

Прогностическое значение экспрессии карбоангидразы 9 в сочетании с другими маркерами при светлоклеточном почечно-клеточном раке

Н.А. Горбань¹, А.М. Попов², О.Б. Карякин²

¹ФГКУ «Главный военно-клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко»; Россия, 105094, Москва, Госпитальная пл., 3;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Нина Андреевна Горбань perovanina@mail.ru

Введение. В структуре онкологической заболеваемости России доля почечно-клеточного рака (ПКР) составляет 3,9 %. По темпам прироста эта нозология занимает одну из лидирующих позиций. С 2004 по 2014 г. число новых случаев ПКР увеличилось на 42,9 %. Карбоангидразы (СА) – трансмембранные ферменты, которые играют важную роль в регуляции рН, катализируя обратимые реакции угольной кислоты в диоксид углерода и воду. В последнее время появились исследования, посвященные прогностическому и предиктивному значению экспрессии СА9 в светлоклеточном ПКР.

Цель исследования – изучение взаимосвязи между экспрессией СА9 и пролиферативной активностью, апоптозом, морфологической картиной и клиническим течением опухоли.

Материалы и методы. В исследование включены 67 пациентов (47 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 32 до 73 лет ($55,0 \pm 7,6$ года) со светлоклеточным ПКР. Все больные проходили лечение в Медицинском радиологическом научном центре. Сроки наблюдения составили от 8 до 116 мес (в среднем – 36,5 мес). Пациентам выполнена нефрэктомия, проведено гистологическое исследование с оценкой градации по Фурман, иммуногистохимическое исследование с антителами к p53, bcl-2, Ki-67 и СА9.

Результаты и выводы. Экспрессия СА9 ассоциируется с экспрессией bcl-2, отсутствие экспрессии – с p53. Потеря экспрессии СА9 является неблагоприятным фактором прогноза и связана с развитием метастазов и рецидива заболевания, а также с низкой безрецидивной выживаемостью.

Ключевые слова: карбоангидраза, светлоклеточный почечно-клеточный рак, пролиферативная активность, апоптоз, факторы прогноза, выживаемость

DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-40-44

Prognostic value of the expression of carbonic anhydrase 9 in combination with other markers in patients with clear cell renal cell carcinoma

N.A. Gorban¹, A.M. Popov², O.B. Karyakin²

¹Federal State-Owned and State-Financed Enterprise “Chief Military Clinical Hospital named after academician N.N. Burdenko”; 3 Gospitalnaya place, Moscow, 105094, Russia;

²Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Radiological Center” of the Russian Ministry of Health; 4 Koroleva St., Obninsk, Kaluga Region, 249036, Russia

Background. The proportion of renal cell carcinoma (RCC) in the structure of oncological incidence in Russia is 3.9 %. This nosology has a leading position by the growth rate. The number of new cases of RCC from 2004 to 2014 increased by 42.9 %. Carbonic anhydrase (CA) enzymes are transmembrane enzymes that play an important role in pH regulation catalyzing reversible reactions of carbonic acid to carbon dioxide and water. Recently we have seen studies on prognostic and predictive value of CA9 expression in clear cell RCC.

Objective – reveal relationship between CA9 expression and proliferative activity, apoptosis, morphological picture and clinical course of a tumor.

Materials and methods. The study included 67 patients (47 men and 20 women) aged from 32 to 73 years (55.0 ± 7.6 years), suffering from clear cell RCC. All the patients were treated at the Medical Radiological Research Center. Follow-up period lasted from 8 to 116 months (mean – 36.5 months). Patients underwent nephrectomy, histological study with Fuhrman nuclear grading, immunohistochemistry with antibodies against p53, bcl-2, Ki-67 and CA9.

Results and conclusions. CA9 expression is associated with the expression of bcl-2, while the lack of CA9 expression is associated with p53. Loss of CA9 expression is a poor prognostic factor and it is associated with the development of metastasis and recurrence of the disease, as well as lower disease-free survival.

Key words: carbonic anhydrase, clear cell renal cell carcinoma, proliferative activity, apoptosis, prognostic factors, survival

Введение

В структуре онкологической заболеваемости России доля почечно-клеточного рака (ПКР) составляет 3,9 %. По темпам прироста эта нозология занимает одну из лидирующих позиций. С 2004 по 2014 г. число новых случаев ПКР увеличилось на 42,9 % [1]. Прогностических маркеров для ПКР на сегодняшний день не существует [2, 3]. Карбоангидраза 9 (CA9) экспрессируется в разных гистологических подтипах ПКР. Большинство (95 %) светлоклеточных опухолей имеют высокую и гомогенную экспрессию CA9; в онкоцитомах, хромофобном и папиллярном типах рака ее экспрессия значительно ниже [4].

Впервые CA9 (G250) была описана в 1986 г. в исследовании, посвященном опухолевой специфичности моноклонального антитела G250 [5]. CA9 – трансмембранный гликопротеин, относящийся к карбоангидразной группе ферментов, которые являются критическими в регуляции избыточного выделения протонов в клетке и таким образом контролируют pH. [6, 7]. Экспрессия CA9 выявляется почти во всех типах опухолей (при раке шейки матки, пищевода, легких, молочной железы, головного мозга, вульвы, где экспрессия гетерогенна) и связана с гипоксией [8].

В последнее время появились исследования, посвященные прогностическому и предиктивному значению экспрессии CA9 при светлоклеточном ПКР [9–12]. Прогностическими маркерами при светлоклеточном ПКР являются Ki-67, отражающий пролиферативный уровень опухоли, а также маркеры апоптоза p53 и bcl-2 [13].

Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между экспрессией CA9 и пролиферативной активностью, апоптозом, морфологической картиной и клиническим течением опухоли.

Материалы и методы

В исследование включены 67 пациентов (47 мужчин, 20 женщин) в возрасте от 32 до 73 лет ($55,0 \pm 7,6$ года) со светлоклеточным ПКР. Больные проходили лечение в Медицинском радиологическом научном центре. Сроки наблюдения составили от 8 до 116 мес (в среднем – 36,5 мес). Всем пациентам выполнена нефрэктомия. После операции больным с распространенным опухолевым процессом назначали таргетную терапию 1-й линии согласно рекомендациям Европейской ассоциации урологов (EAU).

Гистологическое исследование проводили по разработанному протоколу на большом числе фрагментов опухоли с учетом ее гетерогенности. Гистологические срезы опухолевой ткани окрашивали гематоксилином и эозином и использовали для иммуногистохимического исследования. Блокирование эндогенной пероксидазы проводили охлажденной 3 % перекисью водорода в течение 10 мин. В целях восстановления антигенной структуры клеток материала, фиксированного в фор-

малине и заключенного в парафин, выполняли прогревание гистологических срезов на водяной бане в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буферном растворе (pH 6.0). Инкубацию с первичными антителами (Dako) проводили при комнатной температуре в течение 60 мин. Для визуализации продуктов иммунной реакции был использован стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод (EnVision+ System-HRP, Dako), в качестве хромогенного субстрата применяли раствор диаминобензидина (Liquid DAB+, Dako), ядра докрашивали гематоксилином. В качестве негативного контроля использовали срезы, на которые наносили лишь вторичные антитела, без предварительного нанесения первичных.

Степень дифференцировки опухоли оценивали по Фурман согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения 2004 г. [14]. Положительной экспрессией белка Ki-67 считали наличие специфического окрашивания в коричневый цвет ядер опухолевых клеток и p53-специфического ядерного окрашивания более чем в 10 % опухолевых клеток. Положительной экспрессией bcl-2 – специфическое цитоплазматическое окрашивание более 75 % опухолевых клеток, положительной экспрессией CA9 считали специфическое мембранное окрашивание более 75 % опухолевых клеток.

Для морфометрических исследований опухоли использовали программу компьютерного анализа изображений OpenCVTool, цифровой сканер MIRAX MIDI (Zeiss), системный блок на базе процессора Intel Core I3 с оперативной памятью 4 Гб.

Подсчет индекса Ki-67 проводили на базе анализа более 1000 клеток. Индекс Ki-67 вычисляли как соотношение количества специфически окрашенных ядер и количества всех ядер, выраженное в процентах.

Анализ выживаемости выполняли с помощью метода Каплана–Майера (1958), достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждали посредством Cox's F-Test. Значимым принимали уровень достоверности $p \leq 0,05$. Статистическую обработку полученных параметров проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 10.0.

Результаты

По распространенности заболевания на момент диагностики больные распределились следующим образом: 31 (46,3 %) имели локализованный рак и 36 (53,7 %) – метастатический. За период наблюдения у 13 пациентов с локализованной опухолью на момент диагностики в различные сроки после хирургического лечения развилось прогрессирование заболевания.

Во всех случаях морфологически был верифицирован светлоклеточный вариант ПКР, распределение по Фурман было следующим: градация 1 – 3 пациента,

градация 2 – 17, градация 3 – 23 и градация 4 – 24. В 13 (19,4 %) опухолях был выявлен саркоматоидный компонент. Очаги некроза обнаружены в 35 случаях (52,2 %).

К негативным по СА9 мы отнесли 31 опухоль (46,3 %), из них только в 10 (14,9 %) экспрессия отсутствовала полностью, а в 21 – регистрировалась очаговая слабо выраженная экспрессия.

Средний уровень Ki-67 составил $9,7 \pm 1,3$ % (от 0,1 до 49,0 %); Ki-67 выше 10 % выявили у 22 пациентов.

У 19 (28,4 %) пациентов зарегистрировали ядерную экспрессию p53 разной степени выраженности как по количеству окрашенных клеток, так и по интенсивности окрашивания.

Полное отсутствие экспрессии bcl-2 наблюдалось у 31 пациента, еще у 9 была очаговая экспрессия (этих пациентов мы отнесли в группу bcl-2-негативных опухолей), а выраженная цитоплазматическая экспрессия выявлена только у 27 пациентов (40,3 %).

В саркоматоидном компоненте в 6 (46 %) случаях зарегистрирована экспрессия p53 и во всех 100 % случаев потеря экспрессии bcl-2 и СА9, а уровень Ki-67 более 10 %.

Мы провели анализ экспрессии СА9 и ее связи с клиническими и морфологическими данными, а также с другими маркерами. В группе высокодифференцированных опухолей (ядерной градации, 1 и 2 по Фурман) только 4 из 20 мы отнесли к СА9-негативным, хотя экспрессия СА9 все-таки была очаговая и слабо

выраженная, полного отсутствия экспрессии не зарегистрировано ни в одном случае (см. таблицу). При градациях 3 и 4 мы отнесли 27 из 47 случаев к негативным (в 10 случаях наблюдали полное отсутствие экспрессии, в остальных – очаговое слабо выраженное окрашивание) ($p = 0,0047$). Однако с наличием саркоматоидного компонента достоверной связи не выявлено (см. таблицу), как и не обнаружено связи с уровнем Ki-67.

Экспрессия СА9 связана с хорошей безрецидивной выживаемостью ($p = 0,02$) (рис. 1), а зависимость специфической выживаемости от экспрессии СА9 – на уровне тенденции ($p = 0,098$) (рис. 2).

Метастатический потенциал опухоли связан с потерей экспрессии СА9 ($p = 0,009$) (см. таблицу). Так,

Соотношение экспрессии СА9, клинических признаков и экспрессии других маркеров

| Показатель | СА9+ | СА9– | p |
|-------------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Градация 1 и 2 | 16 (23,9 %) | 4 (6 %) | 0,0047 |
| Градация 3 и 4 | 20 (29,8 %) | 27 (40,3 %) | |
| Саркоматозный компонент имеется | 5 (7,5 %) | 8 (11,9 %) | 0,18 |
| Саркоматозный компонент отсутствует | 31 (46,3 %) | 23 (34,3 %) | |
| Локализованный рак | 22 (32,8 %) | 27 (40,3 %) | 0,009 |
| Метастатический рак | 14 (20,9 %) | 4 (6,0 %) | |
| Ki-67 > 10 % | 9 (13,4 %) | 13 (19,4 %) | 0,11 |
| Ki-67 < 10% | 27 (40,3 %) | 18 (26,9 %) | |
| P53+ | 5 (7,5 %) | 14 (20,9 %) | 0,005 |
| P53– | 31 (46,3 %) | 17 (25,4 %) | |
| bcl-2+ | 19 (28,4 %) | 8 (11,9 %) | 0,02 |
| bcl-2– | 17 (25,4 %) | 23 (34,3 %) | |

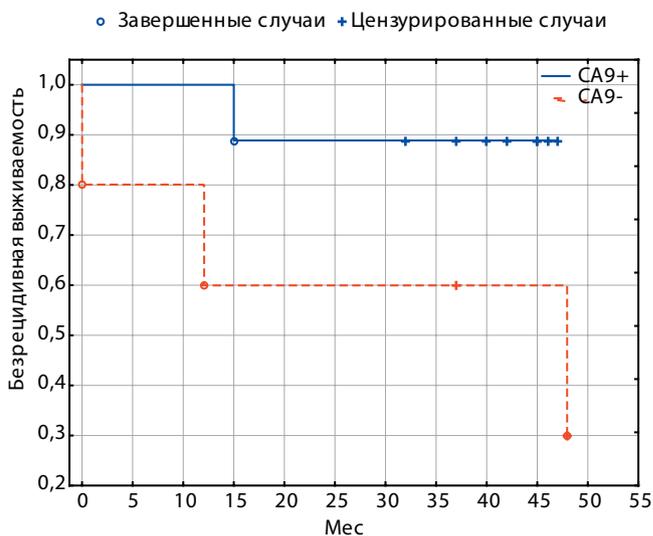


Рис. 1. Зависимость безрецидивной выживаемости от экспрессии СА9

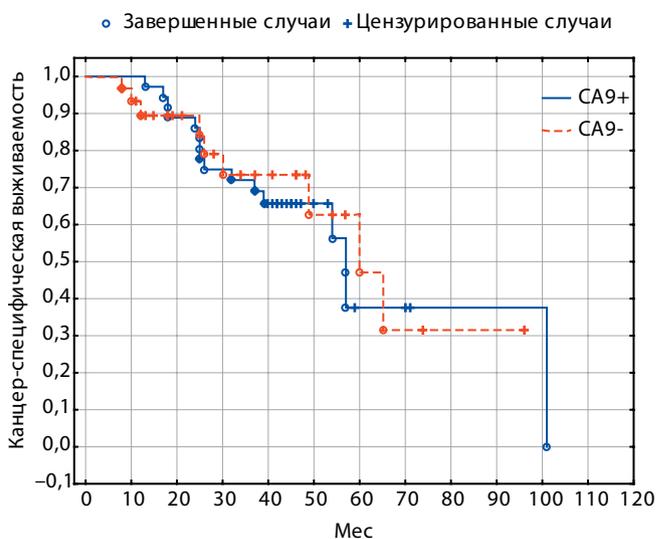


Рис. 2. Зависимость канцерспецифической выживаемости от экспрессии СА9

в группе пациентов, у которых опухоль экспрессировала СА9, метастазы выявили в 22 (61,1 %) случаях, а в группе с отсутствием экспрессии – в 27 (87,1 %). Причем метастазы выявили у 21 из 31 пациента с отсутствием экспрессии на момент диагностики, а в группе с экспрессией – у 15 из 36 ($p = 0,029$).

Экспрессия p53 сопровождается потерей экспрессии СА9 ($p = 0,005$), потеря экспрессии bcl-2 также сочетается с потерей СА9 (см. таблицу).

Обсуждение

Карбоангидразы – трансмембранные ферменты, которые играют важную роль в регуляции рН, катализируя обратимые реакции угольной кислоты в диоксид углерода и воду. Большинство работ, посвященных СА9, рассматривают ее экспрессию в различных вариантах ПКР [4, 15]. Мы оценивали прогностическое значение СА9 только при светлоклеточном варианте ПКР. В нашем исследовании выявлена четкая связь экспрессии СА9 со степенью дифференцировки опухоли (градацией Фурман). При понижении степени дифференцировки опухоли снижается и даже полностью теряется экспрессия СА9. Такие же результаты мы встретили в работах других исследователей [8, 15, 16]. Мы не обнаружили корреляции с наличием саркоматоидного компонента. Однако следует отметить, что ни в одном случае в саркоматоидном компоненте опухоли СА9 не выявлялась, хотя в более дифференцированных участках экспрессия могла быть интенсивной, в связи с чем мы относили опухоль в группу СА9-позитивных. Возможно, при оценке экспрессии СА9 следует учитывать гетерогенность ПКР, точно так же необходимо учитывать саркоматоидный компонент как неблагоприятный фактор независимо от его объема. Саркоматоидный компонент является отражением дедифференцировки опухоли с потерей ее морфологических и иммуногистохимических характеристик. В саркоматоидном компоненте наблюдается высокий уровень пролиферативной активности, отражением которого является Ki-67, часто появляется экспрессия онкопротеина p53 и потеря экспрессии bcl-2, а потеря экспрессии СА9 является закономерной.

В нашем предыдущем исследовании [13] Ki-67 связан с высокой ядерной градацией и плохим прогнозом при светлоклеточном ПКР, а его уровень выше 10 % – с развитием метастазов и низкой безметастатической выживаемостью. Со снижением дифференцировки увеличивается пролиферативная активность, и можно ожидать, что экспрессия СА9 и уровень Ki-67 будут коррелировать, однако в настоящем исследовании достоверной корреляции не выявлено. По всей видимости, они являются независимыми прогностическими факторами.

Экспрессия p53 во многих [17, 18], в том числе в нашем [13], исследованиях является неблагоприят-

ным прогностическим фактором при ПКР, связана с прогрессированием заболевания, наличием метастазов и низкой канцерспецифической выживаемостью. По нашим данным, в опухолях с наличием мутации гена p53 и экспрессией p53-протеина экспрессия СА9 ослабевает или вовсе теряется, хотя отсутствие экспрессии p53 не является гарантией сохранения СА9. Связь экспрессии bcl-2 и СА9 прямая: большая часть опухолей, экспрессирующих bcl-2, сохраняет и СА9, а при потере bcl-2 теряет и СА9.

Потеря экспрессии СА9 сочетается с такими неблагоприятными факторами прогноза, как экспрессия p53 и потеря экспрессии bcl-2. Отсутствие экспрессии СА9 является неблагоприятным фактором прогноза при светлоклеточном ПКР, который связан с развитием метастазов, причем в большинстве случаев болезнь оказывается метастатической уже на момент диагностики.

Связь потери экспрессии СА9 с метастазами выявляют и другие исследователи [19]. Однако М.Н. Ви́ и соавт. [20] показали, что низкий уровень экспрессии СА9 в первичном светлоклеточном ПКР был неблагоприятным предиктором выживаемости в исследовании, включавшем 321 пациента. Причем у больных с локализованным раком, по их данным, СА9 не имеет прогностического значения (нет различий в выживаемости), а при метастатическом раке низкий уровень экспрессии отражает медиану канцерспецифической выживаемости (5,5 мес против 24,8 мес) с высоким уровнем экспрессии. Кроме того, в одной из работ Z. Pan и соавт. показали, что экспрессия СА9 в метастазах даже выше, чем в первичной опухоли, но объяснения этому феномену не дали [21].

По результатам нашего исследования экспрессия СА9 связана с хорошей безрецидивной выживаемостью ($p = 0,02$), зависимость канцерспецифической выживаемости от экспрессии СА9 рассматривается на уровне тенденции ($p = 0,098$). Полученные нами сведения согласуются с результатами метаанализа данных литературы, проведенного Z. Zhao и соавт. для уточнения прогностической роли СА9 при ПКР [22]. Согласно их выводам, многочисленные исследования, оценивающие СА9 в качестве прогностического маркера для ПКР, имеют противоречивые результаты, но большинство полученных данных позволяют предположить, что низкая экспрессия СА9 ассоциируется с низкой канцерспецифической выживаемостью ($p = 0,006$), плохими общей выживаемостью ($p = 0,002$) и выживаемостью без прогрессирования ($p = 0,02$). Некоторые исследователи не находят прогностического значения экспрессии СА9 [8, 23].

Полученные нами результаты и данные литературы указывают на потенциал СА9 как ценного биологического маркера для прогнозирования течения заболевания у пациентов со светлоклеточным ПКР.

Кроме того, в последнее время СА9 придается большее значение как потенциальному эффективному биологическому маркеру для определения наилучшего курса лечения в отношении конкретных пациентов.

Вывод

Потеря экспрессии СА9 является неблагоприятным фактором прогноза при светлоклеточном ПКР, связана с развитием метастазов и рецидива заболевания, низкой безрецидивной выживаемостью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2016. [Malignant tumors in Russia in 2014 (morbidity and fatality). Ed. by: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow, 2016. (In Russ.)].
2. Матвеев В.Б., Волкова М.И. Рак почки. Русский медицинский журнал 2007;15(14):1094. [Matveev V.B., Volkova M.I. Kidney cancer. Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal 2007;15(14):1094. (In Russ.)].
3. Алексеев Б.Я., Калпинский А.С., Нюшко К.М. и др. Определение факторов прогноза эффективности терапии бевацизумабом у больных метастатическим почечно-клеточным раком. Онкоурология 2013;(3):17–23. [Alekshev B.Ya., Kalpinskiy A.S., Nyushko K.M. et al. Determination of factors for the forecast of the efficiency of therapy with bevacizumab at patients with metastatic renal cell carcinoma. Onkourologiya = Oncourology 2013;(3):17–23. (In Russ.)].
4. Takacova M., Bartosova M., Skvarkova L. et al. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2013;5(1):191–7. PMID: 23255918; PMCID: PMC3525455; DOI: 10.3892/ol.2012.1001.
5. Oosterwijk E., Ruiter D.J., Hoedemaeker P.J. Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int J Cancer* 1986;38(4):489–94. PMID: 2428759.
6. Oosterwijk-Wakka J.C., Boerman O.C., Mulders P.F., Oosterwijk E. Application of Monoclonal Antibody G250 Recognizing Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2013;14(6):11402–23. PMID: 23759990; PMCID: PMC3709739; DOI: 10.3390/ijms140611402.
7. Stillebroer A.B., Mulders P.F., Boerman O.C. et al. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol* 2010;58(1):75–83. PMID: 20359812.
8. Leibovich B.C., Sheinin Y., Lohse C.M. et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25(30):4757–64. PMID: 17947723; DOI: 10.1200/JCO.2007.12.1087.
9. Muriel López C., Esteban E., Berros J.P. et al. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2012;10(4):262–70. DOI: 10.1016/j.clgc.2012.06.005.
10. Muriel López C., Esteban E., Astudillo A. et al. Predictive factors for response to treatment in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2012;30(6):2443–9. DOI: 10.1007/s10637-012-9836-4.
11. Zhang B.Y., Thompson R.H., Lohse C.M. et al. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is not an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) after long-term follow-up. *BJU Int* 2013;111(7):1046–53. DOI: 10.1111/bju.12075.
12. Tostain J., Li G., Gentil-Perret A., Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer* 2010;46(18):3141–8. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.07.020.
13. Горбань Н.А., Иванова С.В., Карякин О.Б. и др. Клиническое значение маркеров пролиферации и апоптоза в светлоклеточном варианте почечно-клеточного рака. Онкоурология 2014;(1):30–5. [Gorban' N.A., Ivanova S.V., Karyakin O.B. et al. Clinical value of both proliferation markers and apoptosis in the clear-cell carcinoma. *Onkourologiya = Oncourology* 2014;(1):30–5. (In Russ.)].
14. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press, 2004.
15. Genege E.M., Ghebremichael M., Najarian R. et al. Carbonic anhydrase IX expression in renal neoplasms: correlation with tumor type and grade. *Am J Clin Pathol* 2010;134(6):873–9. PMID: 21088149; PMCID: PMC3778911; DOI: 10.1309/AJCP57HNJMSLZ.
16. Mickley A., Kovaleva O., Kzhyskowska J., Gratchev A. Molecular and immunologic markers of kidney cancer-potential applications in predictive, preventive and personalized medicine. *EPMA J* 2015;6:20. DOI: 10.1186/s13167-015-0042-2.
17. Uzunlar A.K., Sahin H., Yilmaz F., Ozekinci S. Expression of p53 oncoprotein and bcl-2 in renal cell carcinoma. *Saudi Med J* 2005;26 (1):37–41. PMID: 15756350.
18. Warburton H.E., Brady M., Vlatković N. et al. p53 regulation and function in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2005;65(15):6498–503. PMID: 16061625; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0017.
19. Chamie K., Klöpfer P., Bevan P. et al. Carbonic anhydrase-IX score is a novel biomarker that predicts recurrence and survival for high-risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the phase III ARISER clinical trial. *Urol Oncol* 2015;33(5):204.e25–33. PMID: 25823535; DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.02.013.
20. Bui M.H., Visapaa H., Seligson D. et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and K167 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004;171(6 Pt 1):2461–6. PMID: 15126876.
21. Pan Z., Grizzle W., Hameed O. Significant variation of immunohistochemical marker expression in paired primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2013;140(3):410–8. PMID: 23955461; DOI:10.1309/AJCP8DMPEIMVH6YP.
22. Zhao Z., Liao G., Li Y. et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX immunohistochemical expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 2014;9(11):e114096. PMID: 25426861; PMCID: PMC4245260; DOI: 10.1371/journal.pone.0114096.
23. Choueiri T.K., Cheng S., Qu A.Q. et al. Carbonic anhydrase IX as a potential biomarker of efficacy in metastatic clear-cell renal cell carcinoma patients receiving sorafenib or placebo: analysis from the treatment approaches in renal cancer global evaluation trial (TARGET). *Urol Oncol* 2013;31(8):1788–93. DOI: 10.1016/j.urolonc.2012.07.004.