

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ В КОМПЛЕКСЕ С ОЦЕНКОЙ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МИРНК В ЭКЗОСОМАХ МОЧИ В ДИАГНОСТИКЕ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Кит О.И.¹, Тимошкова М.Ю.¹, Максимов А.Ю.¹, Вереникина Е.В.¹, Лукбанова Е.А.¹, Петрусенко Н.А.¹, Потемкин Д.С.¹, Кечерюкова М.М.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: katya.samarskaja@yandex.ru;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону

Целью настоящей работы была оценка эффективности метода жидкостной цитологии в комплексе с оценкой профиля экспрессии миРНК в экзосомах мочи при диагностике рака шейки матки и плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки. В исследование были включены 120 пациенток с раком шейки матки на стадиях T1a1-T2a1N0M0 и 50 пациенток с верифицированными гистологически плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки, а также 55 здоровых женщин. При постановке диагноза основывались на результатах гистологического анализа. Для проведения жидкостной цитологии собирали биоматериал из области шейки матки, из которого при помощи системы «Cytoscreen» приготавливали тонкослойные мазки. Экспрессию миРНК-20a и -21 в выделенных экзосомах мочи определяли методом ПЦР в реальном времени. Для оптимизации жидкостной цитологии были выбраны миРНК-20a и -21 вследствие их информативности. По результатам только жидкостной цитологии из 120 больных раком шейки матки диагноз совпал у 71,7% пациенток. Диагностическая чувствительность жидкостной цитологии при комплексировании с методом оценки экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи для определения риска развития рака шейки матки составила 80%. Анализ результатов дифференциальной диагностики рака шейки матки и плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени путем жидкостной цитологии показал диагностическую чувствительность 75,4% и специфичность 76%. В противоположность этому использование жидкостной цитологии, оптимизированной с помощью метода оценки уровня экспрессии миРНК-20a, позволило достичь диагностической чувствительности 82,5% и специфичности 92%. Оптимизация жидкостной цитологии с помощью анализа экспрессии миРНК в экзосомах мочи позволила повысить диагностическую чувствительность и специфичность. В заключение следует отметить, что одним из преимуществ оптимизированной жидкостной цитологии с помощью оценки уровня экспрессии миРНК в экзосомах мочи является сочетание высокой информативности с неинвазивным способом забора биоматериала для анализа.

Ключевые слова: жидкостная цитология, миРНК-20a, миРНК-21, рак шейки матки, плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокой степени.

ESTIMATION OF EFFICACY OF LIQUID-BASED CYTOLOGY TOGETHER WITH ESTIMATION OF MICRORNA EXPRESSION PROFILE IN URINARY EXOSOMES IN DIAGNOSIS OF SOME CERVICAL PATHOLOGIES

Kit O.I.¹, Timoshkova M.Y.¹, Maksimov A.Y.¹, Verenikina E.V.¹, Lukbanova E.A.¹, Petrusenko N.A.¹, Potemkin D.S.¹, Kecheryukova M.M.²

¹ National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: katya.samarskaja@yandex.ru;

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don

The purpose of this study was to assess the efficacy of liquid-based cytology in combination with an estimation of microRNA expression profile in urinary exosomes in diagnosis of cervical cancer (CC) and squamous intraepithelial lesions of the cervix. The study included 120 patients with T1a1-T2a1N0M0 CC, 50 patients with histologically verified squamous intraepithelial lesions of the cervix, and 55 healthy women. Diagnosis was based on the histological analysis results. Thin-layer swabs were prepared with the Cytoscreen system from the biological material collected from the cervix for liquid-based cytology. Expression of microRNA-20a and -21 in the isolated urinary exosomes was determined by real-time PCR. MicroRNA-20a and -21 were used to optimize liquid-based cytology due to their informative value. Liquid-based cytology alone showed the correct diagnosis of CC in 71.7% of 120 CC patients. The diagnostic sensitivity of liquid-based cytology when combined with the

evaluation of the miRNA-21 expression in urinary exosomes for determination of the risk of CC development was 80%. Analysis of differential diagnosis of CC and high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix by liquid-based cytology demonstrated the diagnostic sensitivity of 75.4% and specificity of 76%. In contrast, the use of liquid-based cytology optimized by the evaluation of miRNA-20a expression demonstrated the diagnostic sensitivity of 82.5% and a specificity of 92%. Optimization of liquid-based cytology with an assessment of the miRNA expression in urinary exosomes improved the diagnostic sensitivity and specificity. One of the advantages of optimized liquid-based cytology with an assessment of the miRNA expression in urinary exosomes involves the combination of high informative value and non-invasive biomaterial sampling for the analysis.

Keywords: liquid-based cytology, microRNA-20a, microRNA-21, expression, cervical cancer (CC), high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix (HSIL).

Среди всех онкозаболеваний у женщин рак шейки матки (РШМ) представляет собой довольно распространенную патологию [1]. При этом РШМ, выявленный на ранних стадиях онкогенеза, хорошо поддается лечению. В связи с этим очень важным для современной медицины является совершенствование диагностических приемов.

В настоящее время одним из принятых диагностических методов служит жидкостная цитология (ЖЦ). «Влажная» фиксация исследуемого биоматериала, лежащая в основе метода ЖЦ, позволяет свести к минимуму наличие крови, бактерий и артефактов, а также сохранить иммунологические и морфологические особенности исследуемых клеток в неизменном виде, что выгодно отличает данный метод диагностики от других [2].

Дополнительным методом диагностики можно считать скрининг ряда онкомаркеров, таких как миРНК [3, 4]. МиРНК являются особыми низкомолекулярными РНК, участвующими в регуляции экспрессии генов на разных уровнях [5]. Они обладают высокой специфичностью и стабильностью [6]. Большую роль в онкогенезе выполняют онкогены миРНК-20a и -21. МиРНК-20a участвует в инвазии рака, усиливает пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [7]. МиРНК-21 способствует росту опухоли, регулирует пролиферацию, апоптоз и миграцию клеток шейки матки (ШМ) [8]. Основываясь на литературных данных, мы выбрали миРНК-20a и -21 в качестве диагностических онкомаркеров.

Высокоинформативным приемом скрининга могут считаться исследования экзосом, участвующих в межклеточных взаимодействиях [9]. В состав экзосом могут входить различные комплексы молекул, такие как факторы передачи, ферменты обмена веществ, апоптотические белки (обозначается Alix), протеолитические протеины шапероны (защитные устройства для теплового шока: Hsp70 и Hsp90), а также миРНК [10]. Тот или иной молекулярный состав экзосом способен быть показателем определенных патологических либо естественных преобразований в клетках [11]. Доказано, что миРНК могут присутствовать в различных тканях и в природных жидкостях человеческого организма (в крови, моче), при этом они остаются стабильными в структуре подобных

жидкостей достаточно долго [12]. Таким образом, оценка профиля определенных миРНК в экзосомах мочи может являться высокоинформативным показателем.

Целью настоящей работы была оценка эффективности метода жидкостной цитологии в комплексе с оценкой профиля экспрессии миРНК в экзосомах мочи при диагностике некоторых патологий рака шейки матки, таких как рак шейки матки и плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки.

Материалы и методы исследования

Общая характеристика клинического исследования. Работа была выполнена на базе отделения онкогинекологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. В исследование были включены 120 пациенток с РШМ на стадиях T1a1-T2a1N0M0 и 50 пациенток с верифицированными гистологически плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями (ПИП) шейки матки высокой степени (ВС) и низкой степени (НС), наблюдавшиеся с 2015 г. по 2020 г., а также 55 здоровых женщин. Условием включения в исследование было наличие экспрессии миРНК-20а и миРНК-21 в экзосомах мочи. Для постановки диагноза основывались на результатах гистологического анализа в соответствии со стандартами диагностики злокачественных новообразований шейки матки и морфологической системой Бетесда.

Получение экзосом мочи. Для получения высокочистых экзосомальных мембран 20 мл собранной мочи центрифугировали при 17000 g в течение 15 минут при 24°C. Супернатант удаляли и инкубировали при комнатной температуре в течение 25 минут. Осадок ресуспендировали в 200 мкл изоляционного раствора (250 ммоль/л сахарозы и 10 ммоль/л триэтаноламин-НСl, рН 7,6) и 50 мкл 3,24 ммоль/л дитиотреитола (ДТТ), а затем центрифугировали при 17000 g в течение 15 мин при 24°C. Полученный супернатант собирали и объединяли с супернатантом, полученным ранее, и центрифугировали при 20000 g в течение 2 ч при 24°C. Гранулы экзосом растворяли в 50 мкл буфера Лэммли (0,6% мас./об. SDS, 3% об./об. глицерина, 18 ммоль/л Трис-НСl рН 6,8 и 0,003% мас./об. бромфенолового синего) и хранили при -20°C для дальнейшего использования [13].

Жидкостная цитология. Биообразцы собирали из области шейки матки стандартной пластиковой щеткой из набора «Cytoscreen» («Hologic», США), съемную головку которой с отобранным материалом погружали во флакон со стабилизирующим раствором «Cytoscreen». Затем приготавливали тонкослойные мазки, которые окрашивали по Романовскому в модификации Паппенгейма. Микроскопическое исследование препаратов производили с помощью светового микроскопа ЛОМО ЕС БИМАМ Р 11 при 100-кратном увеличении. При интерпретации результатов жидкостной цитологии использовали унифицированные термины системы Бетесда (The Bethesda System, TBS 2014).

Оценка экспрессии миРНК. В работе определяли уровень экспрессии миРНК-20а, -21, -23b и -375. Выделение тотальной РНК из мочи осуществляли сорбентным методом набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» («НекстБио», Россия). Образцы обрабатывали ДНКазой (6 ед. активности) в течение 40 мин при комнатной температуре в соответствующем буфере (реагенты «Applied Biosystems», США). Для проведения обратной транскрипции использовали набор «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit» («Applied Biosystems», США). Экспрессию миРНК в экзосомах мочи определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием термоциклера «Bio-Rad CFX96» («Bio-Rad», США) и программного обеспечения «Bio-Rad CFX Manager». При этом сравнивали величины пороговых циклов *Ct* изучаемой и референсной миРНК. Референсными локусами служили миРНК U6 snRNA. Образец везикул мочи исследовали, если экспрессию локуса U6 snRNA обнаруживали при значении порогового цикла *Ct* до 45 циклов. В каждом образце миРНК амплифицировали трехкратно и рассчитывали усредненное значение порогового цикла *Ct*. Уровень экспрессии миРНК (RE) был рассчитан по методу Pfaffl M.W. [14]. Уровень экспрессии выражается в условных единицах.

Статистический анализ результатов. При статистическом анализе применяли методы описательной статистики. Для выражения экспрессии миРНК использовали среднее значение и стандартную ошибку средней. При сравнении средних величин применяли критерий Манна–Уитни. Проводили ROC-анализ. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft, США).

Результаты исследования и их обсуждение

Частота встречаемости миРНК в экзосомах мочи у пациенток с РШМ, ПИП ВС и здоровых приведена в таблице 1. МиРНК-20а, миРНК-21 и миРНК-375 в экзосомах мочи встречались часто (>70%), а миРНК-23b в экзосомах мочи – редко и независимо от патологии шейки матки, что делает исследование ее экспрессии нецелесообразным. Различий в экспрессии миРНК-20а и миРНК-375 в подгруппах пациенток не наблюдалось. Напротив, миРНК-21 чаще экспрессировалась у пациенток с РШМ (85,5%) и ПИП ВС (86,8%) по сравнению со здоровыми пациентками (69,1%).

Таблица 1

Частота выявления миРНК (абс. (%)) в экзосомах мочи у пациенток в зависимости от патологии шейки матки

миРНК	РШМ (n=145)	ПИП ВС (n=91)	Здоровые (n=55)	p
миРНК-20а	136 (93,8%)	84 (92,3%)	47 (85,5%)	$p_{ми} > 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

миРНК-21	124 (85,5%)	79 (86,8%)	38 (69,1%)	$p_{\text{мн}}=0,01$ $p_1>0,05$ $p_2=0,015$ $p_3=0,017$
миРНК-23b	17 (11,7%)	13 (14,3%)	11 (20%)	$p_{\text{мн}}>0,05$ $p_1>0,05$ $p_2>0,05$ $p_3>0,05$
миРНК-375	102 (70,3%)	63 (69,2%)	40 (72,7%)	$p_{\text{мн}}>0,05$ $p_1>0,05$ $p_2>0,05$ $p_3>0,05$

Примечание: p – доверительная вероятность, p_1 – «РШМ» vs «ПВП ВС», p_2 – «РШМ» vs «ПВП НС», p_3 – «ПВП ВС» vs «ПВП НС», $p_{\text{мн}}$ – множественное сравнение всех подгрупп (мн).

У женщин с РШМ, в отличие от здоровых, уровень экспрессии миРНК-20а в экзосомах мочи был повышен: $0,68\pm 0,13$ против $0,06\pm 0,05$ ($p=0,0001$). ROC-анализ показал, что если экспрессия миРНК-20а в экзосомах мочи у пациенток была выше 0,46, то с диагностической чувствительностью 86,8% и специфичностью 82,1% можно говорить о наличии РШМ. При этом площадь под ROC-кривой составила $0,831\pm 0,057$, что свидетельствует о хорошем качестве генетического теста ($z=5,78$, $p<0,0001$). Экспрессия миРНК-20а в экзосомах мочи у пациенток с РШМ ($0,68\pm 0,13$) и ПВП ВС ($0,32\pm 0,11$) статистически значимо различалась ($p=0,004$). Если экспрессия миРНК-20а в экзосомах мочи у пациенток с патологией шейки матки превышала разделительный уровень 0,53, то с диагностической чувствительностью 91,2% и специфичностью 76% это свидетельствует в пользу диагноза РШМ, а не ПВП ВС, при этом площадь под ROC-кривой составила $0,853\pm 0,050$, что свидетельствует о хорошем качестве генетического теста ($z=6,87$, $p<0,0001$), сопоставимом диагностике РШМ.

В отношении миРНК-21 установлен высокий уровень экспрессии в экзосомах мочи как при РШМ ($0,99\pm 0,15$), так и при ПВП ВС ($0,78\pm 0,22$). При превышении экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи у пациенток разделительного уровня 0,41 с диагностической чувствительностью 92,5% и специфичностью 65,5% можно говорить о РШМ, при этом площадь под ROC-кривой составила $0,805\pm 0,056$, что свидетельствует о хорошем качестве генетического теста ($z=5,43$, $p<0,0001$). При дифференциальной диагностике РШМ и ПВП ВС по экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи площадь под ROC-кривой имела низкое значение ($0,572\pm 0,071$), что говорит о низком качестве генетического теста.

Таким образом, было выявлено усиление экспрессии проопухолевых миРНК-20а и -21, что согласуется с литературными данными, согласно которым данные РНК выступают в качестве онкогенных факторов [8, 15].

Уровни экспрессии миРНК-375 в экзосомах мочи у пациенток с РШМ ($-0,562 \pm 0,08$) и у здоровых ($-0,04 \pm 0,01$) статистически значимо различались ($p=0,002$). Если экспрессия миРНК-375 в экзосомах мочи у пациенток ниже $-0,45$, то с диагностической чувствительностью 76,9% и специфичностью 79,3% можно сделать вывод о наличии РШМ, при этом площадь под ROC-кривой составила $0,840 \pm 0,048$, что свидетельствовало о хорошем качестве генетического теста ($z=7,04$, $p<0,0001$). У пациенток с ПИП ВС уровень экспрессии миРНК-375 был низким ($-0,13 \pm 0,06$). Различие экспрессии изучаемой миРНК между пациентками с РШМ и ПИП ВС было статистически значимым ($p=0,005$). Если экспрессия миРНК-375 в экзосомах мочи у пациенток была ниже разделительного уровня $-0,50$, то с диагностической чувствительностью 87,2% и специфичностью 58,6% можно сформировать заключение о РШМ как альтернативе ПИП ВС. Площадь под ROC-кривой составляла $0,727 \pm 0,062$, генетический тест разграничения ПИП ВС и РШМ по уровню экспрессии миРНК-375 в экзосомах мочи был статистически значимым ($z=3,63$, $p<0,0003$). Таким образом, при снижении уровня экспрессии миРНК-375 повышается вероятность развития РШМ, что согласуется с литературными данными, согласно которым сверхэкспрессия миРНК-375 способствует подавлению пролиферации клеток, повышению активности лактатдегидрогеназы и индуцированию апоптоза в клетках рака шейки матки HPV-18 (+). В еще одной работе было показано, что сверхэкспрессия миРНК-375 усиливает активность каспазы-3 и каспазы-9 и подавляет экспрессию циклина D1 и белка сурвивина в клетках рака шейки матки HPV-18 (+) [16, 17].

Итак, наиболее информативным можно считать метод анализа экспрессии миРНК-20а и сравнения ее уровня с найденными точками cut-off для разделения состояний РШМ и норма, РШМ и ПИП ВС, а также уровня миРНК-21 для диагностики РШМ. Эти миРНК были использованы для оптимизации метода жидкостной цитологии: миРНК-21 для диагностики РШМ, а миРНК-20а для дифференциальной диагностики РШМ и ПИП. Под оптимизацией метода понимается корректировка его результатов с помощью генетических методов.

При диагностике только методом жидкостной цитологии диагноз совпал у 86 (71,7%) из 120 пациенток с РШМ (табл. 2).

Таблица 2

Таблица информативности жидкостной цитологии по выявлению РШМ

Методы	Гистологическое заключение		Итого
	РШМ	Нет РШМ	
Заключение жидкостной цитологии			
Совпало с гистологическим	86	11	97
Не совпало	34	44	78
Итого	120	55	175

Из 120 больных РШМ повышение уровня экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи выше разделительного уровня 0,41 отмечалось у 111 пациенток. При оценке риска развития РШМ по анализу экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи диагностическая чувствительность составляла 92,5%, а специфичность – 65,5%.

Статистическая матрица для расчета информативности оптимизированной жидкостной цитологии в целях выявления РШМ отражена в таблице 3. Диагностическая чувствительность оптимизированной жидкостной цитологии с помощью генетических методов оценки экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи для определения риска развития РШМ составила 80%. Таким образом, оптимизация жидкостной цитологии путем оценки уровня экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи позволила повысить диагностическую чувствительность с 71,7% до 80%.

Таблица 3

Таблица информативности жидкостной цитологии, оптимизированной при помощи генетических методов, для выявления РШМ

Методы	Гистологическое заключение		Итого
	РШМ	Нет РШМ	
Заключение жидкостной цитологии и оценки экспрессии миРНК-20а в экзосомах			
Совпало с гистологическим	96	11	107
Не совпало	14	44	58
Итого	120	55	175

Диагностическая чувствительность жидкостной цитологии, проводимой с целью дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС, составляла 75,4%, а специфичность – 76% (табл. 4).

Таблица 4

Таблица информативности дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС путем жидкостной цитологии

Методы	Гистологическое заключение		Итого
	РШМ	ПИП ВС	
Заключение жидкостной цитологии			
Положительное (РШМ)	86	12	98
Отрицательное (Нет РШМ, есть ПИП ВС)	28	38	66
Итого	114	50	164

Повышение экспрессии миРНК-20а в экзосомах мочи выше разделительного уровня 0,53 наблюдалось у 104 из 114 больных РШМ. Диагностическая чувствительность дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС по анализу экспрессии миРНК-20а в экзосомах мочи составила 91,2%, а специфичность метода – 76%.

Статистическая матрица для расчета информативности оптимизированной жидкостной цитологии для дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС отражена в таблице 5.

Таблица 5

Таблица информативности жидкостной цитологии, оптимизированной при помощи генетических методов, для дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС

Методы	Гистологическое заключение		Итого
	РШМ	ПИП ВС	
Заключение жидкостной цитологии и оценки экспрессии миРНК-20а в экзосомах			
Положительное	94	4	98
Отрицательное	20	46	66
Итого	114	50	164

Диагностическая чувствительность оптимизированной жидкостной цитологии с помощью генетического метода оценки экспрессии миРНК-20а в экзосомах для дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС составила 82,5%, а специфичность – 92%. Таким образом, оптимизация жидкостной цитологии путем оценки экспрессии миРНК-20а в экзосомах мочи позволила повысить диагностическую чувствительность при дифференциальной диагностике РШМ и ПИП ВС с 75,4% до 82,5%, а диагностическую специфичность – с 76% до 92%.

Заключение

Выбранные для проведения исследования миРНК могут использоваться для оптимизации жидкостной цитологии вследствие своей информативности. Анализ уровня экспрессии миРНК-20а рекомендуется применять для дифференциальной диагностики состояний РШМ и норма, РШМ и ПИП ВС, а уровня миРНК-21 – для диагностики РШМ.

Оптимизация жидкостной цитологии с помощью анализа экспрессии миРНК-21 в экзосомах мочи позволила повысить диагностическую чувствительность с 71,7% до 80%. А при комплексировании жидкостной цитологии с оценкой уровня экспрессии миРНК-20а наблюдалось увеличение диагностической чувствительности дифференциальной диагностики РШМ и ПИП ВС с 75,4% до 82,5%, а специфичности – с 76% до 92%.

В заключение следует отметить, что одним из преимуществ оптимизированной жидкостной цитологии с помощью оценки уровня экспрессии миРНК в экзосомах мочи является сочетание высокой информативности с неинвазивным способом забора биоматериала для анализа. Комплексирование общепризнанного метода жидкостной цитологии с генетическими методами оценки экспрессии онкомаркеров позволит расширить возможности диагностической помощи больным РШМ на ранних стадиях.

Список литературы

1. Williamson A.L., Grant–Kels J. The interaction between human immunodeficiency virus and human papillomaviruses in heterosexuals in Africa. *Journal of clinical medicine*. 2015. V. 4 (4). P. 579-592. DOI: 10.3390/jcm4040579.
2. Казаишвили Т.Н. Ранняя диагностика рака шейки матки методом жидкостной цитологии // I Национальный конгресс «Онкология репродуктивных органов от профилактики и раннего выявления к эффективному лечению». 2016. № 81. С. 80-81.
3. Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Апанович П.В., Нариманов М.Н., Малихова О.А., Кушлинский Н.Е., Стилиди И.С., Карпухин А.В. Группа микроРНК в качестве кандидатов в прогностические биомаркеры метастазирования рака желудка // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. № 169 (1). С. 84-87.
4. Кит О.И., Тимошкина Н.Н., Пушкин А.А., Способ дифференциальной диагностики глиом на основании анализа экспрессии генов и микроРНК. Патент на изобретений RV 2709651 C1, 19.12.2019.
5. Кит О.И., Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н. Роль микроРНК в регуляции сигнальных путей при меланоме // Молекулярная медицина. 2017. № 15 (1). С. 15-23.
6. Архангельская П.А., Бахидзе И.В., Берлев Е.В. МикроРНК, ВПЧ–инфекция и цервикальный канцерогенез. Молекулярные аспекты и перспективы клинического использования // Сибирский онкологический журнал. 2016. № 15 (4). С. 88-97. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-88-97.
7. Blackburn E.H. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000. V. 408. P. 53-56. DOI: 10.1038/35040500.
8. Yao T., Lin Z. MiR–21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012. V. 1822 (2). P. 248-260. DOI: 10.1016/j.bbdis.2011.09.018.
9. Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д. Эндотелиальные микровезикулы – посредники межклеточных взаимодействий в сосудистом секторе // Тромбоз, гемостаз и реология. 2011. № 2 (46). С. 6-13.
10. Chehna–Patel N., Khole V., Sachdeva G., Warty N. Proteolytic tailoring of the heat shock protein 70 and its implications in the pathogenesis of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2011. V. 95. no 5. P. 1560-1567.
11. Lithwick–Yanai G., Dromi N., Shtabsky A. Multicentre validation of a microRNAbased assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. *J. Clin. Pathol*. 2017. V. 70 (6). P. 500-507.

12. Xin F., Liu P., Ma C-F. A circulating serum miRNA panel as early detection biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016. V. 20 (23). P. 4846-4851.
13. Pathare G., Dhayat N.A., Mohebbi N., Wagner C.A., Bobulescu I.A., Moe O.W., Fuster D.G. Changes in V-ATPase subunits of human urinary exosomes reflect the renal response to acute acid/alkali loading and the defects in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int.* 2018. V. 93 (4). P. 871-880. DOI: 10.1016/j.kint.2017.10.018.
14. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29 (9). DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
15. Hasanzadeh M., Movahedi M., Rejali M., Maleki F. The potential prognostic and therapeutic application of tissue and circulating microRNAs in cervical cancer. *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. P. 1289-1294. DOI: 10.1002/jcp.27160.
16. Ola S. Ali, Marwa I. Shabayek, Mae M. Seleem, Heba G. Abd El-Aziz Nasr, Dalia O. Makhoulf. MicroRNAs 182 and 375 Sera Expression as Prognostic Biochemical Markers in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer.* 2018. V. 18. no. 6. P. e1373-1379.
17. Shuying Wu, Hong Chen. Anti-Condyloma acuminata mechanism of microRNAs-375 modulates HPV in cervical cancer cells via the UBE3A and IGF-1R pathway. *Oncology letters.* 2018. V. 16. P. 3241-3247. DOI: 10.3892/ol.2018.8983.