

Діагностичне значення молекулярних маркерів у хворих на нирково-клітинний рак

В.М. Григоренко¹, Г.В. Панасенко², Н.О. Сайдакова¹, Л.В. Перета¹, А.П. Онищук³, Р.О. Данилець¹

¹ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

³Волинська обласна клінічна лікарня, м. Луцьк

Нирково-клітинний рак (НКТ) – одна з найбільш поширених нозологічних одиниць серед онкологічної патології. При своєчасному зверненні сучасні методи променевої діагностики дозволяють виявити малі ниркові новоутворення та провести органозберігальне лікування. Проте відсутність симптоматики на перших стадіях зумовлює пошук онкомаркерів в якості скринінгу для проведення оптимального радикального лікування НКТ.

У групу дослідження увійшло 32 хворих на НКТ за період з лютого 2014 по червень 2015 року, прооперованих в ДУ «Інститут Урології НАМН України», та плазма крові 14 умовно здорових осіб.

Метою дослідження був пошук епігенетичних онкомаркерів для скринінгу та ранньої діагностики НКТ. Проведено визначення експресії мікро-РНК-30 та мікроРНК-138 у хворих на НКТ до оперативного втручання та умовно здорових осіб. Отримані результати вказують на високі рівні експресії мікроРНК-30с та мікроРНК-138 у хворих із світлоклітинною формою захворювання.

Для впровадження в практику тестових систем для ранньої діагностики та скринінгу захворювання вказані епігенетичні маркери потребують подальшого вивчення на більш структурно глибоких рівнях регуляції канцерогенезу.

Ключові слова: нирково-клітинний рак, мікроРНК, діагностика.

За останнє століття за рівнем захворюваності та смертності онкопатологія перемістилася з десятого місця на друге, поступаючи лише хворобам серцево-судинної системи. За даними ВООЗ, щороку кількість хворих на онкозахворювання збільшується на 10 млн осіб; смертність від раку до 2030 року зростає на 45% порівняно з рівнем 2007 року.

Нирково-клітинний рак (НКТ) становить до 3% усіх злоякісних новоутворень. Щорічно у світі реєструють 189,1 тис. нових випадків захворювання, в Україні їх діагностують понад 5 тис., і чисельність випадків продовжує зростати. Сучасні методи лікування дозволяють досягти тривалої виживаності хворих за умов ранньої діагностики. Діагностичні можливості, якими володіє клінічна онкоурологія, дозволяють виявити малі ниркові новоутворення при своєчасному зверненні, що залишається проблемним питанням у зв'язку з відомими особливостями НКТ. Разом з тим, рання, доклінічна, діагностика потребує подальшого вивчення різних механізмів канцерогенезу та пошуку нових молекулярних онкомаркерів. У той самий час, коли широко застосовуються маркери пухлинного росту для діагностики та контролю за перебігом раку передміхурової залози, сечового міхура, яєчка, роботи з пошуку молекулярних онкомаркерів НКТ перебувають лише на початковому етапі.

В основі неопластичної трансформації лежать стабільні генетичні пошкодження, що передаються під час ділення, які можуть впливати на процеси проліферації, диференціювання і загибелі клітин та відображаються на фенотипі і біологічних властивостях пухлини. Деякі хромосомні аберації достатньо

специфічні. Поява можливості послідовного молекулярного клонування та ідентифікація генів, що локалізовані в пошкоджених локусах, дозволяє використовувати їх в діагностиці і прогнозуванні клінічного перебігу пухлинного процесу. Вперше класифікація НКТ на основі генетичних ознак запропонована Kovacs (1989). З 1996 р. виділяються 4 форми НКТ, а саме: традиційний (світлоклітинний, непапілярний), папілярний (хромофільний), хромофобний рак і рак збірних протоків. Кожна з них має характерні специфічні генетичні альтерації, а саме різний клінічний перебіг і чутливість до проведеного лікування [1–4].

На сьогодні найбільш вивченим в зазначеному аспекті є світлоклітинний (непапілярний) рак, що складає 75% всіх епітеліальних пухлин нирки та характеризується наявністю делеції короткого плеча хромосоми 3p. Тільки в пухлинах даного типу має місце мутація гену VHL (von Hippel-Landau). Іншими специфічними генетичними змінами непапілярного НКТ є дуплікація хромосомного локуса 5q22 і делеції в областях 6q, 8p, 9p і 14q [4]. Згідно дослідження, проведеного Ljungberg et al. (1996), даний тип НКТ виділяється поміж інших частотою інфільтративного росту із судинною інвазією, високим метастатичним потенціалом і відповідно гіршою виживаністю [5].

У світі проводяться численні дослідження (у тому числі і на базі ДУ «Інститут урології НАМН України» по вивченню генів-супресорів пухлин, локалізованих на короткому плечі хромосоми 3 людини, результати яких переконливо підтверджують їхній розподіл за генетичною класифікацією. Зокрема, за допомогою метил-специфічної полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) визначалося метилування генів-супресорів пухлин *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC*, *RARB* для порівняння відповідності їхнього статусу в складі геномної ДНК пухлини та позаклітинної ДНК з плазми крові. Дослідженням доведено можливість використання позаклітинної ДНК плазми крові (визначення концентрації в плазмі крові та метилування промоторів генів) в якості маркера неінвазивної діагностики раку на ранніх стадіях. [6]

Однак на метилування генів-супресорів пухлин впливають багато епігенетичних факторів, у тому числі мікро-РНК – клас некодируючих молекул РНК (21-22 нуклеотид в довжині), що беруть участь у регуляції трансляції та деградації матричної РНК (мРНК), а в подальшому – в процесі канцерогенезу. Епігенетичні зміни відбуваються через механізм РНК-інтерференції. При цьому комплекс мікро-РНК і ферментів може призводити до метилування нуклеотидів в ДНК промотора гена, що служить сигналом для зменшення активності гена. При використанні іншого типу регуляції мРНК, комплементарна мікро-РНК, деградує. Однак є й мікро-РНК, які збільшують, а не зменшують експресію генів [7–9]. Дослідження з пошуку можливих онкомаркерів епітеліальних пухлин, у тому числі НКТ, визнані актуальними і достатньо широко представлені в світі. Це мотивувало необхідність визначити у хворих із світлоклітинною формою

Програма параметрів термальних циклів ПЛР із зворотною транскрипцією

Тип шага	Время, мин	Температура (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	30	85
HOLD	∞	4

Таблиця 2

Програма параметрів термальних циклів ПЛР в реальному часі

Температура (°C)	Время	Количество циклов
50	2 min	1
95	10min	1
95	15s	40
60	15s	
72	15s	

одночасно як гіперметилування пкДНК генів-супресорів пухлин, так і експресію мікроРНК. За допомогою отриманих даних щодо генетичного атласу людини було обрано прогностично значущі мікро-РНК 138 та мікро-РНК 30с [10–18].

Мета дослідження: пошук епігенетичних онкомаркерів для скринінгу та ранньої діагностики НКР.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженні було використано плазму крові до операції 32 хворих, прооперованих в ДУ «Інститут Урології НАМН України» за період з лютого 2014 по червень 2015 року, та плазму крові 14 умовно здорових осіб, наданих з їхньої згоди. Середній вік хворих склав $55,0 \pm 1,4$ року (26–77). Серед них чоловіків було 24 (52,17%), жінок – 22 (47,83%). Хворі до оперативного втручання були обстежені згідно протоколів Міністерства охорони здоров'я.

Органозберігальне лікування проведено у 22 (68,75%) хворих, нефректомія – у 10 (31,25%). Після патогістологічного висновку у всіх хворих було діагностовано світлоклітинний НКР. За даними морфологічного дослідження стадія I була встановлена у 15 (53,17%) осіб, II – в 11 (34,38%), III – у 5 (15,63%), IV – в 1 (3,16%). За ступенем ядерного поліморфізму Фурман I виявлено у 6 (18,75%) хворих, Фурман II – у 13 (40,63%), Фурман III – у 12 (37,5%) та Фурман IV – в 1 (3,12%).

Середній вік умовно здорових осіб – $35,0 \pm 0,5$ року (23–57), чоловіків було 6 (42,85%), жінок – 8 (57,15%). Середній період спостереження хворих становив $21 \pm 3,5$ міс, протягом якого рецидивів або поширення НКР виявлено не було.

У роботі досліджували мікро-РНК 138 та мікро-РНК-30с по відношенню до нормуючої мікро-РНК U6. Нормуючі мікроРНК визначаються в біологічних рідинах у хворих і здорових осіб в однакових концентраціях.

Методика. Зразки крові транспортувались на льоду при $+4^\circ\text{C}$ та зберігались до отримання з них плазми не більше 4 год. Забір крові проводили в пластикові пробірки об'ємом 5 мл, що містили ЕДТА (етилендіамінтетраоцтову кислоту) в якості антикоагулянта в концентрації 1,5 мг сухого реагенту на 1 мл крові. Кров відстоювали протягом 2–4 год при $+4^\circ\text{C}$, ретельно відбирали вільну від еритроцитів фракцію крові, переносили у нові центрифужні пробірки і поетапно центрифугували при $+4^\circ\text{C}$, кожен раз переносючи супернатант у нову центрифужну пробірку: 1500 об/хв протягом 7 хв, 1800 об/хв – 8 хв, 2200 об/хв – 10 хв. Таким чином, з 10 мл крові отримували від 2 до 4,5 мл плазми у здорових донорів і 3,5–5,5 мл у хворих. Плазму фасували у пробірки по 200 мл і зберігали

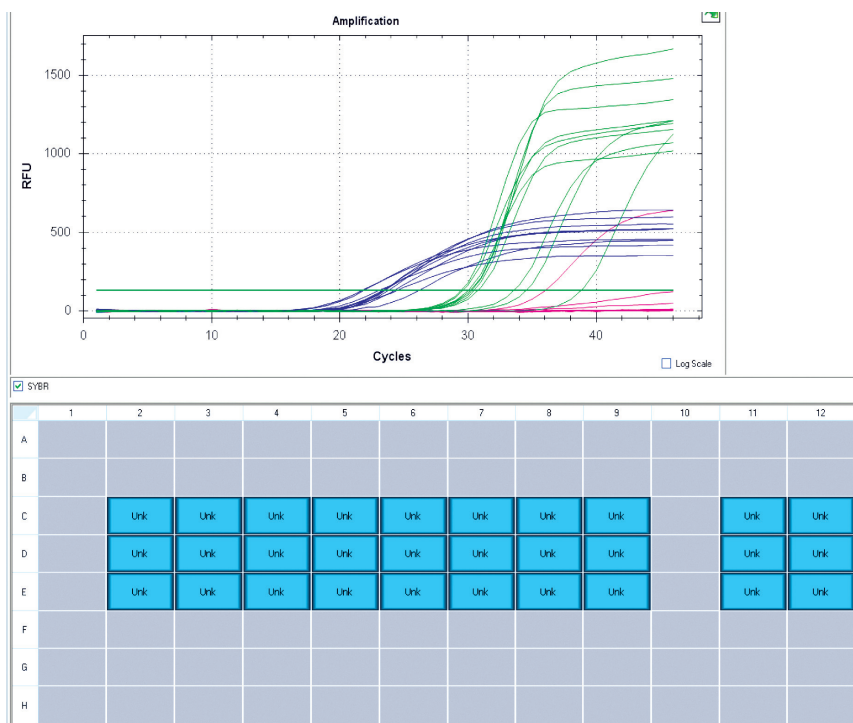
при -70°C . Отриману плазму використовували для виділення та визначення концентрації обраних мікро-РНК.

З плазми крові було виділено мікроРНК, її експресія кількісно вимірювалася в двокроковій полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), з раніше підібраними праймерами до мікро-РНК: першим етапом була ПЛР зі зворотною транскрипцією, а далі використовувалася ПЛР в режимі реального часу у приладі для проведення ампліфікації у режимі реального часу «iCycler CFX96» («Bio-Rad», США).

При екстракції мікро-РНК за міжнародним протоколом, спочатку проводили гомогенізацію зразків, до 250 мкл лізату додавали 750 мкл денатуруючий розчин (розчин D) для отримання лізату клітин. Послідовно до 1 мл лізату брали: 0,1 мл 2 М ацетату натрію, рН 4,0, ретельно перемішували струшуванням; 1 мл води, насиченого фенолом, ретельно перемішували струшуванням; 0,2 мл хлороформу/ізоамілового спирту (49:1) енергійно струшували з допомогою руки протягом 10 с. Протягом 15 хв зразки охолоджувалися на льоду, потім центрифугували протягом 20 хв при 10000 g при $+4^\circ\text{C}$.

Переносили стерильною піпеткою верхню водну фазу, яка головним чином містить РНК, в чисту пробірку. У водну фазу додавали 1 мл ізопропілового спирту, щоб осадити РНК, та інкубували зразки протягом не менше 1 год при -20°C . Після цього, використавши центрифугування протягом 20 хв при 10000 g при 4°C і відібравши супернатант, отримували гелеподібний РНК осад. Таким чином була проведена перша преципітація. При повторній преципітації розчинили отриманий осад РНК в 0,3 мл розчину D. Після перенесення зразків у 1,5 мл мікроцентрифужні пробірки додавали 0,3 мл ізопропанолу. Проводили інкубацію протягом принаймні 30 хв при -20°C з наступною центрифугою протягом 10 хв при 10000 g при 4°C і відбирали супернатант. Для промивання РНК додавали 0,5–1 мл 75% етанолу і ретельно перемішували протягом декількох секунд на вортексі. Для розчинення можливих залишкових слідів гуанідин при кімнатній температурі інкубували зразки протягом 10–15 хв. Наступним етапом центрифугували протягом 5 хв при 10000 g при $+4^\circ\text{C}$ і відбирали супернатант, що висушували протягом 5–10 хв при кімнатній температурі. Розчинивши осад РНК в 100–200 мкл води, вільної від РНК, протягом 10–15 хв при $+6^\circ\text{C}$ визначали концентрацію виділеної РНК за допомогою спектрофотометра Nano Drop 2000 («ThermoScientific», США), оптична щільність препаратів з РНК була A260/A280.) Отримані зразки зберігали до використання при -20°C [19].

Ревертазну транскрипцію проводили за допомогою набору



Визначення експресії досліджуваних мікроРНК у зразках плазми із виділеними РНК, ПЛР в реальному часі
 (1-й ряд пробірок – мікроРНК-30с, на графіку позначено синім кольором експресію;
 2-й ряд пробірок – мікро-РНК-138, на графіку позначено рожевим кольором експресію;
 3-й ряд пробірок – нормуюча мікро-РНКU6, на графіку позначено синім кольором

Taq Man MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) за наступним протоколом: перед початком роботи готували ревертазну суміш, MasterMix: у поліпропіленовій пробірці додавали 0,15 мкл нуклеозидтрифосфату (dNTP), 1 мкл ревертазних ферментів (50 U/мкл), 1,5 мкл 10-кратного ревертазного буферу, 0,19 мкл ренк-азних інгібіторів (20 U/мкл), 4,16 мкл вільної від РНК води, 3 мкл специфічного праймеру обраних мікро-РНК та 5 мкл зразка виділеної РНК. Отриману суміш перемішували обережно, інкубація 5 хв, після чого пробірки із зразками проводили через програму термальних циклів, ПЛР із зворотною транскрипцією (табл. 1).

Також згідно міжнародного протоколу було проведено ПЛР у реальному часі зразків із виділеною мікро-РНК із застосуванням Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X), (Thermo Fisher Scientific, США).

За кімнатної температури у поліпропіленовій пробірці для приготування 1-го зразка змішували 12,5 μM набору Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X), 0,3 μM відповідного праймеру (досліджуваної мікро-РНК), 0,3 μM ревертазного праймеру, безпосередньо 10 мкл виділеного зразку РНК та вільної від РНК води до 25 мкл. Отриману суміш перемішували обережно, інкубація 5 хв, після чого пробірки із зразками проводили через програму термальних циклів, ПЛР, реальний час (табл. 2).

Усі нуклеотидні послідовності були отримані з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою алгоритмів Clustal W. (Vector NTI 10, Invitrogen) та сервису BLASTN (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені дослідження вказують на високі рівні експресії мікроРНК-30с та мікроРНК-138 у хворих із світлоклітинною формою НКР. Для уточнення специфічності

можливих онкомаркерів на даний момент виконуються дослідження референтних значень експресії досліджуваних мікроРНК в умовно здорових осіб в порівнянні із нормуючою мікроРНК U6 (на етапі завершення). Процедура дослідження проводилася не більше 10–15 зразків одночасно, з метою отримання достовірних результатів. Ампліфікацію кожного зразка здійснювали у 2-х повторях. Для ілюстрації отриманих даних представлено графік ПЛР в реальному часі перших десяти пацієнтів. У наступних зразках 22 хворих отримані подібні дані (малюнок).

Згідно обчислення за формулами $-\Delta\Delta Ct$ та відносної стандартної кривої отримано результати, що свідчать про високу специфічність досліджуваних мікроРНК.

Таким чином, згідно обчисленням визначено, що мікроРНК-30с є up-regulated, її експресія починається на 10–15 циклів раніше (залежно від зразка плазми), ніж нормуюча мікро-РНК, а мікро-РНК 138 є down-regulated, визначається на 15–20 циклів пізніше. Після отримання кінцевих результатів по експресії досліджуваних мікроРНК в умовно здорових осіб обчислення чутливості та специфічності буде проводитися за допомогою порівняння Ct та побудови релятивної стандартної кривої.

ВИСНОВКИ

Отримані результати роботи свідчать про можливість використання мікро-РНК 138 та мікро-РНК-30с (визначення концентрації в плазмі крові) в якості онкомаркерів НКР. Для впровадження в практику тестових систем для ранньої діагностики та скринінгу захворювання вказані епігенетичні маркери потребують подальшого вивчення на більш структурно глибоких рівнях регуляції канцерогенезу. Отримані таким чином результати дослідження вказаних мікро-РНК дозволяють прийти до остаточного висновку щодо можливо-го застосування в прогнозуванні перебігу НКР та відповіді на лікування.

Диагностическое значение молекулярных маркеров у больных почечно-клеточным раком
В.Н. Григоренко, Г.В. Панасенко, Н.О. Сайдакова, Л.В. Перета, А.П. Онищук, Р.О. Данилец

The diagnostic value of molecular markers in patients with renal cell carcinoma
V.N. Grigorenko, G.V. Panasenko, N.O. Saydakova, L.V. Shove, A.P. Onischuk, R.O. Danilets

Почечно-клеточный рак (ПКР) – одна из наиболее распространенных нозологических единиц среди онкологической патологии. При своевременном обращении современные методы лучевой диагностики позволяют выявить малые почечные новообразования и провести органосохраняющее лечение. Однако отсутствие симптоматики на ранних стадиях обуславливают поиск онкомаркеров в качестве скрининга для проведения оптимального радикального лечения ПКР. В исследовательскую группу вошли 32 пациентов НКР за период с февраля 2014 года по июнь 2015, прооперированных в ГУ «Институт Урологии НАМН Украины», и плазму крови 14 условно здоровых лиц. Целью исследования является поиск эпигенетических онкомаркеров для скрининга и ранней диагностики НКС. Проведено определение экспрессии микро-РНК-30 и микроРНК-138 у больных с НКР до оперативного вмешательства и условно здоровых лиц. Полученные результаты указывают на высокие уровни экспрессии микроРНК-30с и микроРНК-138 у больных с светлоклеточной формой заболевания. Для внедрения в практику тестовых систем для ранней диагностики и скрининга заболевания указанные эпигенетические маркеры требуют дальнейшего изучения на более структурно глубоких уровнях регуляции канцерогенеза.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, микроРНК, диагностика.

Renal cell carcinoma (RCC) - one of the most common pathology of cancer. With timely treatment modern methods of radiation diagnosis can detect small renal masses and carry out organ treatment. However, the absence of symptoms in the early stages, determine the search of tumor markers as screening for optimal radical treatment of RCC.

In the study group included 32 patients with RCC for the period from February 2014 to June 2015, operated in SI «Urology Institute of Medical Sciences of Ukraine», and 14 suspended plasma of healthy individuals.

The aim of study is epigenetic search for tumor markers for screening and early diagnosis of RCC. A determination of the expression of micro-RNA-30 and miR-138 conducted in patients with RCC before surgery and conditionally healthy individuals. The results indicate the high expression levels of miR-30s and miR-138 in patients with clear cell form of the disease.

For implementation in practice of testing systems for the screening and early diagnosis of diseases these epigenetic markers require further study at a deep structural level regulation of carcinogenesis.

Key words: renal cell carcinoma, microRNA, diagnostics.

Сведения об авторах

Григоренко Вячеслав Николаевич – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а; тел.: (044) 486-66-60

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. 2004. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. World Health Organization Classification of Tumours. Lyons: IARC Press: 7.
- Delahunt B., Eble J.N., Mc Credie M.R. et al. 2001, June. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. Hum Pathol 32(6):590–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431713>
- Pignot G, Elie C, Conquy S et al. 2007, Feb. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. Urology 69(2): 230–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275070>
- Матвеев Б.П. 2011. Клиническая урология: 38–40.
- Ljungberg B., Mehle C., Stenling R., Roos G. Br J Cancer. 1996, Jul. Heterogeneity in renal cell carcinoma and its impact no prognosis – a flow cytometric study. 74(1): 123–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8679445/>
- Скрипкина І.Я., Онищенко К.В., Кашпарова О.М. та ін. 2015. Визначення статусу метилювання генів LRRС3В, RASSF1A, APC на позаклітинній ДНК та ДНК пухлини хворих із нирково-клітинним раком. Здоровье мужчины № 2 (53): 166–177.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. 2006. MicroRNA as oncogenes and tumor suppressors. Dev.Biol. – Т. 3, № 1: 11–14.
- Heneghan H., Miller M.N., Kerin M.J. 2010. MiRNA as biomarkers and therapeutic targets in cancer. Curr. Opin.Pharmac. T.№10: 543–550.
- Kristen M., Nelson J.W., Glen J.W. 2008. MicroRNA and cancer: past, present and potential future // Mol.Cancer Ther. Vol.7: 3655–3660.
- Heinzelmann J. et al. Ann Surg Oncol. 2014 Mar. MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases. 21(3): 1046–54. doi: 10.1245/s10434-013-3361-3. Epub 2013 Nov 18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24242678>
- Mathew L.K. et al. Cancer Discov. 2014 Jan. Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinoma enhances HIF2α activity. 4(1): 53–60. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0291. Epub 2013 Nov 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24189146>
- Huang J. et al. Cancer Sci. 2013 Dec. Hypoxia-induced downregulation of miR-30c promotes epithelial-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma. 104(12):1609–17. doi: 10.1111/cas.12291. Epub 2013 Oct 27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24112779>
- Poudel S., Song J., Jin E.J., Song K. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb Sulfuretin-induced miR-30 Cselectively downregulates cyclin D1 and D2 and triggers cell death in human cancer cell lines. 15; 431(3):572-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.012. Epub 2013 Jan 11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318178>
- Heinzelmann J. et al. World J Urol. 2011 Jun. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. 29 (3):367–73. doi: 10.1007/s00345-010-0633-4. Epub 2011 Jan 13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21229250>
- Zhang Z. et al. Mol Cell Biochem. 2014 Jul. Selective expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated by microRNA suppresses renal carcinoma growth. 392 (1–2):125-34. doi: 10.1007/s11010-014-2025-3. Epub 2014 May 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788726>
- Liang J., Zhang Y. et al. Oncol Res. 2013. MiR-138 induces renal carcinoma cell senescence by targeting EZH2 and is downregulated in human clear cell renal cell carcinoma. 21(2):83–91. doi: 10.3727/096504013X13775486749218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406044>
- Girgis A.H., Iakovlev V.V., Beheshti B. et al. Cancer Res. 2012 Oct. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. 15;72(20):5273-84. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0656. Epub 2012 Aug 27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22926558>
- Song T., Zhang X. et al. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2011. MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor 16 (HIF-16) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. 12 (5): 1307 – 11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875287>
- Chomczynski P. & Sacchi N. Nature protocols. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. – Vol. 1, № 2: 581–585.

Статья поступила в редакцию 16.03.2016