

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКЗОСОМАЛЬНЫХ МИКРОРНК ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Самсонов Р.Б.^{1,2}, Тарасов М.А.³, Бурдаков В.С.⁴, Штам Т.А.^{1,2,4}, Гуляев А.М.¹, Ткаченко О.Б.¹, Рыбаков Е.Г.³, Филатов М.В.⁴, Айгнер А.⁵, Малек А.В.^{1,2}

¹ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург (директор – д.м.н., профессор А.М.Беляев)

² ООО «Онко-система», г. Москва (директор – к.м.н. А.В.Малек)

³ ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, г. Москва (директор – член-корр. РАН, профессор Ю.А.Шелыгин)

⁴ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, г. Гатчина (директор, и.о. – С.Е.Горчаков)

⁵ Институт фармакологии и токсикологии им. Рудольфа Бухгейма, г. Лейпциг, Германия (директор – профессор М.Шефер)

ЦЕЛЬ. Оценка диагностической значимости анализа экзосомальных микроРНК при колоректальном раке (КРР).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании был использован материал (плазма) от 100 пациентов с опухолевыми заболеваниями толстой кишки и 20 здоровых доноров. Экзосомы были выделены методом дифференциального ультра-центрифугирования, анализ проведен методами лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), проточной цитометрии. Количественный анализ экзосомальных микроРНК проведен методом ОТ-ПЦР. Для оценки полученных результатов использован статистический критерий Краскела-Уоллиса. ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Показано, что КРР вызывает характерные изменения концентрации ряда экзосомальных микроРНК. Для использования полученных результатов с целью персонализированной диагностики КРР, предложен алгоритм анализа «реципрокных микроРНК пар». Оптимальные результаты получены при анализе пары miR-223/miR-181a (чувствительность =0,93; специфичность =0,88).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Анализ экзосомальных микроРНК представляется перспективным методом ранней диагностики / скрининга колоректального рака.

[Ключевые слова: колоректальный рак, экзосомы, микроРНК, диагностика, скрининг]

DIAGNOSTIC VALUE OF EXOSOMAL MIRNAS FOR COLORECTAL CANCER

Samsonov R.B.^{1,2}, Tarasov M.A.³, Burdakov V.S.⁴, Shtam T.A.^{1,2,4}, Guljaev A.M.¹, Tkachenko O.B.¹, Rybakov E.G.³, Filatov M.V.⁴, Aigner A.⁵, Malek A.V.^{1,2}

¹ «N.N. Petrov NMRC of oncology», the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

² Onco-System LLC, Moscow, Russia

³ State Scientific Centre of coloproctology, Moscow, Russia

⁴ National Research Center «Kurchatov Institute» – B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia

⁵ Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Leipzig, Germany

OBJECTIVE. Assessment of diagnostic significance of exosomal microRNAs analysis in colorectal cancer (CRC).

MATERIALS AND METHODS. Plasma samples from 100 patients with colon tumors and 20 healthy donors. Exosomes were isolated by differential ultracentrifugation, the analysis was performed by dynamic light scattering (DLS), cryo-EM, flow cytometry. Quantitative analysis of exosomal microRNAs was performed by RT-PCR. To evaluate the results obtained, the Kraskel-Wallis statistical test and ROC analysis were used.

RESULTS. It is shown that CRC causes characteristic changes in the concentration of a number of exosomal microRNAs. Analysis of «reciprocal miRNAs pairs» was proposed as algorithm for personalized diagnostic of CRC. The optimal parameters of diagnostic values were obtained for miRNA pair «miR-223 / miR-181a» (sensitivity =0.93, specificity =0.88).

CONCLUSION. The analysis of exosomal microRNAs presents a promising method for early diagnostics / screening of colorectal cancer.

[Key words: colorectal cancer, exosomes, microRNA, diagnostics, screening]

Адрес для переписки: Самсонов Р.Б., «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург;

e-mail: rom_207@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологической заболеваемости и смертности [1]. Разработка методов скрининга и ранней диагностики sporадического (не наследственного) КРР является актуальной научной и социальной задачей. Кроме того, повышение эффективности терапии этого заболевания определяет необходимость создания чувствительных методов мониторинга и ранней диагностики рецидивов. Традиционными методами скрининга КРР рака принято считать анализ кала на скрытую кровь и эндоскопические исследования. Эти методы в разных комбинациях и для различных возрастных групп рекомендованы в большинстве индустриально развитых стран. Анализ преимуществ и недостатков традиционных подходов к диагностике КРР сделан Соколовой Е.А. и соавторами [2]. В целом, показатели онкологической статистики демонстрируют низкую эффективность доступных методов: в России диагноз КРР ставится на IV стадии – в 27,7%, на III стадии – в 23,9%, на II стадии – в 37,5% и на I стадии – лишь в 8,8% случаев [1].

«Жидкая биопсия» (liquid biopsy) – комплекс методов выявления онкомаркеров в крови или других биологических жидкостях. Перспективность этого подхода определяется рядом факторов: высокая эффективность, низкая стоимость, малоинвазивность [3]. В крови (или плазме) можно обнаружить циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), субклеточные образования и отдельные молекулы, включая белки, гликопротеины, нуклеиновые кислоты. Методы, основанные на выделении ЦОК, характеризуются высокой специфичностью, но низкой чувствительностью, по естественной причине малого количества (или отсутствия) опухолевых клеток в циркуляции на начальных стадиях развития КРР. Методы, основанные на определении молекулярных маркеров (например, СА 19-9, РЭА, СА 72-4), характеризуются относительно высокой чувствительностью, но низкой специфичностью по причине отсутствия абсолютно специфичных молекулярных маркеров КРР.

Активные исследования ведутся в направлении разработки методов выявления эпигенетических маркеров КРР. В эту группу могут быть включены молекулярные маркеры, отражающие функциональное состояние генома опухолевых клеток: специфические фрагменты метилированной ДНК, белок-кодирующие мРНК или регуляторные молекулы РНК (микроРНК и др.). Например, анализ статуса метилирования гена SEPT9 позволяет выявить

КРР с чувствительностью – 0,9 и специфичностью – 0,88 [4]. Этот анализ уже внедрен в клиническую практику рядом зарубежных производителей: Epi proColon 2.0 (Epigenomics), ColoVantage™ (Quest Diagnostic) и RealTime ms9 (Abbott). Оценка статуса метилирования других генов (APC, CDKN2A/P16h, ALX4, TMEFF2, NGFR, FRP2, NEUROG1, TPEF/HPP1, и RUNX3) потенциально может иметь диагностическую ценность, но требует дополнительных исследований [5-7]. Количественный анализ фрагментов белок-кодирующих молекул РНК также может быть использован для диагностики КРР. Например, диагностическая «панель» ColonSentry, включающая 7 молекул *ANXA3*, *CLEC4D*, *LMNB1*, *PRRG4*, *TNFAIP6*, *VNN1* и *IL2RB*, была протестирована на различных группах пациентов. Выявленные показатели чувствительности и специфичности колебались в диапазоне 0,61-0,72 и 0,7-0,77, соответственно [8,9]. К эпигенетическим факторам, имеющим диагностический потенциал, могут быть отнесены микроРНК. Это короткие регуляторные молекулы (20-22 н.т.), контролирующие экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне. Например, «панель» из 6 молекул (miR-15b, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-29a и miR-335) позволяет поставить диагноз КРР со специфичностью 0,79 и чувствительностью 0,78 [10]. Авторы другой работы показали высокий диагностический потенциал альтернативного сочетания микроРНК: miR-193a-3p, miR-23a и miR-338-5p [11]. В целом, к настоящему времени база PubMed содержит более 100 публикаций, посвященных возможностям диагностики КРР с помощью анализа циркулирующих микроРНК, но пока ни один из предлагаемых методов не вышел на этап клинического тестирования.

Результатом цитируемых выше (и большинства аналогичных) работ стало создание «диагностических панелей», т.е. наборов молекулярных маркеров, одновременный анализ которых повышает диагностическую ценность метода. Однако, такие наборы – это искусственные сочетания молекул, между которыми может не быть (и, как правило, нет) патогенетической или даже биологической связи. Очевидно, что естественный мультимолекулярный комплекс онкомаркеров, взаимосвязано участвующий в развитии опухоли, имел бы существенно более высокий диагностический потенциал, чем любая эмпирически созданная «диагностическая панель». С открытием феномена «микро-везикулярных межклеточных коммуникаций» (microvesicles-based intercellular communication) появилась теоретическая возможность выделения и анализа естественных мультимолекулярных комплексов, секретируемых опухолевыми клетками [12,13]. Экзосомы – мембранные нано-везикулы – один из

наиболее полно изученных типов внеклеточных везикул. Экзосомы секретируются большинством типов клеток, включая клетки опухоли, и присутствуют практически во всех биологических жидкостях, включая плазму. Биохимический состав экзосом представляется «молекулярным профилем» секретирующих их клеток. Экзосомы опухолевого происхождения могут рассматриваться как естественные и биологически стабильные комплексы молекулярных онкомаркеров [14]. Выделение экзосом и анализ экзосомальных компонентов (например, микроРНК) может быть основой нового метода диагностики онкологических заболеваний, в частности КРР. Задачей данной работы была проверка этой гипотезы и оценка диагностической значимости нового метода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазма. Биологический материал был получен от 100 пациентов, проходивших обследование или лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова (Санкт-Петербург) и ГНЦК им.А.Н.Рыжих (Москва) и 20 здоровых доноров. Венозная кровь собиралась в вакутейнеры с ЭДТА, плазма отделялась в течение 10 минут после забора крови, замораживалась и хранилась при -80°C .

Выделение и анализ экзосом. Для выделения экзосом, плазму (2 мл) размораживали до $+4^{\circ}\text{C}$, разводили 1:1 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и последовательно центрифугировали при 300g, 2000g и 10000g в течение 30 минут для осаждения клеточного детрита и крупных мембранных везикул. Экзосомы выделяли из супернатанта путем ультрацентрифугирования (Beckman Coulter, США) при 110.000G, в течение 90 мин., при $+4^{\circ}\text{C}$. Осадок, содержащий экзосомы, разводили в 100 мкл ФСБ для последующего анализа.

Лазерную корреляционную спектроскопию (ЛКС) использовали в качестве основного метода регистрации экзосом в биологических жидкостях. Размер наночастиц (гидродинамический радиус) рассчитывали на основе данных о коэффициенте диффузии. Измерения проводили на лазерном анализаторе Nanotracs Wave II, (Microtracs, Германия). Результат измерений представлен в виде гистограммы распределения частиц по размерам (гистограмма фракционного состава), в которой ось абсцисс – шкала размеров представлена в нанометрах, а по оси ординат отложен вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. Криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) была проведена с целью оценки морфологии выделенных микровезикул. Исследование проводилось

на просвечивающем криоэлектронном микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM (FEI, США), оснащенном высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II (FEI, США) и корректором сферических аберраций (CEOS, Германия). Электронно-микроскопические медные сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода, были обработаны в тлеющем разряде с использованием установки Pelco easi Glow для получения гидрофильной поверхности. Далее на сетки наносили 3 мкл препарата, и, с помощью установки Vitrobot Mark IV (FEI, США), проводили процедуру мгновенной заморозки образцов в жидком этане, охлажденном до температуры жидкого азота (-196°C). В результате образцы были зафиксированы в тонком слое аморфного льда, что позволило исследовать везикулы в нативном состоянии. Для минимизации радиационных повреждений набор данных проводился с помощью программного обеспечения EPU (FEI, США) в режиме малых доз.

Проточную цитометрию (ПЦ) применяли для оценки экспрессии поверхностных белковых молекул – т.н. экзосомальных маркеров. Для этого был использован набор Echo-FACS (HansaBioMed, Эстония), содержащий латексные микрочастицы, (4 мкм), неспецифично связывающие мембранные везикулы. Определение экзосомальных маркеров на поверхности экзосом проводили после инкубации микрочастиц с флуоресцентно мечеными антителами: anti-CD9 и anti-CD63 (Abcam, США). Измерения проводили на аппарате CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Выделение РНК и анализ микроРНК. Для выделения РНК из препаратов экзосом использовали наборы для выделения на основе спин-колонок производства компании Био-Силика (Новосибирск, Россия). Профайлинг 84 микро-РНК был проведен с использованием реагентов компании Qiagen (Дания): miRCURY LNA UniversalRT microRNA Polyadenylation and cDNA synthesis Kit, Cancer Focus microRNA PCR Panels, ExiLENT SYBR Greenmaster mix. Анализ выбранных в результате скрининга 12 потенциально «маркерных» микро-РНК был проведен с помощью реагентов компании Вектор Бест (Новосибирск, Россия). Последовательности праймеров для обратной транскрипции и ПЦР могут быть предоставлены авторами по запросу. ПЦР проводили на аппарате CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Нормализацию результатов производили относительно референсных микроРНК (U6 snRNA, miR-191-5p) или относительного среднего для каждого эксперимента значения Ct по формуле $2^{(Ct\ reference - Ct\ target)}$. Статистические расчеты выполнены с помощью программы Graph Pad Prism 6, Sigma Plot 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество и состав экзосом плазмы исследованы плохо, но по имеющимся литературным данным эти показатели не стабильны и меняются в связи с различными физиологическими или патологическими процессами. Для исключения влияния наркоза, операции и послеоперационного периода на результаты исследования в работу был включен материал (плазма) от пациентов до и после операции. Сравнение проводилось между пациентами двух групп: пациенты, перенесшие радикальную (1) и циторедуктивную (2) операцию. Профиль концентрации экзосомальных микроРНК оценивался с целью выделения молекул «ушедших» из циркуляции после операции, но лишь в группе 1. Валидацию полученных данных проводили на независимой выборке пациентов четырех групп: здоровых доноров, пациентов с доброкачественными образованиями толстой кишки, пациентов с КРП до операции и после операции. В заключение, оценка диагностических параметров предложенного метода была проведена на материале, полученном от 20 пациентов с КРП и 10 здоровых доноров. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Экзосомы выделяли методом дифференциального центрифугирования и анализировали в соответствии с рекомендациями ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) [15]. Так, размер выделенных везикул колебался в диапазоне 90-160 нм

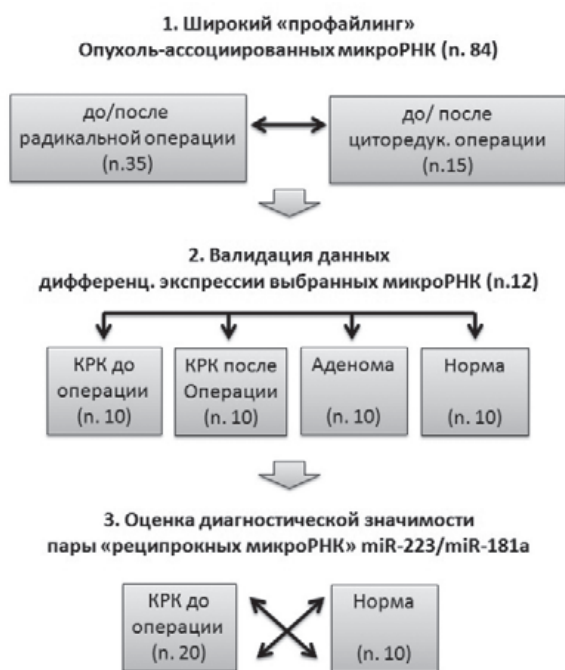


Рисунок 1. Дизайн исследования

(Рис. 2А), единичные везикулы представляли собой «пузырьки», ограниченные двухслойной мембраной (Рис. 2В), на поверхности везикул определялись т.н. «экзосомальные» маркеры: тетраспанины CD9 и CD63 (Рис. 2С). По совокупности полученных данных можно было полагать, что в анализируемых препаратах содержались экзосомы.

Из экзосом была выделена тотальная РНК, анализ концентрации микроРНК в каждом образце был проведен с помощью реакции ОТ-ПЦР, анализируемая «панель» включала 84 молекулы. После нормализации результатов анализа одной панели, проводили сравнение данных анализа образцов каждого пациента до и после операции. На рисунке 3 представлен пример результатов такого сравнения для одного пациента по всем тестируемым молекулам микроРНК (расположены по оси X). Отклонение по оси Y соответствует изменению концентрации определенной молекулы. Молекулы, концентрация которых не отличалась в образцах, полученных до и после операции, обозначены точками, расположенными на (вдоль) оси X. Так, на представленном рисунке видно, что концентрация большинства микроРНК не изменилась после операции. Изменилась концентрация лишь нескольких микроРНК: концентрация miR-23, miR-29, miR-181 – понизилась, amiR-192, miR-223 – повысилась после операции. Результаты, полученные на данном этапе анализа групп пациентов, не были ста-

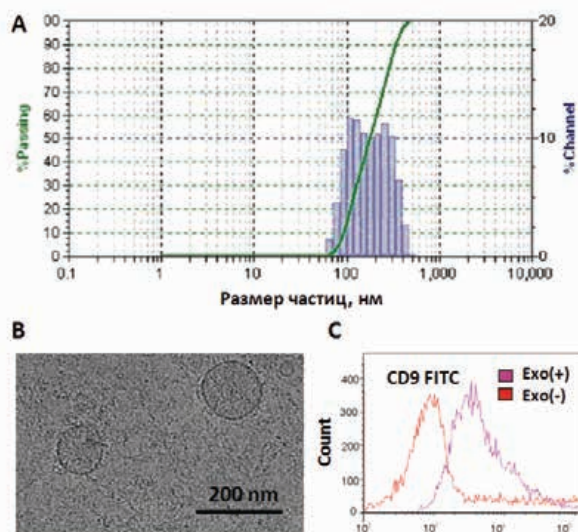


Рисунок 2 (А,В,С). Физико-химическая характеристика выделенных везикул. Физико-химическая характеристика выделенных везикул. 2А – определение размера везикул методом DLS, 2В – результаты крио-ЭМ, 2С – характеристика везикул по поверхностным маркерам при помощи проточной цитометрии, пик флуоресценции по FITC свидетельствует о наличии экзосомального маркера CD9 на поверхности выделенных везикул

статистически значимыми. Но они позволили выбрать 12 «потенциально маркерных» молекул, односторонние изменения концентрации которых были ассоциированы с перенесенной радикальной операцией более чем у половины пациентов группы 1 (n=35), но не наблюдались у пациентов, перенесших циторедуктивную операцию – группа 2 (n=15).

Далее анализ концентрации 12 выбранных молекул был проведен на независимых группах: здоровых доноров; пациентах, перенесших диагностическую колоноскопию; пациентах с диагнозом «аденоматозный полип»; пациентах с диагнозом КРР (аденокарцинома) и пациентах с КРР после радикальной операции. В каждой группе было по 10 пациентов. При анализе данных, полученных для разных клинических групп, был выявлен ряд статистически значимых ассоциаций (Рис. 4). Например, концентрация экзосомальной фракции miR-93 была существенно выше в группе пациентов с доброкачественными образованиями толстой кишки по сравнению с другими группами. Концентрация miR-223 у здоровых доноров была выше, чем у всех пациентов, повышение концентрации miR-181a наблюдалось у пациентов с КРР.

Целью данной работы была оценка диагностической значимости метода, т.е. потенциал его применения с целью ранней диагностики / скрининга КРР. Эта задача предполагала поиск параметра, который не просто отличает группы пациентов, но может быть использован для персонализированной диагностики, т.е. для оценки состояния одного пациента. В ряде опубликованных ранее работ [16,17] нами был предложен метод оценки соотношения т.н. «реципрокных микроРНК пар». Основным достоинством этого метода является отсутствие необходимости нормализации данных ПЦР, что в случае анализа микроРНК существенно усложняет интерпретацию данных [18]. Так,

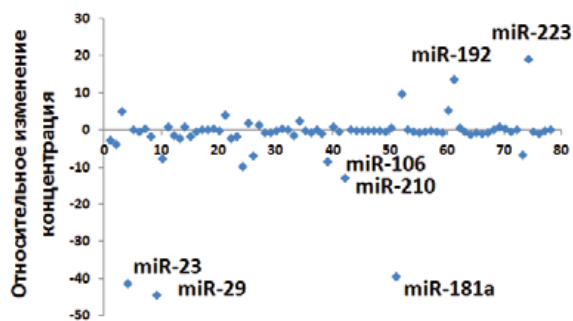


Рисунок 3. Сравнение данных по экспрессии 84 микроРНК в образце пациента N до и после операции. По оси X расположены тестируемые молекулы микроРНК, по оси Y – изменение концентрации молекул

используя разработанный ранее алгоритм, было подобрано несколько «реципрокных микроРНК пар» и проведена оценка диагностической ценности каждой такой пары с помощью ROC-анализа. Для этого был использован клинический материал независимой выборки пациентов с диагнозом КРР (n=20) и здоровых доноров (n=10). Оптимальные результаты были получены для пары miR-223/miR-181a (Рис. 5): AUC=0,96; чувствительность =0,93; специфичность =0,88 (при значении Cutoff =1,53).

ОБСУЖДЕНИЕ

Первое исследование, показавшее диагностический потенциал экзосомальных микроРНК при

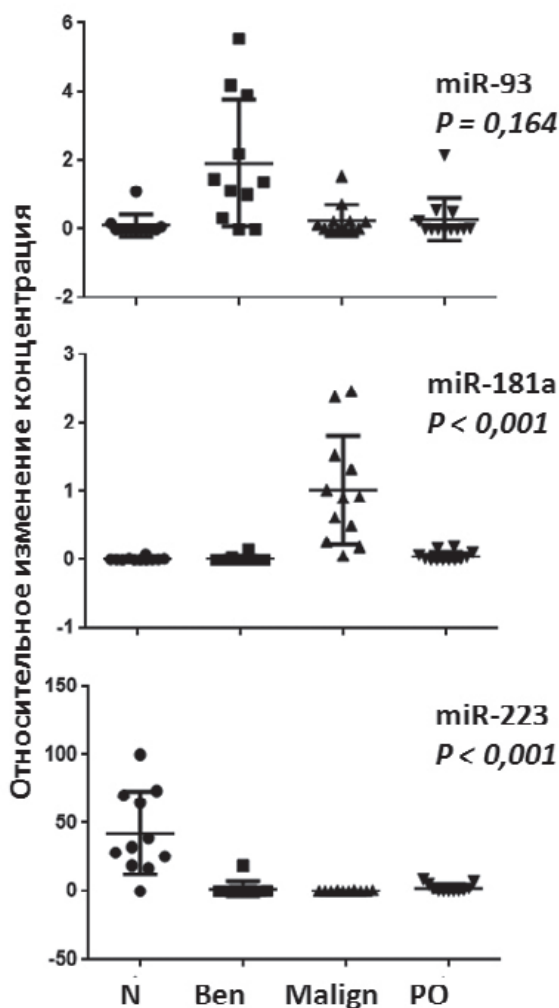


Рисунок 4. Анализ экспрессии miR-93, miR-181a и miR-223 на независимых группах. N – здоровые доноры, Ben – пациенты с доброкачественными новообразованиями кишечника, Malign – пациенты с диагнозом КРР (аденокарцинома), PO – пациенты с КРР после радикальной операции

КРР, было опубликовано японской группой в 2014 году [19]. Авторы этой работы описали несколько молекул микроРНК, концентрация которых отличалась пациентов с КРР от здоровых доноров, и пациентов до и после хирургического лечения. За следующие три года в печати появилось еще несколько аналогичных исследований [20-22], в которых были показаны диагностические/предиктивные значения определенных микроРНК, полученные при сравнении групп пациентов/доноров. Эти работы доказывали возможность использования экзосомальных микроРНК в качестве «маркеров» КРР, но возможности практического применения и клинической интерпретации этих данных были оставлены за рамками исследований. В нашем исследовании предложен алгоритм анализа данных ПЦР, который позволяет с высокой достоверностью дифференцировать пациентов с КРР от других клинических групп. Оптимизация этого алгоритма и расширение панели «реципрокных микроРНК пар» могут повысить диагностическую ценность предложенного метода.

В данном исследовании был проведен анализ общего пула циркулирующих экзосом. Эта смесь микровезикул гетерогенна по клеточному происхождению и по составу микроРНК. Интересные данные были получены недавно Tawagi M. и соавт. [23]: с помощью стехиометрического анализа было показано, что специфические молекулы микроРНК распределены в циркулирующих экзосомах крайне «неравномерно». Пока не ясны причины такой

«неравномерности», но этот феномен, безусловно, влияет на результаты анализа экзосомальных микроРНК и осложняет их клиническую интерпретацию. Одна из возможных причин – разнообразие клеточного происхождения экзосом, что указывает на необходимость (попыток) выделения везикул, секретируемых клетками КРР или, как минимум, клетками кишечного эпителия, что, вероятно, возможно [24]. Сочетание двух технологий: выделения КРР-специфической фракции экзосом и анализа панели «реципрокных микроРНК пар» представляется наиболее перспективным направлением работы по созданию нового эффективного метода диагностики / скрининга КРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Профиль экзосомальных микроРНК имеет характерные и детектируемые изменения при КРР.
- Оптимальным методом интерпретации данных ПЦР-анализа экзосомальных микроРНК представляется алгоритм «реципрокных микроРНК пар».
- Оценка соотношения концентраций экзосомальных miR-223 и miR-181a представляется перспективным методом диагностики КРР.
- Дальнейшие исследования, направленные на разработку метода выделения КРР-специфических экзосом и поиска дополнительных «реципрокных микроРНК пар», необходимы для создания эффективного метода диагностики КРР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. / А.Д.Каприн, В.В.Старинский, Г.В.Петрова // МНИОИ им. П.А.Герцена, Москва. – 2017.
2. Соколова, Е.А. Биомаркеры для своевременной диагностики колоректального рака. / Е.А.Соколова, У.А.Боярских, А.Н.Ширшова и соавт.// Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 60 (12). – с. 15-23.
3. Hauptman, N. Colorectal Cancer Blood-Based Biomarkers. / N.Hauptman, D.Glavac // Gastroenterology research and practice. – 2017. – p. 2195361.
4. Warren, J.D. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. / J.D.Warren, W.Xiong, A.M.Bunker et al. // BMC medicine. – 2011. – № 9. – p. 133.
5. Herbst, A. Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal

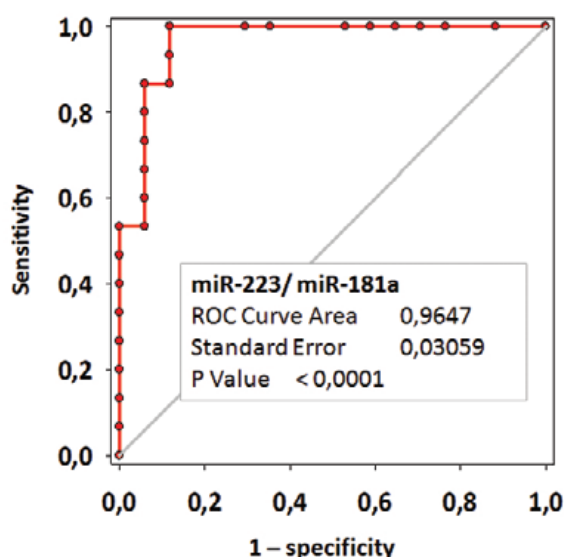


Рисунок 5. Оценка диагностической ценности «реципрокной микроРНК пары» – miR-223/miR-181a с помощью ROC-анализа. AUC=0,96; чувствительность =0,93; специфичность =0,88 (при значении Cutoff=1,53)

- cancer. / A.Herbst, K.Rahmig, P.Stieber et al. // The American journal of gastroenterology. – 2011. – № 106 (6). – p. 1110-1118.
6. Suzuki, H. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. / H.Suzuki, E.Yamamoto, R.Maruyama et al. // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – № 455 (1-2). – p. 35-42.
7. Tan, S.H. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. / S.H.Tan, H.Ida, Q.C.Lau et al. // Oncology reports. – 2007. – № 18 (5). – p. 1225-1230.
8. Marshall, K.W. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. / K.W.Marshall, S.Mohr, F.E.Khettabi et al. // International journal of cancer. – 2010. – № 126 (5). – p. 1177-1186.
9. Yip, K.T. A case-controlled validation study of a blood-based seven-gene biomarker panel for colorectal cancer in Malaysia. / K.T.Yip, P.K.Das, D.Suria et al. // Journal of experimental & clinical cancer research. – 2010. – CR 29. – p. 128.
10. Giraldez, M.D. Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study. / M.D.Giraldez, J.J.Lozano, G.Ramirez et al. // Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. – 2013. – № 11 (6). – p. 681-688 e683.
11. Yong, F.L. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer. / Yong F.L., Law C.W., Wang C.W. // BMC cancer. – 2013. – № 13. – p. 280.
12. Colombo, M. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. / M.Colombo, G.Raposo, C.They // Annual review of cell and developmental biology. – 2014. – № 30. – p. 255-289.
13. Pap, E. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. / E.Pap, E.Pallinger, M.Pasztoi et al. // Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society. – 2009. – № 58 (1). – p. 1-8.
14. Whiteside, T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. / T.L.Whiteside // Expert review of molecular diagnostics. – 2015. – № 15 (10). – p. 1293-1310.
15. Lotvall, J. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. / J.Lotvall, A.F.Hill, F.Hochberg et al. // Journal of extracellular vesicles. – 2014. – № 3. – p. 26913.
16. Samsonov, R. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. / R.Samsonov, V.Burdakov, T.Shtam et al. // Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2016. – № 37 (9). – p. 12011-12021.
17. Архангельская, П.А. Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки. / П.А.Архангельская, Р.Б.Самсонов, Т.А.Штам и соавт. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2017. – № 13 (13). – p. 63-72.
18. Latham, G.J. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. / G.J.Latham // Methods in molecular biology. – 2010. – № 667. – p. 19-31.
19. Ogata-Kawata, H. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. / H.Ogata-Kawata, M.Izumiya, D.Kurioka et al. // PloS one. – 2014. – № 9 (4). – e92921.
20. Hosseini, M. Exosome-Encapsulated microRNAs as Potential Circulating Biomarkers in Colon Cancer. / M.Hosseini, S.Khatamianfar, S.M.Hassanian et al. // Current pharmaceutical design. – 2017. – № 23 (11). – p. 1705-1709.
21. Wang, J. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. / J.Wang, F.Yan, Q.Zhao et al. // Scientific reports. – 2017. – № 7 (1). – p. 4150.
22. Yan, S. Downregulation of circulating exosomal miR-638 predicts poor prognosis in colon cancer patients. / S.Yan, G.Dang, X.Zhang et al. // Oncotarget. – 2017. – № 8 (42). – p. 72220-72226.
23. Chevillet, J.R. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. / J.R.Chevillet, Q.Kang, I.K.Ruf et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – № 111 (41). – p. 14888-14893.
24. Yoshioka, Y. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. / Y.Yoshioka, N.Kosaka, Y.Konishi et al. // Nature communications. – 2014. – № 5. – p. 3591.