

Выделение и анализ экзосомальной микро-РНК из мочи: новый метод диагностики рака предстательной железы

Extraction and analysis of the exosomal micro-RNA from the urine: new method of the prostate cancer diagnostics

R.B. Samsonov, T.A. Shtam, V.S. Burdakov, A.S. Glotov, E.V. Tsyrlina, A.K. Nosov, V.I. Evtushenko, M.V. Filatov, A.V. Malek

Prostate cancer (PCa) is one of the actual social and medical problems, taking the leading positions in the structure of male diseases. Currently prostate-specific antigen (PSA) evaluation is due to its availability and objectivity the main non-invasive screening and diagnostics modality, being used also post-operatively to control for the treatment efficacy. Specificity and sensitivity of the PSA are not high, this warrants the search for new markers and development of new diagnostic concepts. Micro-RNA (miRNA) are short RNA molecules, regulating expression of more than half of all protein-coding genes at the post-transcriptional level. miRNA are being also excreted into the extracellular matrix and could be detected in most biological fluids. miRNA stability in the extracellular matrix and in the biological fluids is ensured via the complex formation with proteins, lipoproteins and packing into the membrane vesicles, exosomes. The active secretion of the exosomes, containing specific sets of the miRNAs, is described for many cells, including tumor cells. Exosomes, secreted by the tumor cells, show some pathologic effects: inhibition of the anti-tumor immune reactions, speed up of the metastatic spread and resistance to therapeutic substances. miRNA, secreted by the tumor cells, are the main mediators of these effects. Several works were already published aimed at the development of the scientific basis for PCa diagnostic tests, based on the exosomal miRNA detection. Integration of this methods in the clinical practice is complicated because of the absence of simple and reproducible method of exosome extraction from the urine. Development and approbation of this methods was the aim of this work.

Р.Б. Самсонов^{1,4}, Т.А. Штам², В.С. Бурдаков², А.С. Глотов³, Е.В. Цырлина¹, А.К. Носов², В.И. Евтушенко⁴, М.В. Филатов², А.В. Малек^{1,2}

¹ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

²ПНИФ НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

³Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург

⁴ФГБУ РНЦРХТ Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Рак предстательной железы (РПЖ) имеет лидирующие показатели в структуре мужской онкологической заболеваемости и смертности [1]. В настоящее время основным методом ранней и неинвазивной диагностики РПЖ является оценка уровня простат-специфического антигена (ПСА) – гликопротеина, секретлируемого эпителием предстательной железы. Ценность метода определяется его простотой и объективностью, но при этом показатели чувствительности и специфичности (прогностической значимости) не превышают, по разным оценкам, 70% и 50%, соответственно. Клиническая значимость этого маркера несколько возрастает при анализе уровня общего ПСА и соотношения его фракций (свободной, связанной). Тем не менее, повышение ПСА может сопровождать не онкологические патологии предстательной железы, а прогрессирование низкодифференцированного РПЖ может не отражаться на уровне циркулирующего маркера. Трактовка клинического значения повышенного ПСА является не тривиальной проблемой, и это стимулирует поиск новых маркеров и разработку новых диагностических подходов. В настоящее время на стадии испытаний находятся несколько новых методов (PCA3/DD3, 4Kscore, TMPRSS2-ERG), сравнитель-

ный анализ которых представлен в ряде обзорных публикаций [2, 3]. Выделение из мочи или плазмы мембранных микровезикул (экзосом) и анализ их биохимического состава обсуждается в этих статьях как один из перспективных методов ранней и специфической диагностики РПЖ.

Экзосомы – это мембранные везикулы размером 100-200 нм, секретлируемые практически всеми типами клеток [4]. Экзосомы формируются в клеточной цитоплазме в составе т.н. «мультивезикулярных телец» (MVB, multivesicular bodies) и высвобождаются во внеклеточное пространство после слияния клеточной мембраны и мембраны мультивезикулярного тельца [5]. До недавнего времени считалось, что секреция экзосом является «санитарным» процессом очистки клетки от ненужных веществ. Однако исследования последних лет показали, что экзосомы опосредуют межклеточный обмен веществ и информации [6]. Экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками, играют важную роль в различных аспектах прогрессии заболевания: локальной инвазии, подавлении противоопухолевых иммунных реакций, стимуляции неоангиогенеза и формировании отдаленных метастазов [7]. Кроме того, биохимический состав экзосом сохраняет признаки секретлирующей их клетки. Этот важный

феномен определяет огромный диагностический потенциал экзосом, которые могут быть выделены из большинства биологических жидкостей, включая мочу.

В настоящее время рядом исследований показано, что биохимический состав экзосом, выделенных из плазмы или мочи больных РПЖ, отличается от состава экзосом здоровых доноров. В основном исследования направлены на анализ белкового состава экзосом и «профайлинг» экзосомальных миРНК [8, 9]. С учетом структурных и биологических особенностей молекул миРНК, регулирующих экспрессию генома на пост-транскрипционном уровне, анализ экзосомальной фракции миРНК представляется одним из перспективных направлений развития диагностических технологий [10]. Значимым этапом на пути развития метода явился анонс положительных результатов клинических испытаний нового теста – «Prostate Cancer Liquid Biopsy Test» – основанного на анализе миРНК экзосом, выделенных из мочи, сделанный компанией Exosomes Diagnostics.

Однако внедрение новой методики в клиническую практику задерживается из-за отсутствия стандартного способа выделения экзосом. Эта технологическая проблема активно обсуждается в современной литературе [11]. В основе существующих методов лежат предположения о специфических характеристиках физической плотности, нано-размерности или наличии специфических белковых маркеров на поверхности экзо-

сом. Существование принципиально различных подходов свидетельствует об отсутствии оптимального метода. Так, основной проблемой является гетерогенность популяции экзосом в составе любой биологической жидкости в плане как физических так и биохимических характеристик [12, 13]. Кроме того, любая биологическая жидкость, в том числе и моча, содержит комплексы молекул или субклеточных образований, которые могут иметь физические или биохимические характеристики, аналогичные экзосомальным. Поэтому, ни один из существующих методов выделения экзосом не может гарантировать получения «всех и только» экзосом.

Цель работы – разработка нового метода выделения экзосом из мочи, в основе которого лежит феномен взаимодействия гликосахаридов на поверхности экзосом с лектинами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал. Исследование было одобрено этическим комитетом НИИ Онкологии им. Н.Н. Петрова. Характеристика пациентов (n=25) приведена в таблице 1. Соответствующая по возрасту контрольная группа (n=25) была представлена здоровыми мужчинами, не имеющими клинических проявлений РПЖ с уровнем ПСА менее 4 нг/мл.

Образцы мочи центрифугировали (3000 xg, 15 мин., +4°C), супернатант хранили при температуре минус 80°C.

Выделение экзосом. Для выделения экзосом пробы мочи размораживали до +4°C и центрифугировали (20000 xg, 45 мин) для удаления клеточного детрита, инкубировали с Конканавалином А (2 мг/л) на качалке при +4°C в течение ночи и снова центрифугировали при 20000 xg, 90 мин. Осадок, содержащий экзосомы, растворяли в фосфатно-солевом буфере и хранили при минус 80°C.

Динамическое светорассеяние (ДСР). Измерения производили на Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Клетки и клеточные остатки удаляли центрифугированием мочи (20000 xg, 45 мин) перед анализом, который проводили при +23°C в соответствии с инструкциями изготовителя.

Вестерн-блот. Образцы были лизированы (0,05 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 (Sigma Aldrich, USA) в течение часа, при +4°C. После центрифугирования (17 000 xG, 20 минут, +4°C), экстракты протеинов были нормализованы с помощью BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA). Электрофорез проводился в 10% SDS-PAAG, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер (Laemlli Sample Buffer). Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1% растворе казеина в трис-солевом буфере с твином-20 и инкубировали с антителами против TSG101 или CD9 производства компании Santa Cruz, USA. Визуализацию блотов проводили с помощью вторичных антител, меченых люминесцентной меткой, на аппарате Quantitative Western Blot – LI-COR Biosciences (LI-COR Biotechnology, USA).

Выделение и анализ РНК. РНК из экзосом выделяли с помощью набора для выделения (BioSilica, Россия). Для анализа РНК использовали приборы: NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), и Tape Station 2200 (Agilent Technologies Inc., USA). ■

Таблица № 1. Клиническая характеристика пациентов

| | | РПЖ (25 пациентов) | Контроль (25 здоровых волонтеров) |
|-----------------------------|---------|--------------------|-----------------------------------|
| Возраст, медиана [IQR], лет | | 65 [43-78] | 67 [63-75] |
| ПСА, нг/мл | < 10 | 9 | – |
| | 10 - 20 | 10 | – |
| | ≥ 20 | 6 | – |
| Сумма баллов по Глиссону | < 6 | 0 | – |
| | 6 - 7 | 20 | – |
| | ≥ 8 | 5 | – |
| Стадийность | T1 | 3 | – |
| | T2 | 15 | – |
| | T3 | 7 | – |

ОТ-ПЦР. Для количественного определения уровня миРНК синтезировали кДНК с использованием miRCURY LNA Universal RT microRNA Polyadenylation and cDNA synthesis Kit (Exiqon, Denmark). ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили с использованием Exi-LENT SYBR Green master mix (Exiqon, Denmark) на CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). Список миРНК, включенных в исследование, и соответствующих праймеров приведены в таблице 2.

Все статистические расчеты были выполнены с использованием программного обеспечения MedCalc и GraphPad.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение и характеристика экзосом мочи. Для апробации метода и анализа выделяемых микровезикул использовалась моча здоровых доноров (40 мл). После первого центрифугирования (20000 xg, 45 мин) был получен осадок, содержащий, вероятно, клеточный детрит и крупные везикулы. После инкубации супернатанта с лектином в концентрации ≥ 2 мг/л, и последующего центрифугирования (20000 xg, 90 мин) образовывался едва видимый осадок. Процесс агглютинации экзосом был исследован методом ДСР (рис. 1). После удаления клеток

(3000 xg, 15 мин., +4°C) в моче детектировались два типа частиц размером около 10 и 100 нм. Инкубация с лектином приводила к образованию больших конгломератов со средним размером около 600 нм. Второй этап центрифугирования приводил к полному удалению больших (600 нм) везикул.

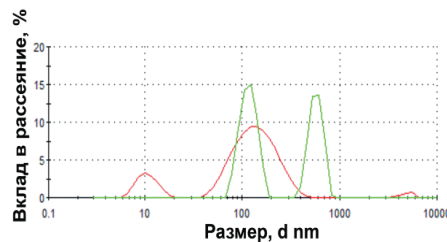


Рис. 1. Анализ содержания наноразмерных везикул в моче до (красная линия) и после (зеленая линия) инкубации с Конканавалином А с помощью метода динамического светорассеяния (аппарат Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK)

Наличие белковых маркеров экзосом (TSG101 и CD9) анализировали с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 2). Следовые количества CD9 были обнаружены в осадке после центрифугирования (20000 xg, 45 мин). Оба экзосомальных маркера (TSG101

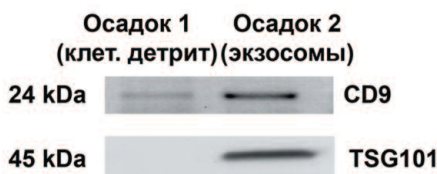


Рис. 2. Вестерн-блот анализ экзосомных маркеров (TSG101, CD9) в осадках, получаемых в процессе последовательного центрифугирования мочи. Первый осадок предположительно содержит клеточный детрит и крупные мембранные везикулы, второй – экзосомы

Таблица 2. Список исследованных микроРНК

| миРНК | Результаты ОТ-ПЦР | | Ссылка | ПЦР праймеры (Exiqon Cat.N) |
|-----------------|-------------------|-----------|-------------|-----------------------------|
| | соотношение Ca/N | P | | |
| Hsa-miR-21-5p | 4,05 | 0,0128 | [15-17] | 204230 |
| Hsa-miR-107 | 1,1 | 0,9781 | [18] | 204468 |
| Hsa-miR-141-5p | 11,7 | 0,0023 | [15,18, 19] | 206088 |
| Hsa-miR-221-5p | * | | [15, 20] | 204032 |
| Hsa-miR-298 | * | | [19] | 204115 |
| Hsa-miR-326 | 2,21 | 0,9912 | [18, 19] | 204512 |
| Hsa-miR-375 | 1,55 | 0,8315 | [18] | 204362 |
| Hsa-miR-432-5p | * | | [18] | 204776 |
| Hsa-miR-574-3p | 3,90 | 0,0017 | [18] | 206011 |
| Hsa-miR-2110 | 1,25 | 0,1911 | [18] | 204328 |
| Hsa-miR-625-5p | * | | [18] | 206999 |
| Hsa-miR-301a-5p | * | | [18] | 206999 |
| U6 snRNA | | Reference | | 203907 |
| Hsa-miR-191-5p | | Reference | | 204306 |

миРНК помеченные * были обнаружены менее чем у половины пациентов и были исключены из дальнейшего анализа.

и CD9) присутствовали в большом количестве в осадке, полученном после инкубации с Конканавалином А и последующего центрифугирования (20000 xg, 90 мин), что подтверждало наличие в нем экзосом. Затем был проведен сравнительный качественный анализ РНК в первом и втором осадках (рис. 3). В профиле РНК первого осадка присутствовали пики, соответствующие двум фракциям рибосомальной РНК (28S и 18S), что характерно для клеточной РНК. Наличие фракции молекул РНК длиной 25-40 пар в первом осадке свидетельствовало о существенной деградации, что ожидаемо для РНК в составе клеточного детрита. В профиле РНК второго осадка пики, отражающие рибосомальную РНК, не наблюдались, но осадок был обогащен РНК с размером 200-2000 нуклеотидов.

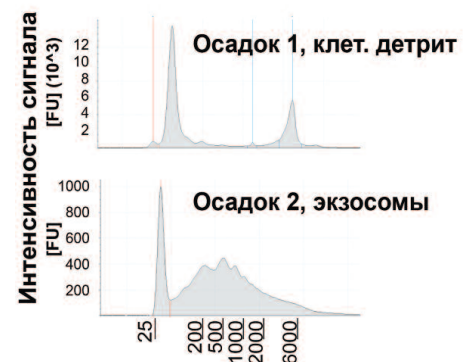


Рис. 3. Анализ РНК, выделенной из осадков в процессе последовательного центрифугирования мочи (Tape Station 2200). Первый осадок предположительно содержит клеточный детрит и крупные мембранные образования, второй - получен после инкубации с конканавалином А и содержит экзосомы

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в моче присутствуют везикулы размером около 100 нм, которые образуют крупные агглютинаты при взаимодействии с лектинами (Конканавалин А). Эти агглютинаты могут быть выделены путем центрифугирования, их белковый состав обогащен экзосомальными маркерами, и они имеют специфический (отличный от клеточного) состав РНК.

Анализ профиля экспрессии миРНК в экзосомах из мочи пациентов с РПЖ. На следующем этапе работы описанный метод был при-

менен для выделения экзосом из мочи пациентов с РПЖ (25) и здоровых доноров (25). Осадок, полученный после поэтапного центрифугирования и содержащий экзосомы, использовали для выделения РНК и последующих реакций обратной транскрипции и ПЦР. ПЦР делали в трех повторениях и оценивали средние значения Ct. Список миРНК, включенных в анализ был сформирован на основе литературных данных (табл. 2) и включал в себя 12 миРНК для которых показано повышенное содержание в плазме или моче больных РПЖ. Из 12 миРНК, пять были обнаружены менее чем в половине образцов мочи пациентов с РПЖ, они были исключены из дальнейшего анализа (обозначены * в таблице 2). Данные, полученные по остальным миРНК, были нормализованы относительно значений полученных для референсных миРНК (U6 мяРНК и has-miR-191-5p) с использованием стандартного подхода ($2^{-\Delta Ct}$ (Ct reference-Ct miR)). Согласно полученным результатам, миРНК-574-3p, миРНК-141-5p и миРНК-21-5p представлены в более высокой концентрации в моче мужчин с РПЖ по сравнению с контрольной группой (рис. 4). Однако эта разница была статистически значима только для миРНК-574-3p и миРНК-141-5p (ANOVA $p < 0,01$).

В заключении, показатели диагностической значимости для трех «маркерных» миРНК были определены с учетом результатов проведенного анализа 25 пациентов с РПЖ и 25 здоровых доноров (табл. 3), соотношение специфичности и чувствительности теста представлено с помощью ROC (receiver operating characteristic) кривой (рис. 5).

Таблица 3. Показатели диагностической значимости для «маркерных» миРНК

| Показатели | Чувствительность | Специфичность | PPV* | NPV* |
|------------|------------------|---------------|------|------|
| miR-574-3p | 0,71 | 0,72 | 0,68 | 0,76 |
| miR-21-5p | 0,66 | 0,8 | 0,75 | 0,66 |
| miR-141-5p | 0,47 | 0,77 | 0,66 | 0,63 |

* PPV- прогностическая ценность положительного результата, NPV- прогностическая ценность отрицательного результата

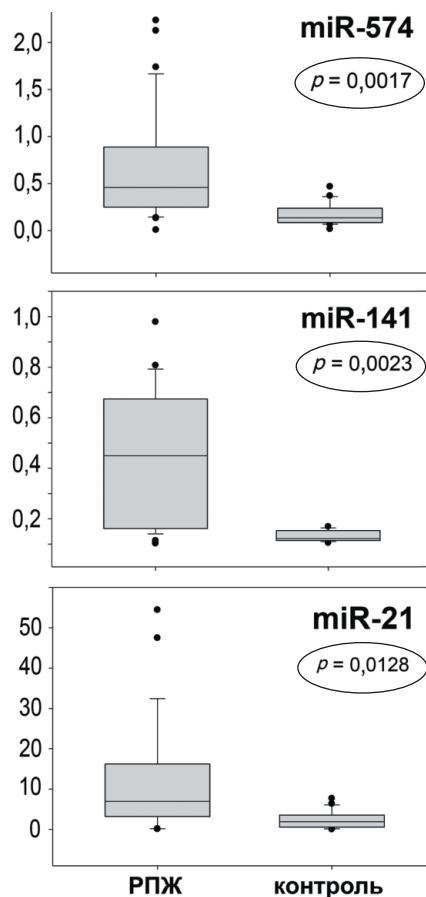


Рис. 4. Сравнительный анализ содержания миРНК в экзосомах, выделенных из мочи пациентов с РПЖ и здоровых доноров, проведенный методом ОТ-ПЦР. Статистический анализ проведен с помощью U-теста Манна и Уитни

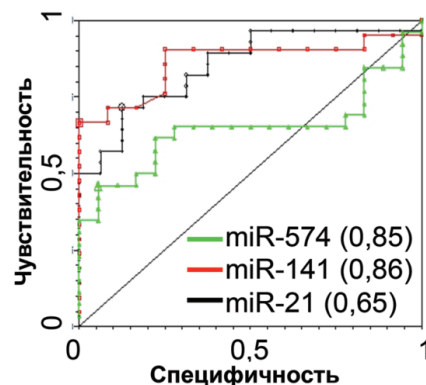


Рис. 5. Оценка диагностической значимости анализа «маркерных» миРНК в экзосомах, выделенных из мочи с помощью построения ROC (receiver operating characteristic) кривой. Были получены следующие статистические показатели: miRNA-574-3p: чувствительность 0,71; AUC ROC 0,85; 95% CI = 0,736-0,964, miR-141-5p: чувствительность 0,66; AUC ROC 0,86; 95% CI = 0,732-0,994 miR-21-5p: чувствительность 0,46; AUC ROC 0,65; 95% CI = 0,477-0,814

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлен новый метод выделения экзосом из мочи, и доказана его пригодность для последующего анализа экзосомальной миРНК. В результате сравнительного анализа экзосомальной миРНК из мочи пациентов с РПЖ и здоровых доноров показано, что развитие РПЖ сопровождается повышением содержания трех миРНК (miR-574-3p, miR-141-5p и miR-21-5p). Чувствительность диагностического теста на основе анализа miR-574-3p оказалась сопоставима с чувствительностью широко используемого в клинической практике теста ПСА (~70%), чувствительность анализа miR-141-5p и miR-21-5p – ниже, чем ПСА (66% и 41% vs. 70%, PSA). В тоже время диагностическая специфичность всех трех «маркерных» миРНК превосходит аналогичные параметры ПСА (72-80% vs. 50%, PSA) (табл. 3). По данным ряда клинических исследований диагностические показатели новой тест-системы ProgenSA, на основе сравнительного анализа уровней экспрессии ПСА-3 (DD3) и PSA, колеблются в диапазоне 53-69% (чувствительность) и 71-83% (специфичность) [14], что сопоставимо с результатами данного исследования. Анализ экспрессии химерного онкогена *TMPRSS2:ERG* имеет низкую диагностическую чувствительность (37%), что обусловлено соответствующей частотой встречаемости этой мутации в популяции пациентов с РПЖ. Однако, специфичность положительного результата этого теста разными авторами оценивается как 93-98% [14]. Так, представленный нами метод является более чувствительным, но менее специфичным по сравнению с анализом экспрессии онкогена *TMPRSS2:ERG*.

В наше исследование было включено лишь 25 пациентов и 25 здоровых волонтеров, поэтому представленные результаты имеют ориентировочный характер. Для адекватной оценки чувствительности

теста необходимо исследование большего числа пациентов с РПЖ. Для определения специфичности анализа миРНК необходимо проведение более широкого исследования с включением пациентов с не онкологическими заболеваниями предстательной железы и онкологическими заболеваниями другой локализации. Тем не менее, представленные результаты показывают перспективность дальнейшей работы по валидации и оптимизации

метода диагностики РПЖ на основе анализа экзосомальных миРНК в моче. В частности, планируется работа по оптимизации методики нормализации результатов ПЦР, уточнению диагностически значимого уровня повышения концентрации «маркерных» миРНК и разработка алгоритма анализа профиля экспрессии набора «маркерных» молекул. Решение этих вопросов позволит разработать новый метод скрининга и ранней ди-

агностики РПЖ, способный успешно конкурировать с другими тестами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новый метод выделения экзосом из мочи, с учетом его простоты и низкой стоимости, представляется перспективным как для проведения масштабных клинических исследований, так и для разработки тестов клинической диагностики. ■

Резюме:

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает лидирующую позицию в структуре мужской онкологической заболеваемости, поэтому разработка новых методов диагностики и терапии является актуальной социальной и медицинской проблемой. В настоящее время оценка уровня простат-специфического антигена (ПСА) в плазме представляется основным неинвазивным методом скрининга, диагностики и послеоперационного наблюдения. Но показатели диагностической значимости анализа ПСА не высоки, а его интерпретация не всегда тривиальна.

МикроРНК (миРНК) – это короткие молекулы РНК, регулирующие экспрессию более половины всех протеинкодирующих генов на пост-транскрипционном уровне. Кроме регуляторной функции внутри клетки, миРНК секретируются во внеклеточное пространство. Внеклеточные миРНК могут быть обнаружены в большинстве биологических жидкостей в комплексе с белками или липидами, или в составе мембранных нано-везикул (экзосом). МиРНК, секретируемые клетками РПЖ в составе экзосом, могут быть детектированы в моче и, соответственно, могут служить маркерами этого заболевания.

В рамках представленной работы был разработан оригинальный метод выделения экзосом из мочи путем агглютинации их лектинами. Структура и состав выделенных экзосом были проанализированы методами динамического светорассеяния, Вестерн-блоттинга и автоматического электрофореза. Сравнительный анализ РПЖ-ассоциированных миРНК в составе экзосом мочи пациентов с РПЖ и здоровых доноров был проведен методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). В результате было показано, развитие РПЖ сопровождается повышением содержания трех миРНК: miR-574-3p, miR-141-5p и miR-21-5p, т.е. эти молекулы могут служить маркерами данного заболевания. Диагностическая чувствительность нового метода оказалась сопоставима, а специфичность – выше аналогичных параметров ПСА

Ключевые слова: рак предстательной железы, диагностика, экзосомы, миРНК.

Key words: prostate cancer, diagnostics, exosomes, miRNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году. ФГБУ «МНИОИ им П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России 2012.
2. Boxer RJ. Prostate Cancer Biomarkers: Improvement in Predicting Clinically Significant Disease. // ASCO Post. 2014. Vol.5, N 12: on line. URL: <http://www.ascp.org/issues/july-25-2014/prostate-cancer-biomarkers-improvement-in-predicting-clinically-significant-disease.aspx>
3. Dijkstra S, Mulders PF, Schalken JA. Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review. // Clin Biochem. 2014. Vol. 47, N 10-11. P. 889-896.
4. Филатов М.В., Ланда С.Б., Пангина Р.А., Гармай Ю.П. Исследование экзосом, секретируемых различными нормальными и злокачественно трансформированными клетками *in vitro* и *in vivo*. // Клиническая Лабораторная диагностика. 2010. N 12. С. 35-42.
5. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. // Annu Rev Cell Dev Biol. 2014. N 30. P. 255-289.
6. Nazimek K, Bryniarski K, Santocki M, Ptak W. Exosomes as mediators of intercellular communication: clinical implications. // Pol Arch Med Wewn. 2015. Vol.125, N 5. P. 370-380.
7. Малек А.В., Берштейн Л.М., Филатов М.В., Беляев А.М. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации. // Вопросы онкологии. 2014. Т. 60, N 4. С. 429-436.
8. Drake RR, Kislinger T. The proteomics of prostate cancer exosomes. // Expert Rev Proteomics. 2014. Vol. 11, N 2. P. 167-177.
9. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. // Front Genet. 2013. N 4. P. 36.
10. Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review). // Int J Oncol. 2015. Vol. 46, N 1. P. 17-27.
11. Zerlinger E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. // Cold Spring Harb Protoc. 2015. Vol. 2015, N 4. P. 319-323.
12. Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B, Boysen AT, Whitehead B, Dyrskjot L, Orntoft TF, Howard KA, Ostenfeld MS. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. // J Extracell Vesicles. 2014. N 3. P. 25011.
13. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. // Mol Cell Proteomics. 2013. Vol. 12, N 3. P. 587-598.
14. Sartori DA, Chan DW. Biomarkers in prostate cancer: what's new? // Current opinion in oncology. 2014. Vol. 26, N 3. P.259-264.
15. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. // Tumour biology. 2011. Vol. 32, N 3. P.583-588.
16. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhu YP, Shen YJ, Shi GH, Ye DW. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. // Prostate. 2011. Vol. 71, N 3. P.326-331.
17. Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurchich I, Lipsky MJ, Benson MC, Santella RM. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. // Prostate. 2012. Vol. 72, N 13. P.1469-1477.
18. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. // Br J Cancer. 2012. Vol. 106, N 4. P.768-774.
19. Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, Chi KN, Marshall VR, Tilley WD, Butler LM. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. // Int J Cancer. 2012. Vol. 131, N 3. P.652-661.
20. Larne O, Martens-Uzunova E, Hagman Z, Edsjo A, Lippolis G, den Berg MS, Bjartell A, Jenster G, Ceder Y. miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. // Int J Cancer. 2013. Vol. 132, N 12. P.2867-2875.

*Первая скрипка
в дистанционном
образовании!*



Непрерывное профессиональное
образование в урологии - UroEdu.ru



- Лекции ведущих российских и зарубежных лидеров
- Отсутствие затрат на проезд, проживание во время курса
- Возможность получить продолженное образование в любое удобное время, в удобном месте
- Получение документов установленного образца