
APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES AND CYTOGENETIC METHODS IN HUMAN BIOMONITORING

Mileva Dragana

Faculty of medical sciences, University Goce Delcev – Stip, N. Macedonia,
dragana.211368@student.ugd.edu.mk

Velickova Nevenka

Faculty of medical sciences, University Goce Delcev – Stip, N. Macedonia
nevenka.velickova@ugd.edu.mk

Abstract: Human biomonitoring is defined as a field of activity that confirm some pathophysiological changes in different cells or tissue in the body (blood, urine, serum) as a result of exposure of the body to some pollutants or their's primary or secondary products. According to the fact that every day humans are directly exposed to some physical, chemical or biological agents, molecular biological technics and methods in cytogenetics are very important in this field of study. Also, very important is the choose of different cells lines as a tool in human biomonitoring studies. Micronucleus test, comet assay and sister chromatid exchanges are cytogenetic test, accepted and confirmed of WHO, are very useful as a method that can observe the cytotoxicity and genotoxicity in the organism. With these method researchers evaluate different cytological changes, as a micronucleus, nucleoplasmatic bridges, apoptosis, changes in the chromatids etc. Beside the fact that pollutants effect on the DNA, these molecular variations can be evaluated with molecular biological technics as a PCR (polymerase chain reaction), qRT PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) or ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Especially, Real time PCR is very important technics because it can analyze miRNA and genetic polymorphism in different cell lines.

Keywords: human biomonitoring, biomarkers, molecular biological technics, cytogenetic tests, genotoxicity, micronucleus, comet assay

ПРИМЕНА НА МОЛЕКУЛАРНО БИОЛОШКИ ТЕХНИКИ И ЦИТОГЕНЕТСКИ МЕТОДИ ВО ХУМАН БИОМОНИТОРИНГ

Милева Драгана

Факултет за мед. науки, Универзитет “Гоце Делчев”-Штип, dragana.211368@student.ugd.edu.mk

Величкова Невенка

Факултет за мед. науки, Универзитет “Гоце Делчев”-Штип, nevenka.velickova@ugd.edu.mk

Република Северна Македонија

Резиме: Хуманиот биомониторинг подразбира збир на активности со кои се потврдуваат и идентификуваат патофизиолошки промени кои ги предизвикуваат штетните супстанции, нивните примарни и/или реактивни метаболити во различни биолошки медиуми као што се крв, урина, серум, или на различни клетки или специфични ткива во организмот. Имајќи ја во предвид, секојдневната изложеност на организмот на различни физички, хемиски или биолошки агенси, од една страна и развојот на молекуларната биологија од друга страна, молекуларните биолошки техники и цитогенетски методи се од огромна важност токму за овој тип на истражувања. Изборот на клеточни линии и клеточни култури како “алатки”, исто така е од посебна важност за овој тип на истражувања, токму поради штетни ефекти на ваквите полутанти и цитотоксичноста кои ја предизвикуваат врз организмот. Микронуклеусниот тест, комет методата и промените во сестринските хроматиди се тестови кои се прифатени од СЗО и со кои се потврдува цитотоксичноста и евентуалниот генотоксиколошки ефект на различни агенси присутни во работна или животна средина. Од таа причина, истите наоѓаат особена примена во хуман биомониторинг бидејќи со нив се потврдуваат различни клеточни промени (појава на микронуклеуси, нуклеоплазматични мостови, појава на апоптоза) како и промени во самите хромозоми или молекулата на ДНК. Исто така, рутинските молекуларно биолошки техники како што се PCR (*polymerase chain reaction*), qRT PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) и ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) наоѓаат особена примена во ваквиот тип на истражувања имајќи ги во предвид промените кои ги предизвикуваат истите на молекуларно ниво. Посебно е важно да се потенцира дека токму Real-time PCR техниката овозможува анализа на mRNA и

секвенционирање на промените особено за потврдување на гентскиот полиморфизам во различни клеточни линии и во различни примероци.

Клучни зборови: хуман биомониторинг, биомаракери, молекуларно биолошки техники, цитогенетски тестови, генотоксичност, микронуклеус, комет тест

1. ВОВЕД

1.1 Хуман биомониторинг

Хуманиот биомониторинг претставува збир на активности со кои се идентификуваат и квантитативно се одредуваат концентрациите на штетните супстанции, нивните примарни и/или реактивни метаболити во биолошките медиуми кај професионално експонираните работници - крв, урина, серум, специфични ткива и др. Хуманиот биомониторинг не е цврсто поврзан само со хемиските агенци. Физичките и биолошките агенци исто така предизвикуваат биолошки ефекти врз организмот. Поради тоа во поширока смисла на зборот, хуманиот биомониторинг се однесува на одредување на специфични индикатори т.е. маркери со кои може да се следат присуството и влијанието на штетните супстанции и/или агенци врз организмот на професионално експонираниот работник. Ова посебно се однесува на одредувањето на биолошките маркери на ефектите. Целта на хуманиот биомониторинг е преку споредување на добиените концентрации со референтните вредности за неекспонираната популација да се процени нивото (опсегот) на изложеност кај професионално експонираните работници и индиректно да се утврди степенот на ризик на самото работно место. Врз основа на тие податоци, се преземаат соодветни мерки за превенција на болестите и за намалување на смртноста. За спроведување на хуманиот биомониторинг неопходно е да се располага со сензитивни и специфични аналитички методи. Тоа значи можност да се одредат хемиските супстанции и/или нивните метаболити во многу ниски концентрации и во релативно мали количини на примероците од биолошкиот материјал.

За ефикасно спроведување на биолошкиот мониторинг, неопходно е да се изготви соодветна програма. Таа треба да се базира врз податоците од еколошкиот мониторинг и врз информациите за влијанието на штетниот агенс врз здравјето на професионално експонираните работници, а посебно за токсикокинетиката и токсикодинамиката на штетната супстанција. Критериумите што треба да се исполнат за да може коректно да се спроведе програмата за биолошки мониторинг зависат од карактеристиките на самата штетност, од постапките за испитување и од индивидуалните карактеристики на работниците. Времето на земање на примерокот за испитување во однос на изложеноста вообичаено е еден од најзначајните аспекти на методологијата за спроведување на биолошкиот мониторинг, што може да доведе до грешки. Постапката за земање примероци треба да биде стандардизирана, со цел да се оневозможи дополнителна контаминација на примерокот и/или евентуална реакција меѓу примерокот и контејнерот (епрувета или друг сад) каде што тој се чува материјалот. Најчесто користен биолошки медиум за испитување е крвта. Лесно испарливите супстанции и/или нивните метаболити може да се ослободат при несоодветно земање и чување на примерокот на крв.

1.2 Биолошки маркери

Под поимот „маркер“ се подразбира сè што може да биде идентификувано и/или измерено. Биолошките маркери (биомаркери) се специфични супстанции или параметри што се идентификуваат и квантитативно се детерминираат кај човекот и/или во хуманите биолошки медиуми (крв, серум, урина, фецес, плунка и др.). Не постојат јасни дефиниции и критериуми за тоа што се биолошки маркери, а што се клинички или функционални знаци. Така, сè уште е отворено прашањето дали, на пример, зголемениот крвен притисок претставува биолошки маркер или клинички објективен параметар. Вообичаено се прифаќа пристапот според кој биолошките маркери се резултат на биолошки, биохемиски, токсиколошки и молекуларни испитувања.

Во рамките на цитогенетските и генотоксиколошки истражувања посебно се важни биолошките маркери кои укажуваат на генотоксичност и канцерогени ефекти како што се:

- Промени во молекулата на ДНК,
- хромозомски аберации (ацентрични фрагменти, прстенести хромозоми),
- промени во сестринските хроматиди,
- појава на микронуклеуси;
- клеточна пролиферација.

1.3 Молекуларно биолошки техники во хуман биомониторинг

Во рамките на молекуларната биологија, постојат повеќе техники и методи со кои може да се потврдат промените во молекулата на ДНК. Соодветно на тоа со овие техники се детектираат промени во различни генетски секвенци, се мери концентрацијата на mRNA или соодржината на пооделни протеини. Неколку

рутински техники, како што се полимеразата верижна реакција(PCR), ензимски поврзана имуносорбентна анализа (ELISA) имаат особена примена во биомониторингот на хемиска изложеност и физичката изложеност на организмот. Во споредба со останатите класични техники кои се користат во хуманиот биомониторинг, молекуларно биолошките техники се разликуваат по времето на изведување, цената на чинење, изборот на клеточни линии или супстратот кој го користат и др..

1.4 Цитогенетски методи за потврдување на гентоксичност во организмот

Генерално, постојат неколку цитогенетски тестови за детекција на токсичноста и степенот на неговата застапеност и тоа:

- CBMN TEST – микронуклеусен тест,
- детекција на центромерите во микронуклеусите (со помош на FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)),
- SCE TEST – тест за размена на сестрински хроматиди, биолошка дозиметрија на дицентрични хромозоми) кои се користат како индикатори за евентуалните хромозомски оштетувања од генотоксични агенси.
- Комет тест- хромозомските мерења на оштетувања се едни од најважните начини за да се оцени токсичност, канцерогеност, мутагеност и на лекови, хемикалии, и зраци. Проучувањето на ДНК оштетувањето на хромозомот е суштински дел на генетски токсиколошки тестови, бидејќи хромозомската мутација е важен настан во карциногенезата.

2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Во трудот ќе бидат евалуирани:

-предностите и недостатоците на микронуклеусен тест, комет методата како и тестот со кој се потврдуваат промени во сестрински хроматиди како цитогенетски методи

-ќе биде објаснета примената и можностите на различни клеточни линии во ваков тип на истражувања
-ќе бидат објаснети предностите и разликите помеѓу PCR (*polymerase chain reaction*), qRT PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) и ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) како молекуларно биолошки техники

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1 CBMN – тест (микронуклеусен тест)

При Цитокинеза-Блок микронуклеусниот тест (CBMN), се овозможува детекција и скрининг на абнормални нуклеарни форми (ANS). Овој термин вклучува микронуклеуси, нуклеоплазматични мостови и нуклеарни пупки и е поврзан со митотична нестабилност. CBMN анализата е погоден и стандардизиран тест за проценка на генотоксичност и штетни ефекти од изложеноста на организмот. Анализа CBMN во хумани лимфоцити е еден од најчесто користените методи за мерење на оштетување на ДНК. Хематолошките ткива, особено лимфоцитите, се едни од ткивата кои се најчувствителни на јонизирачко зрачење. Микронуклеусниот тест практично се изведува врз самостојни хроматински структури, преку кондензација на ацентрични хромозомски фрагменти или цели хромозоми. Овде апоптотичните клетки не содржат главно јадро со неколку помали јадра туку група на пикнотични јадрени фрагменти, постапката се изведува со квантитативен биомаркер, а големината на микронуклеусите може да изнесува од 1/16 или 1/3 од големината на јадрото. Микронуклеусниот тест практично се изведува врз самостојни хроматински структури, преку кондензација на ацентрични хромозомски фрагменти или цели хромозоми. Микронуклеусот се формира за време на метафазната/анафазната клеточната делба. Се формира како резултат на цел заостанат хромозом (фаза која води кон хромозомна загуба) или ацентрично отцепување на хромозомски фрагмент, кој се одделува од хромозомот по кинењето. CBMN – тест (микронуклеусен тест) на периферните крвни лимфоцити е еден од најважните методи кои се користат во генотоксикологијата. Основен предуслов за примена на овој тест со цел надзор на професионално изложеното население е познавање на нормалните вредности на биолошките индикатори (биомаркери) кај контролната група население.

3.2 Комет тест

Комет тестот е една од широко прифатените техники каде што со хемиски реакции се предизвикува делумно одмотување на ДНК. Клетките се вклопуваат во агарозен гел и со помош на раствор од висока концентрација на етилен-диамин-тетраоцетна киселина (EDTA) и детергент се лизираат цитоплазмата и мембранските структури во клетките и се ослободува вкупната ДНК. Помалите исечоци или фрагменти од ДНК различно се обојуваат со флуоресцентни бои и под микроскоп се видливи како комети. Се мерат најмалку 50 комети на кои се утврдуваат три различни параметри и тоа: должината на опашката, интензитетот на опашката и опашниот момент. Должината на опашката на кометата ја претставува најголемата оддалеченост, интензитетот на опашката го означува процентот на ДНК која мигрирала додека опашниот момент обично се дефинира како умножување на должината на опашката и процентниот однос на

ДНК во опашката. Со оглед на тоа дека оштетените клетки личат на комета со јасно флуоресцентна глава и опашка, целата оваа постапка се нарекува комет-техника.

Кога се снимаат комети, се користат специјални системи за анализа на слика. Микроскопот за епифлуоресценција е поврзан со компјутер, и со употреба на специјални компјутерски програми се мерат одредени параметри како што се: должина на опашката и % од ДНК во опашката. Должината на опашката е одредена од должината на миграцијата на ДНК и е директно поврзана со големината на фрагментот на ДНК и степенот на оштетување. Комет тестот не дава увид во големината на фрагментите на ДНК, бидејќи фрагментите не се одделени за време на електрофорезата. Должината на опашката на кометата се пресметува од средината на главата до крајот на опашката. Интензитетот на опашката е линеарно поврзан со нивото на оштетување и ја покажува количината на фрагмент од ДНК што директно го покажува процентот на геномот погоден од оштетувањето.

3.3 SCE (*sister chromatid exchange*) тест

SCE тест – е тест за размена на сестрински хроматиди кои се користат како индикатори за можните хромозомски оштетувања од генотоксичните агенси. Тоа значи „кршење” и повторно спојување на ДНК на привидно хомоложни места помеѓу две хроматиди.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Може да се истакне дека микронуклеусниот тест овозможува потполно сигурна идентификација на анеуплоидија во лимфоцитите, клетките на коскената срцевина и епителните клетки на горните дишни патишта или уринарниот тракт. Имено, нотираниите цитогенетски методи се општо прифатени и истите се утврдени во листата на стандардни краткотрајни тестови за генотоксиколошки скрининг на различни генотоксиканти присутни во организмот. Всушност, тоа се едноставни, веродостојни и осетливи тестови бидејќи со нив можат да се детектираат оштетувања во молекулата на ДНК и дополнителни реаражамани на генетскиот материјал во клетката и ткивата. Појавата на микронуклеуси е важен индикатор и параметар во сите генотоксиколошки истражувања, истиот укажува на оштетувања на геномот и цитогенетски промени кои се акумулирани во подолг временски период и кои укажуваат за стабилноста на генетската конфигурација. Истиот параметар укажува на оштетувања во молекулата на ДНК или хромозомите, како и промени во клеточната делба. Одредувањето на микронуклеусите може да се врши многу лесно и тоа на различни видови клетки релевантни за човековиот биомониторинг: лимфоцити, фибробласти, епителните клетки, без дополнително *in vitro* култивирање.

При комбинација на микронуклеусниот тест со FISH - методата, се овозможува разликување на микронуклеусите кои го зафаќаат целиот хромозом (центромер позитивните микронуклеуси) и ацентричните хромозомни фрагменти (центромер негативните микронуклеуси). FISH методата овозможува процена на апсорбираната доза, доколку поминало подолго време од моментот на озрачување.

Комет тест е релативно брза и чувствителна процедура со која е можно да се измери квантитативно оштетување и поправка на молекула на ДНК на ниво на една клетка. Оваа техника има предности во однос на другите тестови за генотоксичност, бидејќи е чувствителна при откривање на ниско ниво на оштетување на ДНК, може да открие генотоксичност во отсуство на митотична активност, не бара голем број на клетки по примерок, не е скапа, лесно се применува и може да се изврши во пократок временски период. Оптимална е за откривање на ефектите од разни генотоксични супстанции.

Употребата на молекуларно биолошки техники посебно *Real time PCR*, има посебна примена во генотоксикологијата поради неговата прецизност, сензитивност и специфичност [33-35]. ELISA техниката е посебно корисна “алатка” за брзо откривање и квантифицирање на протеини во различни примероци. Нивната апликација во рамките на хуманиот биомониторинг е поради фактот што микрочиповите можат да детектираат експресија на неколку генски секвенци истовремено и во посебни и специфични услови. Досега објавените и публикувани трудови потврдуваат дека токму од тие причини овие техники наоѓаат своја примена во истражувања кога се проценува генотоксичноста на различни хемиски нокси присутни во нашата непосредна животна или работна средина.

5. ЗАКЛУЧОК

Имајќи ја во предвид секојдневната изложеност на организмот на различни полутанти присутни како во неговата работна така и во неговата непосредна животна средина, се повеќе се наметнува потребата од примена на различни молекуларни техники, тестови и алатки со кои можат да се потврди нивната цитотоксичност во организмот. Од таа причина, се надеваме дека со овој ревијален труд ќе влијаеме во што поголема примена и поголемо знаење за овие молекуларно биолошки техники и цитогенетски методи од страна на истражувачите, лаборантите, институтите чии истражувања се базираат на хуман биомониторинг.

Исто така, многу е важен изборот на молекуларно биолошки техники, клеточни линии и тестови во ваквиот тип на истражувања, посебно улогата на лаборантот и сите останати кои се вклучени во изведувањето на овие тестови и методи.

ЛИТЕРАТУРА

- Angerer, J., Ewers, U., & Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210:201–228.
- Blakely, W.F., Prasanna, P.G., Grace, M.B., & Miller, A.C. (2001). Radiation exposure assessment using cytological and molecular biomarkers. *Radiat. Prot. Dosim.*;97:17–23.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Stromberg, U., Vermeulen, R., & Tucker, J.D. (2005). Human population studies with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.*;45:258-70.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Rondinone, B. & Iavicoli, S. (2009). Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 50 (9). p.pp. 781–790.
- Chuang, J.C., & Jones, P.A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res.*;61:24R-29R.
- DeMarini, D.M. (2013). Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: A review. *Mutagenesis.*;28:485-505.
- Digue, L., Orsière, T., De Méo, M., Mattéi, M.G., Depetris, D., Duffaud, F., Favre, R. & Botta, A. (1999). Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 34 (4). p.pp. 269–278.
- Dusinska, M., & Collins, A.R (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions, *Mutagenesis*, Volume 23, Issue 3, Pages 191–205.
- Fenech, M. (1998). Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res* 404(1–2):155–65.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.*;659(1-2):93-108. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.007. Epub 2008 Apr 11. PMID: 18514568.
- Hou, L., Wang, D., & Baccarelli, A. (2011). Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat Res.*;714:105-12.
- Irais, P.N. (2016). Molecular biomarkers to assess health risks due to environmental contaminants exposure, *Biomédica*, vol. 36, núm. 2.
- Kopjar, N., & Garaj-Vrhovac, V. (2001). Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis.* 16(1).p.pp. 71-8.
- Kopjar, N., Milas, I., Garaj-Vrhovac, V. & Gamulin, M. (2006). Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clinical and Experimental Medicine.* 6 (4). p.pp. 177–190.
- Lettieri, T. (2006). Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.*;114:4–9.
- Meyer, J. N. (2010). QPCR: a tool for analysis of mitochondrial and nuclear DNA damage in ecotoxicology. *Ecotoxicology (London, England)*, 19(4), 804–811.
- Møller, P., Knudsen L.E., Loft, S., & Wallin, H. (2000) The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,1005-1015.
- Muñoz, B., & Albores, A. (2010). The role of molecular biology in the biomonitoring of human exposure to chemicals. *International journal of molecular sciences*, 11(11), 4511–4525.
- Palanikumar, L., & Panneerselvam, N. (2011). Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. *Russ J Genet* 47, 1033. <https://doi.org/10.1134/S1022795411090146>.
- Speit, G., Zeller, J., & Neuss, S. (2011). The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies, *Mutagenesis*, Volume 26, Issue 1, Pages 107–110.
- Thomas, P., Umegaki, K., & Fenech, M. (2003). Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 18(2):187–94.

- Velickova, N. & Milev, M. (2020). Genotoxicity Test Methods - a Tool for DNA and Chromosome Damage Biomonitoring. *Serbian Archives of Medicine*, 148 (9-10). pp. 626-630. ISSN 0370-8179/eISSN: 2406-0895.
- Velickova, N. (2016). Cytological monitoring of human lymphocytes, the main tool in environmental research. In: *Protection of natural resources and environmental management: The main tools for sustainability*, 10-13 Nov 2016, Bucharest, Romania.
- Velickova, N. (2018). Cellular and molecular alteration as biomarkers for xenobiotic exposure. In: *International Scientific Conference GREDIT 2018 – Green Development, Geen Infrastructure, Green Technology*, 22-25 March 2018, Skopje, Macedonia.
- Velickova, N. (2019). The Application and Benefits of Comet Assay in Biomonitoring Studies. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 46 (2). pp. 8-12. ISSN 2307-4531.
- Velickova, N., & Milev, M. (2017). Micronucleus Assay as Genotoxicity Method to Determine the Human Health Risk. *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 4 (5). pp. 31-35. ISSN p-2348-5213, e-2348-5221.
- Velickova, N., & Milev, M. (2019). Nuclear and cytoplasmatic abnormalities as a tools for evaluating genomic instability. In: *The 42nd European Congress of Cytology*, Malmö, Sweden.
- Velickova, N., & Milev, M. (2019). The importance of nuclear division index in biomonitoring human studies using the micronucleus assay. *Genetics&Applications*, 3 (2). p. 56. ISSN 2566-431X.
- Velickova, N., Milev, M., Ruskovska, T., & Petrova, B. (2015). Cytogenetic abnormalities in lymphocytes evaluated with micronucleus assay in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Genetika*, 47 (3). pp. 927-939. ISSN 1820-6069.
- Walker, N.J. (2001) Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*;15:121–127.
- Wilson, D.M. (2007). 3rd, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res.* 616:11-23.
- Wittmann, J., Jack, H.M. (2010). Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta.* 1806:200-7.
- Yang, A.S., Estecio, M.R., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E.H., & Issa, J.P. (2004) A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.*32:e38.