

## ОЦЕНКА ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ РНК ИЗОФОРМ VEGF В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е. А. Тыщик<sup>1</sup>, В. В. Кометова<sup>2</sup>, В. В. Родионов<sup>3</sup>, Д. В. Ребриков<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup>Лаборатория редактирования генома,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

<sup>2</sup>Патологоанатомическое отделение,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

<sup>3</sup>Отделение патологии молочной железы,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

Проанализирован уровень представленности внеклеточных РНК IL-6, IL-8, IL-18 и трех сплайсинговых вариантов фактора роста эндотелия сосудов VEGF: 121, 165 и 189 — в плазме крови пациенток с раком молочной железы I и II стадий в сравнении с контрольной группой обследуемых без онкологических заболеваний. Для IL-8 и IL-18 подтвержден, а для изоформ VEGF-121 и VEGF-165 впервые продемонстрирован значимо повышенный уровень внеклеточных РНК в группе пациенток с раком молочной железы на ранних стадиях.

**Ключевые слова:** внеклеточная РНК, изоформа VEGF, рак молочной железы, цитокины, количественная полимеразная цепная реакция

**Благодарности:** авторы благодарят Ольгу Бурменскую из отдела клинической и молекулярной генетики Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова за обсуждение результатов исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Ребриков Денис Владимирович  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; drebrikov@gmail.com

**Статья получена:** 15.08.2017 **Статья принята к печати:** 25.08.2017

## ANALYSIS OF VEGF CIRCULATING RNA ISOFORMS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Tyschik EA<sup>1</sup>, Kometova WV<sup>2</sup>, Rodionov WV<sup>3</sup>, Rebrikov DV<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup>Laboratory for Genome Editing,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Department of Anatomic Pathology,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Department of Breast Pathology,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

The present study aims to estimate and compare the levels of cell-free circulating RNAs of three interleukins IL-6, IL-8, and IL-18 and three splice variants of the vascular endothelial growth factor (VEGF), namely 121, 165 and 189, in blood plasma of patients with stage I / II breast cancer and healthy controls. The study reveals that patients with breast cancer have significantly elevated levels of circulating VEGF121 and VEGF165 RNAs, so far unreported in the literature. We also confirm that levels of circulating IL-8 and IL-18 RNAs are considerably increased in breast cancer patients.

**Keywords:** circulating RNA, VEGF isoform, breast cancer, cytokines, qPCR

**Acknowledgements:** the authors thank Olga Burmenskaya (Department of Clinical and Molecular Genetics of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia) for participating in the discussion of the study results.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis Rebrikov  
ul. Oparina, d. 4, Moscow, Russia, 117997; drebrikov@gmail.com

**Received:** 15.08.2017 **Accepted:** 25.08.2017

Циркулирующие в плазме крови молекулы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) давно позиционируют в качестве диагностических и прогностических маркеров различных патологических процессов в организме человека [1–4]. Однако информативный потенциал этого легкодоступного для анализа биологического материала далеко не исчерпан. Постоянный и мощный «мониторинг» кровеносной системой практически всех органов и тканей позволяет обнаружить отклонения от нормального состава циркуляции при патологических изменениях в любой части организма. И в то время как количественный состав ДНК в клетках

разных тканей довольно стабилен, профиль транскриптов уникален для каждого типа клеток, что можно использовать при разработке диагностического инструментария.

Появление внеклеточных молекул РНК (вкРНК) в кровотоке имеет различную природу (некроз, апоптоз, активная секреция [5–8]). Количественная оценка уровня отдельных транскриптов в плазме методом ПЦР представляет собой рутинный и сравнительно недорогой диагностический метод, который в случае обнаружения новых информативных маркеров легко внедрить в медицинскую практику в качестве скринингового подхода.

Рак молочной железы (PMЖ) является самым распространенным онкологическим заболеванием у женщин — на него приходится 16 % всех случаев заболевания раком [9]. В литературе представлены обширные данные, демонстрирующие изменение концентрации вкРНК при онкогенезе [1, 2]. В процессы опухолеобразования, как правило, вовлечены гены цитокинов, а также факторов клеточного роста и дифференцировки. Цитокины играют важную роль как в регуляции индукции опухолеобразования, так и в защите от прогрессии PMЖ [10, 11].

Фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) является одним из ключевых белков, воздействующих на процессы формирования сосудов, что, в свою очередь, напрямую влияет на рост опухоли. Ангиогенез необходим опухоли для обеспечения клеток кислородом при увеличении размеров новообразования, а также для гематогенного метастазирования. Цитокины и факторы роста, секретируемые опухолевыми и стромальными клетками, стимулируют пролиферацию эндотелиальных клеток. Фактор роста эндотелия сосудов тесно связан с повышенной агрессивностью и метастазированием опухоли [12–14]. VEGF повышен в сыворотке крови у пациентов с онкологическими заболеваниями, и есть данные, что измерение циркулирующего VEGF является суррогатным маркером ангиогенеза и/или метастазирования [15]. Аномальный ангиогенез — общая черта многих форм рака, причем различные изоформы VEGF играют разную роль в этих процессах. Показано, что VEGF-121 является самой опухолегенной изоформой в экспериментальных моделях рака молочной железы [16]. Экспрессия VEGF-121 возрастает в сравнении с VEGF-165 при злокачественных новообразованиях толстой кишки и предстательной железы [17, 18].

Ранее нами было показано, что на начальных стадиях PMЖ достоверно повышен уровень вкРНК IL-8 и IL-18, а уровень IL-6 не изменяется [19]. Целью настоящего исследования было оценить уровень вкРНК трех наиболее представленных изоформ VEGF: VEGF-121, VEGF-165 и VEGF-189 — на ранних стадиях PMЖ и подтвердить ранее полученные данные для IL-6, IL-8 и IL-18.

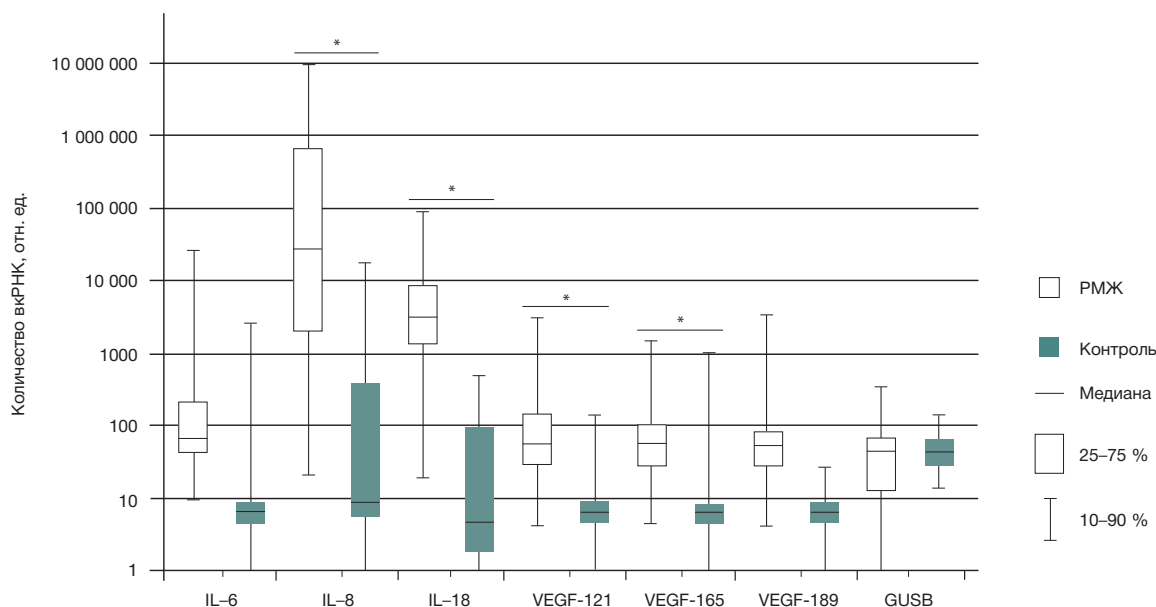
## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследуемую группу составили 36 женщин с гистологически подтвержденным диагнозом «рак молочной железы». Возраст пациенток варьировал от 34 лет до 81 года, средний возраст составил 57,9 года. Опухоль была диагностирована в 0 стадии (TisN0M0) у 2 пациенток, в I стадии (T1N0M0) — у 17 женщин, в стадии IIA — у 13 (T1N1M0 — 7 больных и T2N0M0 — 6), в стадии IIB (T2N1M0) — у 2, в стадии IIIA (T2N2M0) — у одной и в стадии IIIC (T2N3M0) — у одной пациентки. Опухоль менее 2 см выявлена у 32 пациенток. Метастазы в регионарные лимфоузлы были обнаружены у 11 пациенток, из них метастазы в 1–3 лимфоузлах обнаружены у 9 пациенток, в 4 лимфоузлах и более — у 2 женщин. Наиболее часто регистрировался неспецифический протоковый гистологический вариант (21 случай), дольковый вариант был диагностирован у 4 пациенток, особые формы рака — у 9, внутрипротоковый рак — у 2 больных. По степени злокачественности все случаи разделились следующим образом: I степень злокачественности — 6 случаев, II степень — 16, III — 14 случаев. Никто из пациентов, включенных в исследование, не получал предоперационную противоопухолевую терапию.

Контрольную группу составили 56 клинически здоровых женщин (возраст варьировал от 24 до 55 лет, средний возраст — 40 лет).

Информация о всех женщинах, принимавших участие в исследовании, была деперсонифицирована. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 2016/67).

У пациенток с PMЖ кровь забирали до начала операции. Образцы крови у обследуемых обеих групп забирали в одноразовые пробирки BD Vacutainer (Becton, Dickinson and Company, США) с ЭДТА и доставляли в лабораторию при комнатной температуре в течение 30 мин. Для получения плазмы 1 мл крови отбирали в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин, после чего надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. После центрифугирования верхнюю фракцию



Профиль представленности РНК генов в плазме крови больных PMЖ и контрольной группы. По оси абсцисс указаны названия исследованных транскриптов, по оси ординат — количество внеклеточных РНК в относительных единицах. \* —  $p < 0,05$

(плазму) переносили в новые пробирки и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  не более 10 дней. Экстракцию вкРНК проводили набором «ПРОБА-НК» («ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. Очищенную вкРНК немедленно использовали для постановки обратной транскрипции со специфичными ОТ-праймерами по стандартному протоколу. Полученную комплементарную ДНК либо сразу использовали для постановки ПЦР, либо хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 10 дней.

Внеклеточную РНК определяли методом количественной ОТ-ПЦР с использованием коммерческой тест-системы «ИммуноГенетика» («ДНК-Технология», Россия). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе DTprime («ДНК-Технология», Россия) по предлагаемому производителем тест-системы протоколу.

В качестве нормировочного использовали транскрипт  $\beta$ -глюкуронидазы (GUSB), не меняющий представленность в ходе опухолеобразования [20, 21]. Нормировочные значения для транскриптов каждого гена рассчитывали с помощью метода  $\Delta\Delta\text{Ct}$  [22]. Для оценки статистической значимости полученных различий был использован метод параметрической статистики (критерий Стьюдента). Различия групп полагали достоверным при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке приведены данные об уровне представленности исследуемых генов (IL-6, IL-8, IL-18, VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189) и нормировочного гена GUSB в плазме крови больных РМЖ и контрольной группы.

Достоверные различия в уровне представленности вкРНК в группе больных РМЖ и контрольной группе обнаружены для транскриптов IL-8, IL-18, VEGF-121 и VEGF-165 ( $p < 0,05$ ). Транскрипты IL-6 и VEGF-189 хоть и показали несколько большую представленность в группе пациенток с РМЖ, не достигли значимого уровня.

## Литература

1. Holdenrieder S. Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 924: 53–60. PubMed PMID: 27753019.
2. Suraj S, Dhar C, Srivastava S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomed Rep*. 2017 Jan; 6 (1): 8–14. PubMed PMID: 28123700.
3. Jo P, Azizian A, Salendo J, Kramer F, Bernhardt M, Wolff HA, et al. Changes of Microna Levels in Plasma of Patients with Rectal Cancer during Chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci*. 2017 May 27; 18 (6): pii: E1140. PubMed PMID: 28554991.
4. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, et al. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep*. 2017 Jul 14; 7 (1): 5474. PubMed PMID: 28710381.
5. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Jul; 69 (7): 1685–9. PubMed PMID: 4505646.
6. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*. 1975 Sep; 35 (9): 2375–82. PubMed PMID: 1149042.
7. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr; 906: 161–8. PubMed PMID: 10818614.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты согласуются с данными работы [19], где относительные количества РНК IL-8 и IL-18 были достоверно повышены у пациенток на ранних стадиях РМЖ в сравнении со здоровыми испытуемыми.

Достоверное повышение у пациенток с РМЖ в составе циркуляции вкРНК изоформ VEGF-121 и VEGF-165 также согласуется с данными об экспрессии этих вариантов в ходе опухолеобразования [12–18]. Tokunaga и соавт. классифицировали паттерны мРНК VEGF различных опухолей человека на три типа: 1 — экспрессирующий только VEGF-121; 2 — VEGF-121 и VEGF-165; 3 — VEGF-121, VEGF-165 и VEGF-189 [23]. Сочетание всех трех изоформ (третий тип) обнаруживается в метастазах рака прямой кишки [23], при карциноме почек [24], гепатоцеллюлярной карциноме [25] и раке легких с плохим прогнозом [26]. По мнению ряда авторов, VEGF-189 индуцирует петлю аутокринной пролиферации при РМЖ через рецепторы семейства семафоринов (в частности, через Neuropilin-1) [27]. Наши данные для РМЖ в целом подтверждают гипотезу Tokunaga, демонстрируя присутствие в составе циркуляции РНК либо только VEGF-121, либо VEGF-121 в сочетании с VEGF-165 и/или VEGF-189.

## ВЫВОДЫ

Полученные результаты подтверждают ранее опубликованные данные о повышенном уровне представленности в составе циркуляции транскриптов IL-8 и IL-18 у пациенток с раком молочной железы I и II стадий. У больных РМЖ также обнаружено повышенное содержание вкРНК VEGF-121 и VEGF-165. Для внеклеточной фракции РНК плазмы крови при РМЖ I и II стадий подтверждается гипотеза Tokunaga о базовых изоформах роста опухоли VEGF-121 и VEGF-165, а также изоформе VEGF-189 как факторе метастазирования.

8. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65. PubMed PMID: 11245480.
9. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Швейцария: ВОЗ; с2017 [дата обращения: 28 августа 2017 г.]. Рак молочной железы: профилактика и борьба; [прибл. 5 веб-стр.]. Доступно по: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/ru/index1.html>
10. Todorović-Raković N, Milovanović J. Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2013 Oct; 33 (10): 563–70. PubMed PMID: 23697558.
11. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Areola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2015 Jan; 35 (1): 1–16. PubMed PMID: 25068787.
12. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res*. 2000 Jun 1; 60 (11): 2898–905. PubMed PMID: 10850435.
13. Byrne GJ, McDowell G, Agarawal R, Sinha G, Kumar S, Bundred NJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast

- cancer. *Anticancer Res.* 2007 Sep–Oct; 27 (5B): 3481–7. PubMed PMID: 17972505.
14. Dore-Savard L, Lee E, Kakkad S, Popel AS, Bhujwala ZM. The Angiogenic Secretome in VEGF overexpressing Breast Cancer Xenografts. *Sci Rep.* 2016 Dec 20; 6: 39460. PubMed PMID: 27995973.
  15. Barron GA, Goua M, Wahle KWJ, Bermano G. Circulating levels of angiogenesis-related growth factors in breast cancer: A study to profile proteins responsible for tubule formation. *Oncol Rep.* 2017 Sep; 38 (3): 1886–94. PubMed PMID: 28714000.
  16. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000 Jul; 83 (1): 63–8. PubMed PMID: 10883669.
  17. Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2002 Sep 1; 101 (1): 32–6. PubMed PMID: 12209585.
  18. Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Best CJ, Emmert-Buck MR, et al. Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2007 May 15; 120 (10): 2096–109. PubMed PMID: 17278099.
  19. Турчанинова М. А., Мещеряков А. А., Рахманкулова З. П., Ребриков Д. В. Внеклеточные РНК плазмы крови как диагностический маркер опухолей молочной железы. *Биоорган. хим.* 2011; 37 (3): 393–8.
  20. Majidzadeh-A K, Esmaeili R, Abdoli N. TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. *BMC Res Notes.* 2011 Jun 25; 4: 215. PubMed PMID: 21702980.
  21. Iyer G, Wang AR, Brennan SR, Bourgeois S, Armstrong E, Shah P, et al. Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research. *Sci Rep.* 2017 Mar 6; 7: 43763. PubMed PMID: 28262749.
  22. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18; 3 (7): RESEARCH0034. PubMed PMID: 12184808.
  23. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer.* 1998 Mar; 77 (6): 998–1002. PubMed PMID: 9528847.
  24. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1999 Jan; 35 (1): 133–7. PubMed PMID: 10211101.
  25. Li Q, Xu B, Fu L, Hao XS. Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006 Sep; 25 (3): 403–9. PubMed PMID: 17167981.
  26. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15; 19 (2): 432–41. PubMed PMID: 11208836.
  27. Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol.* 2008 Jan; 172 (1): 167–78. PubMed PMID: 18079435.

## References

1. Holdenrieder S. Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 924: 53–60. PubMed PMID: 27753019.
2. Suraj S, Dhar C, Srivastava S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomed Rep.* 2017 Jan; 6 (1): 8–14. PubMed PMID: 28123700.
3. Jo P, Azizian A, Salendo J, Kramer F, Bernhardt M, Wolff HA, et al. Changes of MicroRNA Levels in Plasma of Patients with Rectal Cancer during Chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2017 May 27; 18 (6). pii: E1140. PubMed PMID: 28554991.
4. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczy K, et al. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep.* 2017 Jul 14; 7 (1): 5474. PubMed PMID: 28710381.
5. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jul; 69 (7): 1685–9. PubMed PMID: 4505646.
6. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 1975 Sep; 35 (9): 2375–82. PubMed PMID: 1149042.
7. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Apr; 906: 161–8. PubMed PMID: 10818614.
8. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65. PubMed PMID: 11245480.
9. World Health Organization [Internet]. Switzerland: WHO; c2017 [cited 2017 Aug 28]. Breast cancer: prevention and control; [about 6 screens]. Available from: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>.
10. Todorović-Raković N, Milovanović J. Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2013 Oct; 33 (10): 563–70. PubMed PMID: 23697558.
11. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2015 Jan; 35 (1): 1–16. PubMed PMID: 25068787.
12. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 2000 Jun 1; 60 (11): 2898–905. PubMed PMID: 10850435.
13. Byrne GJ, McDowell G, Agarawal R, Sinha G, Kumar S, Bundred NJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007 Sep–Oct; 27 (5B): 3481–7. PubMed PMID: 17972505.
14. Dore-Savard L, Lee E, Kakkad S, Popel AS, Bhujwala ZM. The Angiogenic Secretome in VEGF overexpressing Breast Cancer Xenografts. *Sci Rep.* 2016 Dec 20; 6: 39460. PubMed PMID: 27995973.
15. Barron GA, Goua M, Wahle KWJ, Bermano G. Circulating levels of angiogenesis-related growth factors in breast cancer: A study to profile proteins responsible for tubule formation. *Oncol Rep.* 2017 Sep; 38 (3): 1886–94. PubMed PMID: 28714000.
16. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000 Jul; 83 (1): 63–8. PubMed PMID: 10883669.
17. Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2002 Sep 1; 101 (1): 32–6. PubMed PMID: 12209585.
18. Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Best CJ, Emmert-Buck MR, et al. Increased expression of VEGF121/

- VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2007 May 15; 120 (10): 2096–109. PubMed PMID: 17278099.
19. Turchaninova MA, Mesheryakov AA, Rakhmankulova ZP, Rebrikov DV. Circulating RNA in blood plasma as a diagnostic marker of breast cancer. *Russ J Bioorg Chem*. 2011 May; 37 (3): 351–5.
  20. Majidzadeh-A K, Esmaeili R, Abdoli N. TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. *BMC Res Notes*. 2011 Jun 25; 4: 215. PubMed PMID: 21702980.
  21. Iyer G, Wang AR, Brennan SR, Bourgeois S, Armstrong E, Shah P, et al. Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research. *Sci Rep*. 2017 Mar 6; 7: 43763. PubMed PMID: 28262749.
  22. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18; 3 (7): RESEARCH0034. PubMed PMID: 12184808.
  23. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer*. 1998 Mar; 77 (6): 998–1002. PubMed PMID: 9528847.
  24. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 1999 Jan; 35 (1): 133–7. PubMed PMID: 10211101.
  25. Li Q, Xu B, Fu L, Hao XS. Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006 Sep; 25 (3): 403–9. PubMed PMID: 17167981.
  26. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 15; 19 (2): 432–41. PubMed PMID: 11208836.
  27. Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol*. 2008 Jan; 172 (1): 167–78. PubMed PMID: 18079435.