

Факторы апоптоза и пролиферации при раке почки

О.Б. Лоран¹, Г.А. Франк², А.В. Серегин¹, Л.Э. Завалишина²,
Ю.Ю. Андреева², А.А. Серегин¹, Н.А. Шуститский¹

¹Кафедра урологии и хирургической андрологии ГОУ ДПО РМАПО;

²ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий, Москва

APOPTOSIS AND PROLIFERATION FACTORS IN RENAL CANCER

O.B. Loran¹, G.A. Frank², A.V. Seregin¹, L.E. Zavalishina²,
U.U. Andreeva², A.A. Seregin¹, N.A. Shustitzkiy¹

¹Urology and surgical andrology department of russian medical academy of the post-diploma education;

²Moscow research oncology institute named after P.A. Gercen, Moscow

The problem of forecasting of a kidney cancer and a choice of a method of adjuvant treatment the advanced forms of this disease remains actual. In the given research the estimation of prognostic importance of apoptotic and proliferative markers in 66 patients with local advanced and metastatic renal cell carcinoma has been led. Results of the work allow to conclude that the estimation of expression of these markers allows to allocate groups of patients of the high risk requiring careful supervision and treatment.

Почечно-клеточный рак (ПКР) составляет около 3% онкологических заболеваний взрослого населения мира [1, 2]. Единственным эффективным методом лечения рака почки (РП) является хирургический. Но его возможности при диссеминированном РП ограничены – прогноз у таких пациентов весьма неблагоприятен. Медиана выживаемости – 6–12 мес, 2-летняя выживаемость редко превышает 20%, а 5-летняя выживаемость, по данным разных авторов, колеблется от 1 до 10% [3–5].

РП резистентен к гормональной и химиотерапии [6–12]. Лучевая терапия при лечении распространенного РП практически неэффективна. Ее применение оправдано при наличии костных метастазов для снижения болевого синдрома [13, 14].

Широко используемая иммунотерапия, основанная на применении интерферона α и интерлейкина-2, позволяет рассчитывать на положительный результат не более чем в 20% [15]. Обращает на себя внимание отсутствие единой прогностической системы, позволяющей адекватно оценить возможные результаты лечения каждого пациента. Нет и достоверных прогностических факторов, обладающих необходимой чувствительностью и специфичностью, при выборе тактики лечения, что заставляет продолжать исследования в этом направлении. Применение классических прогностических факторов, таких как размер опухоли, стадия заболевания, степень дифференцировки опухолевых клеток, основано на статистических данных и далеко не всегда позволяет прогнозировать течение РП у конкретного пациента.

Исследования последних лет проливают свет на суть такого биологического явления, как апоптоз – программированная клеточная смерть. В регуляции механизма апоптоза принимает участие довольно большая группа молекул, экспрессируемых

соответствующими генами. Имеются сообщения о прогностической значимости определения апоптотической готовности и пролиферативной активности клеток ПКР [16–19], однако результаты проведенных исследований весьма противоречивы.

Цель работы – определить клиническое и прогностическое значения экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации при местно-распространенном и метастатическом РП.

Задачи исследования

1. Оценить экспрессию CD95, p53, Bcl-2, Bcl-X, Вах, Вак, PCNA и Her-2/neu в опухолевых клетках при иммуногистохимическом исследовании ткани удаленной почки по поводу местно-распространенного и метастатического рака.

2. Сопоставить изученные биологические характеристики РП с течением заболевания.

3. Сравнить степень экспрессии факторов апоптоза и пролиферации с результатами проводимой иммунотерапии.

4. Выявить зависимость результатов иммунотерапии от степени экспрессии про- и антиапоптотических факторов и пролиферативной активности опухолевых клеток.

Материалы и методы исследования

В основу настоящей работы положен анализ результатов обследования и лечения больных местно-распространенным и метастатическим РП, находившихся на обследовании и лечении в стационарах клиники урологии РМАПО на базе ГКБ им. С.П. Боткина, Московской городской онкологической больницы №62 и Московского городского онкологического диспансера №1 с 2005 по 2007 г.

В исследование были включены 66 пациентов: 44 (67±5,8%) мужчины и 22 (33±5,8%) женщины, средний возраст – 55,84 года (от 39 лет до 71 года), страдавших местно-распространенным (1-я группа,

Таблица 1. Результаты исследования экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации у больных местно-распространенным и метастатическим РП

Критерий	Группа, №	Нет экспрессии, %	Слабая экспрессия, %	Умеренная экспрессия, %	Выраженная экспрессия, %	Достоверность, p
p53	1	93,75	6,25	0	0	<0,01
	2	52,9	47,1	0	0	
Bcl-2	1	68,75	31,25	0	0	>0,05
	2	58,8	41,2	0	0	
Bcl-X	1	68,75	25	6,25	0	>0,05
	2	82,4	17,6	0	0	
Bak	1	62,5	6,25	25	6,25	>0,05
	2	29,4	41,2	23,5	5,9	
Bax	1	62,5	18,75	18,75	0	>0,05
	2	64,7	29,4	5,9	0	
CD95	1	6,25	37,5	31,25	25	<0,05
	2	35,3	41,2	17,6	5,9	
PCNA	1	0	6,25	62,5	31,25	>0,05
	2	0	23,5	29,4	47,1	
Her-2	1	81,25	12,5	6,25	0	>0,05
	2	88,2	5,9	5,9	0	

Примечание. Здесь и в табл. 2: 1-я группа – местно-распространенный РП; 2-я группа – метастатический РП.

$n=32$) и метастатическим (2-я группа, $n=34$) ПКР. Всем пациентам была выполнена радикальная или циторедуктивная нефрэктомия. В послеоперационном периоде всем больным проводилась иммунотерапия препаратами Роферон или Интрон А по схеме от 1 до 6 млн ЕД п/к ежедневно курсами по 10 инъекций с интервалом 2–3 нед. Терапию проводили до выявления прогрессирования болезни. Все больные проходили комплексное контрольное обследование через 3 и 6 мес после начала проведения иммунотерапии, далее – каждые полгода. Медиана наблюдения составила 9,8 мес (от 2 до 24 мес).

Для определения экспрессии изучаемых факторов мы использовали метод иммуногистохимического исследования с применением моноклональных антител в следующих разведениях: Вах (1:1000), Вак (1:25), Fas (CD95) (1:50), Bcl-2 (1:70), Bcl-X (1:500), p53 (1:50), PCNA (1:300), Her-2/neu (1:300) производства фирмы ДАКО (Дания). В качестве детекционной системы была задействована полимерная система EnVision (ДАКО).

Результаты

Первым этапом анализа результатов проведенного исследования было сравнение степени экспрессии изучаемых маркеров апоптоза и пролиферации у пациентов в группах местно-распространенного и метастатического РП (табл. 1).

При местно-распространенном РП экспрессия мутантного белка p53, отвечающего за остановку клеточного деления и регулирующего деятельность белков семейства Bcl-2, практически нам не встре-

тилась. Из 32 пациентов этой группы экспрессия мутантного p53 отмечена только у двух, что составило $6,25 \pm 4,3\%$. При метастатическом поражении почти в половине случаев выявлена экспрессия мутантного p53 ($47,1 \pm 8,6\%$, $p < 0,01$). При этом коэффициент корреляции экспрессии p53 со стадией заболевания достиг значимого уровня и составил 0,46. Полученные данные позволяют расценивать наличие экспрессии мутантного p53 как фактор, отрицательно влияющий на прогноз заболевания и коррелирующий с наличием отдаленных метастазов.

При сравнении уровня экспрессии CD95 (FAS/Apo1) в изучаемых группах отмечено, что среди пациентов с более ранней стадией РП, т.е. стадией местного распространения, достоверно чаще встречается активность данного фактора, чем у пациентов с метастатическим поражением. В последнем случае возрастает доля клеток, не имеющих данный рецептор ($6,25 \pm 4,3\%$ в 1-й группе и $35,3 \pm 8,2\%$ – во 2-й). Кроме того, снижается доля клеток с выраженной экспрессией CD95(FAS/Apo1) – $25 \pm 7,7\%$ в 1-й группе и $5,9 \pm 4,0\%$ – во 2-й ($p < 0,05$). Модуль коэффициента корреляции оказался равным 0,41, что позволило говорить о значимой корреляции. Таким образом, снижение уровня экспрессии CD95(FAS/Apo1) достоверно коррелирует с повышением стадии заболевания и наличием отдаленных метастатических очагов.

Кроме того, при сравнительном анализе экспрессии Вак в группах местно-распространенного и метастатического РП мы выявили достоверные раз-

Таблица 2. Сравнение экспрессии изучаемых факторов у пациентов обеих групп

Критерий	Группа, №	Нет экспрессии, %	Есть экспрессия, %	Достоверность, <i>p</i>
P53	1	93,75	6,25	<0,01
	2	52,9	47,1	
Bcl-2	1	68,75	31,25	>0,05
	2	58,8	41,2	
Bcl-X	1	68,75	31,25	>0,05
	2	82,4	17,6	
Bax	1	62,5	37,5	<0,01
	2	29,4	70,6	
Bax	1	62,5	37,5	>0,05
	2	64,7	35,3	
CD95	1	6,25	93,75	<0,01
	2	35,3	64,7	
PCNA	1	0	100	>0,05
	2	0	100	
Her-2	1	81,25	18,75	>0,05
	2	88,2	11,8	

Таблица 3. Характеристика пациентов по характеру прогрессии заболевания

Характер прогрессии		Местно-распространенный РП	Метастатический РП
Прогрессия	локальный рецидив	4 (12,5)	6 (17,6)
	отдаленные метастазы	10 (31,3)	8 (23,5)
	умерло	0 (0)	10 (29,4)
Стабилизация и регресс		20 (62,5)	10 (29,4)
Всего ...		32 (100)	34 (100)

Примечание. Здесь и в табл. 4: в скобках – процент больных.

Таблица 4. Сравнение экспрессии p53 у пациентов обеих групп

Показатель	Местно-распространенный РП		Метастатический РП	
	P53+	P53-	P53+	P53-
Подгруппа прогрессии	0 (0)	12 (100)	12 (50)	12 (50)
Подгруппа стабилизации	2 (10)	18 (90)	4 (40)	6 (60)
Достоверность, <i>p</i>	>0,05		>0,05	
Всего ...	32		34	

личия, приняв за дискриминационный уровень наличие его экспрессии в целом. В группе местно-распространенного РП этот фактор отмечался реже (37,5±8,6%), чем в группе метастатического РП (70,6±7,8%, *p*<0,01). Коэффициент корреляции экспрессии Bax со стадией заболевания составил 0,33, что соответствует значимому уровню и позволяет

нам рассматривать факт наличия экспрессии в опухолевой клетке Bax как неблагоприятный фактор прогноза, ассоциирующийся с развитием метастатического поражения (табл. 2).

При анализе экспрессии остальных исследуемых факторов (Bcl-2, Bcl-X, Bax, Her-2/neu, PCNA) нами не было выявлено достоверных различий в группах пациентов со стадиями местного распространения и метастатического поражения. Наши результаты позволили высказать мнение, что для обеих изучаемых стадий РП нехарактерны высокие уровни экспрессии белков семейства Bcl-2 и рецептора эпидермального фактора роста Her-2/neu. При этом необходимо отметить, что экспрессия PCNA в клетках местно-распространенного и метастатического РП была достаточно высокой: в обеих группах преобладали клетки с умеренной и высокой пролиферативной активностью.

Вторым этапом нашего исследования была оценка различия экспрессии изучаемых факторов в подгруппах пациентов по характеру течения заболевания и ответа на иммунотерапию. Результаты динамического наблюдения за пациентами представлены в табл. 3.

При местно-распространенном и метастатическом РП различие экспрессии мутантного p53 в подгруппах не носило достоверного характера (*p*>0,05), а коэффициент корреляции не достигал значимого уровня – 0,2 и 0,09 соответственно (табл. 4). Принимая во внимание полученные данные, мы предполагаем, что, несмотря на достоверные различия

экспрессии этого фактора в клетках при местно-распространенном и метастатическом РП, наличие мутантного p53 не позволяет прогнозировать чувствительность опухолевых клеток к иммунотерапии интерферонами. Имеющиеся различия в степени экспрессии p53 между группами больных местно-распространенным и метастатическим РП, возможно,

свидетельствуют лишь о нарушении функции этого белка на более поздних стадиях развития опухолевого процесса.

При оценке экспрессии семейства Vcl-2 в группе местно-распространенного РП нами не было выявлено достоверных отличий в подгруппах прогрессирования и стабилизации болезни по трем из четырех оцениваемых факторов, а именно: Vcl-X, Vak и Вах (табл. 5). Однако в подгруппе прогрессирования экспрессия

Таблица 5. Результаты исследования белков семейства Vcl-2 у больных местно-распространенным РП

Показатель	Характер течения	Нет экспрессии, %	Есть экспрессия, %	Достоверность, р
Vcl-2	Прогрессия	100	0	<0,05
	Стабилизация	50	50	
Vcl-X	Прогрессия	66,7	33,3	>0,05
	Стабилизация	70	30	
Vak	Прогрессия	66,7	33,3	>0,05
	Стабилизация	60	40	
Вах	Прогрессия	66,7	33,3	>0,05
	Стабилизация	60	40	

Таблица 6. Результаты исследования белков семейства Vcl-2 у больных метастатическим РП

Показатель	Характер течения	Нет экспрессии, %	Слабая экспрессия, %	Умеренная экспрессия, %	Выраженная экспрессия %	Достоверность, р
Vcl-2	Прогрессия	58,3	41,7	0	0	>0,05
	Эффект	60	40	0	0	
Vcl-X	Прогрессия	75	25	0	0	<0,05
	Эффект	100	0	0	0	
Vak	Прогрессия	33,3	25	33,3	8,4	>0,05
	Эффект	20	80	0	0	
Вах	Прогрессия	58,3	33,3	8,4	0	>0,05
	Эффект	80	20	0	0	

Vcl-2 не определялась в 100% клеток, в то время как в подгруппе эффекта от проводимой терапии количество клеток с наличием и отсутствием экспрессии Vcl-2 было одинаковым – по 50% ($p < 0,05$). Модуль коэффициента корреляции экспрессии Vcl-2 составил 0,52, что позволило говорить о значимой связи между отсутствием в клетке Vcl-2 и прогрессией заболевания.

В случае метастатического РП нами выявлено достоверное различие только в экспрессии Vcl-X между подгруппами пациентов прогрессии РП и эффективной иммунотерапии ($p < 0,05$). Vcl-X в подгруппе прогрессирования заболевания не обнаружен у 18 из 24 ($75 \pm 8,8\%$) человек, был слабо выражен у 6 ($25 \pm 8,8\%$). У всех пациентов подгруппы, ответивших на иммунотерапию, экспрессия Vcl-X не определялась – 10 человек – 100% (табл. 6). Между тем модуль коэффициента корреляции составил лишь 0,2, что не позволило говорить о значимой взаимосвязи между степенью экспрессии Vcl-X и эффектом терапии, хотя была выявлена тенденция влияния отсутствия экспрессии Vcl-X на эффект иммунотерапии при метастатическом РП. При анализе результатов иммуногистохимического исследования и сопоставлении их с эффектом лечения по шкале, основанной на процентном содержании позитивных клеток, нами не было отмечено ни достоверных различий в экспрессии Vcl-2, Vak и Вах, ни значимой корреляции с эффектом терапии.

Таблица 7. Сравнение степени экспрессии Vak у больных метастатическим РП

Степень экспрессии, %	Vak			
	прогрессия		эф ф е к т	
	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n
Менее 20	58,3	14	100	10
Более 20	41,7	10	0	0

Тем не менее мы обратили внимание на то, что в группе эффекта от проводимой терапии в 100% клеток уровень экспрессии Vak не превышал 20%, в то время как в группе прогрессирования заболевания только $58,3 \pm 10,1\%$ клеток имели экспрессию Vak в пределах 20% (табл. 7). В связи с этим мы проанализировали влияние минимальной экспрессии Vak на чувствительность пациентов к лечению интерферонами. Достоверность различий в данной категории между исследуемыми подгруппами была значительной ($p < 0,01$), а коэффициент корреляции составил 0,42. Наличие повышения экспрессии Vak более 20% коррелировало с отсут-

Таблица 8. Сравнение экспрессии CD95(FAS/Apo1) у пациентов обеих групп

Степень экспрессии	Местно-распространенный РП прогрессия		Местно-распространенный РП стабилизация		Метастатический РП прогрессия		Метастатический РП эффект	
	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %
Нет	2	16,65	0	0	41,7	10	20	2
Слабая	4	33,35	8	40	33,3	8	60	6
Умеренная	4	33,35	6	30	16,6	4	20	2
Выраженная	2	16,65	6	30	8,4	2	0	0
Достоверность, p	>0,05				>0,05			

Таблица 9. Сравнение экспрессии PCNA у пациентов обеих групп

Степень пролиферативной активности	Местно-распространенный РП прогрессия		Местно-распространенный РП стабилизация		Метастатический РП прогрессия		Метастатический РП эффект	
	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %
Низкая	0	0	2	10	6	25	2	20
Умеренная	12	100	8	40	6	25	4	40
Высокая	0	0	10	50	12	50	4	40
Достоверность, p	<0,05				>0,05			

Таблица 10. Сравнение экспрессии Her-2/neu у пациентов обеих групп

Степень экспрессии	Местно-распространенный РП прогрессия		Местно-распространенный РП стабилизация		Метастатический РП прогрессия		Метастатический РП эффект	
	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %
Нет	10	83,3	16	80	20	83,2	10	100
Слабая	2	16,7	2	10	2	8,4	0	0
Умеренная	0	0	0	0	2	8,4	0	0
Выраженная	0	0	2	10	0	0	0	0
Достоверность, p	>0,05				>0,05			

ствием эффекта иммунотерапии интерферонами. Факт несколько удивительный, поскольку Ваk относится к проапоптотическим факторам и повышение его активности может приводить к усилению апоптотической активности клеток. Однако, вероятно, при поздних стадиях РП происходят необратимые нарушения механизма регуляции клеточного цикла, и повышение уровня Ваk может свидетельствовать об отсутствии какого-либо контроля над клеточной пролиферацией.

При статистическом анализе результатов иммуногистохимического исследования экспрессии CD95(FAS/Apo1) среди пациентов с местно-распространенным и метастатическим РП достоверных различий в оцениваемых подгруппах не получено. Значение коэффициента корреляции составило 0,2,

что свидетельствует об отсутствии значимой корреляции экспрессии этого фактора с течением заболевания при данной стадии РП. Как и в случае с p53, несмотря на достоверные различия экспрессии CD95(FAS/Apo1) в группах местно-распространенного и метастатического РП, нами не было получено убедительных данных о влиянии экспрессии CD95(FAS/Apo1) на эффект терапии. По всей видимости, снижение экспрессии CD95(FAS/Apo1) с ростом стадии заболевания свидетельствует о прогрессирующем повреждении регуляторных механизмов в опухолевой клетке (табл. 8).

При анализе экспрессии PCNA в группе местно-распространенного РП были выявлены достоверные различия в подгруппах прогрессирующего и стабилизировавшегося РП (табл. 9). У пациентов группы прогрессирования заболевания (12 человек) 100% опухолевых клеток имели пролиферативную активность ниже 50% уровня. Из 20 пациентов со стабилизацией процесса на фоне лечения у 10 пролиферативная активность была ниже 50% (50,0±11,2%), а у второй половины (10 пациентов – 50,0±11,2%) определена высокая экспрессия PCNA. Достоверность различий достигла весьма значительного уровня (p <0,01), а модуль коэффициента корреляции составил 0,52, что свидетельствовало о значимой корреляции высокой пролиферативной активности с положительным эффектом интерферонов при местно-распространенном РП.

При анализе экспрессии PCNA среди пациентов с метастатическим поражением достоверных различий между подгруппами не выявлено (p>0,05). В обеих подгруппах около половины пациентов имели опухоли с высокой пролиферативной активностью клеток. Однако, в отличие от местно-распространенного процесса, этот критерий не внес информации о возможном прогнозе заболевания при наличии отдаленных метастазов. Коэффициент корреляции составил всего лишь 0,02, что не позволило нам причислить этот фактор к значимым при метастатическом РП.

При анализе экспрессии PCNA среди пациентов с метастатическим поражением достоверных различий между подгруппами не выявлено (p>0,05). В обеих подгруппах около половины пациентов имели опухоли с высокой пролиферативной активностью клеток. Однако, в отличие от местно-распространенного процесса, этот критерий не внес информации о возможном прогнозе заболевания при наличии отдаленных метастазов. Коэффициент корреляции составил всего лишь 0,02, что не позволило нам причислить этот фактор к значимым при метастатическом РП.

При сравнении экспрессии Her-2/neu в группах пациентов с местным распространением и метастатическим поражением (табл. 10) достоверных различий степени экспрессии в изучаемых подгруппах и значимой корреляции его экспрессии нами не получено ($p > 0,05$). Учитывая эти данные, мы предполагаем, что экспрессия Her-2/neu не является характерным признаком РП при местном распространении и метастатическом поражении, а также степень его экспрессии не коррелирует с течением заболевания и эффективностью иммунотерапии.

Таким образом, в процессе канцерогенеза отмечают прогрессивное нарушение регуляторных механизмов клеточного цикла при РП, что проявляется отсутствием контроля над синтезом про- и антиапоптотических молекул и их взаимодействием. Кроме того, в результате проведенной работы нами получены данные, позволяющие рассматривать факторы апоптоза и пролиферации в качестве прогностических ориентиров при выборе тактики послеоперационного ведения пациентов с местно-распространенным и метастатическим РП.

Выводы

1. Для опухолевых клеток при местно-распространенном и метастатическом РП нехарактерны высокие уровни экспрессии белков семейства Bcl-2

и Her-2/neu, но им свойственна умеренная и высокая степень экспрессии PCNA. Экспрессия мутантного белка p53 и снижение экспрессии CD95(FAS/Apo1) присущи клеткам РП на стадии метастатического поражения.

2. При местно-распространенном РП отсутствие экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 коррелирует с прогрессией заболевания. Экспрессия мутантного p53 и Bax, а также снижение экспрессии CD95(FAS/Apo1) – прогностически неблагоприятные факторы, коррелирующие с наличием отдаленных метастазов.

3. Наличие экспрессии мутантного p53 и снижение экспрессии CD95(FAS/Apo1) с ростом стадии заболевания свидетельствуют о прогрессирующем повреждении регуляторных механизмов в опухолевой клетке, но не коррелируют с эффектом адъювантной терапии при местно-распространенном и метастатическом РП.

4. При повышении экспрессии Bax более 20% эффективность иммунотерапии интерферонами при метастатическом РП снижается. Высокая пролиферативная активность опухолевых клеток коррелирует с положительным эффектом интерферонов при местно-распространенном РП и не является значимым прогностическим фактором при метастатическом РП.

Литература

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2004 году. М.; 2005.
2. Mathew A., Devesa S.S., Fraumeni J.F. Jr. et al. Global increases in kidney cancer incidence, 1973–92. *Eur J Cancer Prev* 2002;11:171–8.
3. Flanigan R.C., Campbell S.C., Clark J.I. et al. Metastatic renal cell carcinoma. Current treatment options. *Oncology* 2003;4:385–90.
4. Mickisch G.H. Rational selection of a control arm for randomised trials in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003;43:670–9.
5. Linechan S.H., Shipley W.U., Parkinson D.R. Cancer of the kidney and ureter. In: De Vita V.T. Jr., Ed. *Cancer: principles and practice of oncology*, 4th ed. Philadelphia, J.B. Lippincott; 1993.
6. Гарин А.М., Хлебнов А.В. Справочник практической химиотерапии опухолей. М., Росмэн; 1995.
7. Amato R.J. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2000;27:177–86.
8. Fossa S., Droz J.P., Pavone-Macaluso M. et al. Vinblastine in Metastatic Renal Cell Carcinoma: EORTC Phase III Trial 30882. *Eur J Cancer* 1992;28a:878–80.
9. Yagoda A., Abi-Rached B., Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983–1993. *Semin Oncol* 1995;22:42–60.
10. Pyrhönen S., Salminen E., Ruutu M. et al. Prospective Randomized Trial of Interferon Alfa-2a Plus Vinblastine Versus Vinblastine Alone in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2859–70.
11. Steiner G., Strander H., Carbin B.E. et al. Recombinant interferon alpha-2a and medroxyprogesterone in advanced renal cell carcinoma. A randomised trial. *Acta Oncol* 1990;29:155.
12. Papac R.J., Keohane M.F. Hormonal therapy for metastatic renal cell carcinoma combined androgen and provera followed by high dose tamoxifen. *Eur J Cancer* 1993;29:997–9.
13. Bone Pain Trial Working Party. 8 Gy single fraction radiotherapy for the treatment of metastatic skeletal pain: randomised comparison with a multifraction schedule over 12 months of patient follow-up. *Radiother Oncol* 1999;52:111–21.
14. Huguenin P.U., Kieser S., Glanzmann C. et al. Radiotherapy for metastatic carcinomas of the kidney or melanomas: an analysis using palliative end points. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1998;41:401–5.
15. Treter C.P.G., Ernstoff M.S. Chemotherapy, Hormonal therapy, and Interferons. *Genitourinary Oncology*, 2nd ed. Edited by N.J. Vogelzang, P.T. Scarding, W.U. Shipley, D.S. Coffey. USA, Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p. 248–59.
16. Kim H.L., Seligson D., Liu X. et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 2005;73(5):1496–501.
17. Vasavada S.P., Novick A.C., Williams B.R. P53, Bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998;51:1057–61.
18. Uzunlar A.K., Sahin H., Yilmaz F. et al. Expression of p53 oncoprotein and Bcl-2 in renal cell carcinoma. *Saudi Med J* 2005;26:37–41.
19. Cho D.S., Joo H.J., Oh D.K. et al. Cyclooxygenase-2 and p53 expression as prognostic indicators in conventional renal cell carcinoma. *Yonsei Med J* 2005;46(1):133–40.