственные вещества (анилиновые красители, резина), длительно текущие или

хронические воспалительные заболевания мочевыводящих путей, предшествующая химиотерапия циклофосфамидом, облучение.

Существует 2 типа УК — папиллярная (75–80% случаев) и плоская, или карцинома *in situ* (20–25%). Первая имеет тенденцию к рецидивированию, но редко переходит в инвазивную форму, вторая — агрессивна и быстро превращается в мышечно-инвазивный рак. В связи с этим своевременная диагностика этого заболевания имеет принципиальное

значение для адекватного лечения и, как следствие, для судьбы пациента.

Основным методом диагностики рака мочевого пузыря (РМП) служит цистоскопия с последующим гистологическим исследованием биоптатов. Метод считается «золотым стандартом», однако имеет ряд недостатков. Он является инвазивным, процедура обследования больного болезненна и травматична. Кроме того, сравнение результатов флуоресцентной цистоскопии с использованием 5-аминолевулиновой кислоты с результатами обычной цистоскопии показали, что при проведении последней упускается достаточное число опухолей, в основном T_a и T_{is}, поскольку их трудно отличить от воспалительных очагов в уротелии [1]. Об этом свидетельствует и высокая частота развития рецидивов после удаления всех видимых опухолей T_a и T_{is}. В качестве дополнительного метода используют цитологическое исследование клеток осадка мочи, основным достоинством которого является неинвазивность и высокая специфичность. Однако метод имеет малую чувствительность при низкой степени злокачественности опухолей и субоптимальную — при высокой. По данным многоцентрового исследования, проведенного H.B. Grossman et al. [2], общая чувствительность метода составила 15,8% [2]. Как цистоскопический, так и цитологический методы диагностики РМП основаны на субъективной оценке морфологических особенностей тканей и клеток. В то же время, так же как и при других формах рака, фенотипические отклонения в клетках при РМП являются результатом генетических нарушений, которые могут быть выявлены с помощью современных молекулярно-генетических методов, таких как сравнительная геномная гибридизация [3], микросателлитный анализ [4], анализ ploидности ДНК, выполняемый с помощью проточной цитометрии [5]. Данные методы позволяют установить количественные и структурные хромосомные нарушения, наиболее характерные для РМП.

Одним из наиболее информативных оказался метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [6]. Он основан на специфическом связывании меченных флуорохромами ДНК-зондов с различными участками хромосом. ДНК-зонды, гибридизующиеся с центромерными участками, позволяют по числу цветовых сигналов в интерфазном ядре определить число копий каждой хромосомы. ДНК-зонды, связывающиеся с определенными хромосомными локусами, позволяют установить наличие или отсутствие этих локусов на хромосоме. В результате проведенных в различных клинических лабораториях исследований [6] из всех встречающихся генетических аномалий при РМП была определена комбинация из 4 наиболее информативных. К ним относят увеличение по сравнению с нормой (диплоидия) числа копий

3-, 7- и 17-й хромосом (анеуплоидия) и потерю локуса p21 на 9-й хромосоме, где находится ген *p16* — онкосупрессор. Данные нарушения можно обнаружить не только в клетках самой опухоли, но и в слущенных опухолевых клетках осадка мочи. Компанией Abbott Molecular (Abbott Laboratories, США) был создан «кит» — набор соответствующих ДНК-зондов (UroVysion), позволяющий среди слущенных клеток уротелия в осадке мочи выявить те, в которых имеются эти нарушения, т.е. злокачественные. Этот набор был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (US Food and Drug Association — FDA, США) в 2001 г. и рекомендован для клинического применения с целью раннего выявления РМП и его рецидивов. В настоящее время UroVysion-тест широко применяют в урологических клиниках Европы и Америки, благодаря чему рутинная цитологическая диагностика практически полностью была преобразована в молекулярно-цитогенетическую.

Цель исследования — апробация применения FISH-метода при использовании зондов UroVysion для диагностики РМП и его рецидивов и сравнение результатов этого неинвазивного теста с данными цистоскопических и гистологических исследований.

Материалы и методы

Обследованная выборка состояла из 35 мужчин и 3 женщин в возрастном интервале от 37 до 82 лет. У 28 больных диагноз РМП был установлен впервые, 12 — наблюдались после лечения РМП на предмет выявления рецидивов. Тринадцать пациентов были курящими, 6 — имели опыт контактирования с вредными профессиональными веществами.

В группу обследованных больных с первичным диагнозом РМП вошли 8 пациентов со стадией T₁ (высокая степень злокачественности — 1, низкая — 7 человек), 15 — со стадией T₂ (высокая степень злокачественности — 4, низкая — 11), 4 — со стадией T₃ (высокая степень злокачественности — 3, низкая — 1), 1 — со стадией T₄ (высокая степень злокачественности). Ни в одном случае не было зарегистрировано признаков поражения метастазами регионарных лимфатических узлов, и лишь у 1 больного со стадией T₃ имелись отдаленные метастазы.

У пациентов, наблюдавшихся после лечения РМП на предмет выявления рецидивов, первичные опухоли были представлены стадиями T₁ (*n* = 4), T₂ (*n* = 7) и T₃ (*n* = 1). Из них 3 больных были обследованы FISH-методом и на этапе первичной диагностики. У 3 пациентов диагноз РМП не установлен.

Исследование проведено на образцах осадка мочи, собранной в естественных условиях у пациентов урологического отделения РНЦРХТ. До проведения цистоскопии у больного забирали вторую порцию утренней мочи в количестве 33 мл и помещали в

50 мл пластиковые пробирки, содержащие 17 мл 2% раствора полиэтиленгликоля — CarboWax (Sigma®, Chemical Co, США). Образцы центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости осадок переносили в 15 мл пластиковые пробирки и добавляли 10 мл однократно фосфатно-солевой буфер ($1 \times \text{PBS}$). После центрифугирования при 1000 об/мин в течение 10 мин и удаления супернатанта осадок фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 3:1 в течение 30 мин при температуре -20°C . При необходимости осуществляли 2–3 смены фиксатора с последующим центрифугированием.

Полученную суспензию клеток в количестве от 10 до 50 мкл наносили на предметные стекла с 3 лунками диаметром 10 мм, выбирая для дальнейшего анализа оптимальную лунку по числу содержащихся в ней клеток (~ 10 клеток в поле зрения). Препараты хранили при температуре -20°C на протяжении 2–3 дней.

Предварительную обработку препаратов для гибридизации осуществляли следующим образом: на препарат наносили раствор РНКазы (100 мкг/мл в $2 \times \text{SC}$), инкубировали во влажной камере в термостате (при температуре 37°C) в течение 1 ч, обрабатывали в 10% растворе пепсина (10 мин при температуре 37°C) и растворе MgCl_2 (10 мин при комнатной температуре). После каждой обработки препарата проводили серию отмывок в буферном растворе ($1 \times \text{PBS}$) в течение 5 мин при комнатной температуре. После этого препараты обезвоживали в 70, 90 и 100% этаноле, по 3 мин в каждом.

Смесь зондов UroVysion (Abbott Molecular Inc. Des Plaines, США) к перицентромерным участкам 3-, 7- и 17-й хромосом и к локусу 9p21 в количестве 3 мкл наносили на выбранную лунку предметного стекла, накрывали покровным стеклом, заклеивали резиновым клеем («Петрохим», Россия) и помещали в термостат (Thermobrite, Abbott Molecular Inc. Des Plaines, США) для гибридизации по программе URO-6, включавшей в себя этапы денатурации (5 мин при температуре 74°C) и гибридизации (18 ч при температуре 37°C).

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Axioplan с использованием фильтров DAPI, Spectrum Aqua, Spectrum Red/Green, Spectrum Gold (K. Zeiss, Германия).

Просмотр препаратов осуществляли сканирующим методом, т.е. анализировали только морфологически аномальные (предположительно злокачественные) клетки, в соответствии с рекомендациями фирмы Vysis (США). Признаками аномалии считали большой размер ядра, неправильную его форму, «пятнистость» ядра при DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол)-окраске; наличие клеточных кластеров (при наложении клеток в кластере друг на друга они не учитывались).

Результат расценивали как FISH-положительный, т.е. подтверждающий наличие опухоли, если в 4 из 25 аномальных клеток обнаруживали увеличение количества сигналов по ≥ 2 хромосомам (3-, 7- или 17-й) в одной и той же клетке и/или в 12 из 25 аномальных клеток — отсутствие сигнала по локусу 9p21 [6].

Результаты и обсуждение

Сопоставление индивидуальных данных гистологического и FISH-методов диагностики РМП представлено в табл. 1 и 2.

У 7 из 8 больных с гистологически установленной стадией T1 результаты FISH-метода были положительными, т.е. цитогенетические изменения в слущенных эпителиальных клетках в моче свидетельствовали о злокачественности опухоли. У 1 пациента зарегистрирован отрицательный результат FISH-анализа. Таким образом, чувствительность для этой стадии составила $87,5 \pm 11,6\%$.

У 5 больных со стадией T2 из 20 пациентов со стадиями опухолевого процесса T2–T4 в осадке мочи не было обнаружено злокачественных клеток FISH-методом, чувствительность составила $75 \pm 9,7\%$. Из 3 человек с гистологически диагностированными фолликулярным и железистым циститом и нормой в 2 случаях результат FISH-анализа был положительным.

Из 12 пациентов, обследованных по поводу развития у них возможного рецидива заболевания через 3 мес после проведенного лечения, у 7 не было обнаружено признаков опухоли ни при цистоскопическом исследовании, ни с помощью UroVysion-теста, у 5 — рецидивы выявлены обоими методами.

Частота различных типов цитогенетических нарушений, встречающихся в слущенном уротелии у пациентов с положительным результатом FISH-анализа, также представлена в табл. 1 и 2. Преобладающим типом нарушений была гиперплоидия по 3-, 7- и 17-й хромосомам, только в 2 наблюдениях сопровождавшаяся делецией локуса 9p21. Среди аномальных клеток чаще всего встречались варианты с гиперплоидией (три-, тетрасомия) по 3-й хромосоме ($44,4 \pm 2\%$ случаев) и реже всего — по 7-й ($22,1 \pm 1,6\%$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что с помощью неинвазивного FISH-метода по цитогенетическим изменениям в слущенных уротелиальных клетках можно успешно диагностировать как первичные опухоли мочевого пузыря, так и их рецидивы. Общая чувствительность метода независимо от стадии (pT) и степени злокачественности опухоли составила в нашем исследовании $78,5 \pm 7,7\%$, что находится в рамках приводимых в литературе значений [7, 8].

В ряде исследований [9, 10] отмечено увеличение чувствительности UroVysion-теста по мере прогрессирования опухоли (от T1 до T4 и от низкой степени

Таблица 1. Результаты FISH-диагностики первичного РМП (индивидуальные данные)

Код	Стадия pTNM	Степень	FISH +/–	Частота клеток, % гиперплоидия по хромосомам			делеция локуса 9p21
				3	7	17	
1	T1N0M0	Низкая	+	33,3	0	9,5	57,2
6	T1N0M0	Низкая	+	61,5	0	38,5	0
7	T1N0M0	Низкая	+	66,7	0	33,3	0
9	T1N0M0	Низкая	+	42,4	30,3	27,3	0
38	T1N0M0	Высокая	+	43,8	25	31,2	0
18	T1N0M0	Низкая	+	43,6	23,1	33,3	0
24	T1N0M0	Низкая	+	40	26,7	33,3	0
33	T1N0M0	Низкая	–	0	0	0	0
Всего...				46,5±3,9	17,2±3	28,7±3,6	7,6±2,1
5	T2N0M0	Высокая	+	47,0	6,3	46,7	0
8	T2N0M0	Низкая	+	61,5	15,4	23,1	0
16	T2N0M0	Низкая	+	58,7	19,6	21,7	0
23	T2N0M0	Низкая	+	64,3	14,3	21,4	0
34	T2N0M0	Низкая	+	40,0	26,7	33,3	0
27	T2N0M0	Низкая	+	36,9	26,3	36,8	0
32	T2N0M0	Низкая	+	43,8	18,7	37,5	0
2	T2N0M0	Низкая	+	46,1	0	7,7	46,2
31	T2N0M0	Высокая	+	34,2	34,3	31,5	0
25	T2N0M0	Низкая	+	33,3	33,4	33,3	0
19	T2N0M0	Высокая	–	0	0	0	0
26	T2N0M0	Низкая	–	0	0	0	0
39	T2N0M0	Высокая	–	0	0	0	0
11	T2N0M0	Низкая	–	0	0	0	0
15	T2N0M0	Низкая	–	0	0	0	0
13	T3N0M1	Высокая	+	62,5	25,0	12,5	0
37	T3N0M1	Высокая	+	21,5	42,8	35,7	0
21	T3NxMx	Высокая	+	70,8	8,3	20,9	0
40	T3N0M0	Низкая	+	11,1	55,5	33,4	0
14	T4N0M0	Низкая	+	42,8	28,6	28,6	0
Всего...				43,7±5,4	23,7±1,9	30±2,1	2,6±0,7
4	Фолликулярный цистит	–	KM < 6		–		
3	Железистый цистит	+	KM от 6 до 20		–		
10	Норма	+	KM < 6		–		

Таблица 2. Результаты FISH-диагностики рецидивов РМП (индивидуальные данные)

Код	Стадия pTNM	Степень	FISH +/-	Частота клеток, %			
				гиперпloidия по хромосомам			делеция локуса 9p21
				3	7	17	
45	T1N0M0	+	46,2	15,4	38,4	0	57,2
41	T1N0M0	+	38,5	23,0	38,5	0	0
7	T1N0M0	—	0	0	0	0	0
42	T1N0M0	—	0	0	0	0	0
11	T2N0M0	+	33,3	33,3	33,4	0	0
43	T2N0M0	+	43,7	18,8	37,5	0	0
18	T2N0M0	—	0	0	0	0	0
36	T2N0M0	—	0	0	0	0	0
44	T2N0M0	—	0	0	0	0	0
35	T2N0M0	—	0	0	0	0	0
46	T2N0M0	—	0	0	0	0	0
30	T3N0M0	+	60	0	40	0	0

злокачественности до высокой), что не удалось установить при обследовании наших пациентов. Напротив, нами наблюдалась тенденция к более высокой чувствительности при стадии T1 ($87,5 \pm 11,6\%$) по сравнению со стадиями T2–T4 ($75 \pm 9,7\%$). В случае если результат подтвердится на большей выборке пациентов, это может иметь важное клиническое значение, поскольку лечение, начатое на ранней стадии, позволит уменьшить вероятность перехода опухоли в мышечно-инвазивную форму.

В литературе имеются данные о том, что иногда при отрицательном результате цистоскопии UroVysion-тест бывает положительным, при этом он квалифицируется как «предварительно-позитивный» [9, 11]. Однако в большинстве случаев у таких пациентов спустя 4–6 мес и на морфологическом уровне обнаруживают рак.

Это свидетельствует о высокой прогностической ценности FISH-метода. В нашей работе у 2 пациентов при первичном выполнении цистоскопии не было обнаружено признаков РМП (один имел диагноз железистый цистит, у другого не было выявлено патологических изменений уротелия). В то же время результат UroVysion-теста был положительным. По-видимому, эти пациенты нуждаются в систематическом наблюдении и применении дополнительных методов обследования.

Большое значение имеет неинвазивность метода UroVysion для выявления рецидивов РМП, поскольку больной после лечения неоднократно подвергается

выполнению цистоскопии, являющейся достаточно травматичной процедурой. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что чувствительность UroVysion-теста при рецидивах опухоли составляет практически 100 %: результаты цистоскопических и цитогенетических исследований 12 пациентов полностью совпали.

Основным типом генетических нарушений в опухолевых клетках у обследованных пациентов была анеуплоидия по 3 меченым хромосомам. Только у 2 пациентов параллельно были зарегистрированы клетки с делецией локуса 9p21. Известно [12], что в папиллярных опухолях Ta, как правило, выявляется мало числовых аномалий хромосом, они в основном представлены утратой всей 9-й хромосомы или ее части, где локализован ген-онкосупрессор *p16*. Напротив, злокачественные опухоли (Tis, T1–T4) характеризуются выраженной нестабильностью хромосомного аппарата, проявляющейся в анеуплоидии по разным хромосомам. При этом высокозлокачественные новообразования часто сопровождаются и отсутствием локуса 9p21.

В нашей выборке у всех пациентов были верифицированы стадии T1–T4 и во всех случаях наблюдалась гиперпloidия (три- и тетрасомия) по 3-, 7- и 17-й хромосомам. У 2 больных (коды 1 и 2) помимо анеуплоидии была выявлена и делеция локуса 9p21, хотя степень злокачественности опухоли гистологически была определена как низкая, а стадии — как T1 и T2. Возможно, характер генетических изменений более

адекватно отражает агрессивность опухоли (степень прогрессии), чем морфологические критерии.

Анализ встречаемости клеток с числовыми нарушениями, выполненный для разных хромосом, показал, что при всех стадиях злокачественности опухоли анеуплоидия чаще всего наблюдается по 3-й хромосоме и реже всего — по 7-й. Аналогичные результаты были получены в работе А.В. Севаньяева и соавт. [13]. Причина различной степени вероятности увеличения копий для разных хромосом неясна.

Таким образом, неинвазивный UroVysion-тест в сочетании с цистоскопией может обеспечить 100 % выявление РМП как на этапе первичной диагностики, так и при мониторинге рецидивов.

Выводы

1. UroVysion-тест позволяет успешно диагностировать РМП и его рецидивы неинвазивным методом по слущенным клеткам осадка мочи.

2. Общая чувствительность метода без учета стадий заболевания и степени злокачественности составила $78,5 \pm 7,7\%$, при этом наибольшая чувствительность наблюдалась для первичной опухоли на стадии T1 ($87,5 \pm 11,6\%$) и для рецидивов (100 %).

3. Генетические нарушения в опухолевых клетках у всех больных были представлены численными хромосомными нарушениями, среди которых чаще всего встречалась гиперплоидия по 3-й хромосоме и реже всего — по 7-й.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmidbauer J., Witjes F., Schmeller N. et al. Hexvix PCB301/01 Study Group. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol* 2004;171(1):135–8.
2. Grossman H.B., Messing E., Soloway M. et al. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2005;293(7):810–6.
3. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Citron G. et al. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Gen Chromosom Cancer* 1995;12(3):213–9.
4. Mao L., Schoenberg M.P., Scicchitano M. et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996;271(5249):659–62.
5. Боженко В.К., Кулинич Т.М., Мельникова Н.В., Нестеров П.В. Проточная цитометрия осадка мочи в диагностике рака мочевого пузыря. *Вопр онкол* 2007;53:468–72.
6. Sokolova I.A., Halling K.C., Jenkins R.B. et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2000;2(3):116–23.
7. Halling K.C. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(4):507–19.
8. Skacel M., Fahmy M., Brainard J.A. et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol* 2003;169(6):2101–5.
9. Sarosdy M.F., Schellhammer P., Bokinsky G. et al. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 2002;168(5):1950–4.
10. Bubendorf L., Grilli B., Sauter G. et al. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 2001;116(1):79–86.
11. Yoder B.J., Skacel M., Hedgepeth R. et al. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol* 2007;127:295–301.
12. Richter J., Jiang F., Gorog J.P. et al. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997;57:2860–4.
13. Севаньяев А.В., Лушников Е.Ф., Карякин О.Б. и др. Клиническое применение FISH-метода в ранней диагностике поверхностного рака мочевого пузыря. *Онкоурология* 2008;(4):61–5.