

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПИЩЕВОДА

Кит О.И., Водолажский Д.И., Базаев А.Л., Златник Е.Ю., Колесников Е.Н., Трифанов В.С., Харин Л.В., Кутилин Д.С.

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: onko-sekretar@mail.ru*

В мире ежегодно регистрируется более 450 тысяч новых случаев рака пищевода. Плоскоклеточный рак пищевода составляет порядка 80 % от всех случаев заболевания. В данном обзоре проведен анализ современной литературы, отражающей молекулярные изменения в тканях при плоскоклеточном раке пищевода. В работе рассмотрено предиктивное (SPRR3) и прогностическое (MIB1, NF-κB, HER2 и ER) значение некоторых молекулярных маркеров рака пищевода. Описаны эпигенетические изменения, принимающие участие в опухолевой прогрессии: гиперметилирование BSL3, гипометилирование LINE1, гипометилирование Alu-повторов. Представлены современные данные по изучению влияния микро РНК на развитие плоскоклеточного рака пищевода. Описана панель молекулярных маркеров, экспрессия которых служит предиктором эффективности неoadъювантного химио-лучевого лечения и роль экспрессии провоспалительного интерлейкина – 6 в развитии резистентности плоскоклеточного рака пищевода к препаратам платины.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак пищевода, метилирование, микро РНК, TP53, IL-6, резистентность к химиотерапии.

## MOLECULAR MARKERS OF ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Bazaev A.L., Zlatnik E.Y., Kolesnikov E.N., Trifanov V.S., Kharin L.V., Kutilin D.S.

*Federal State Institution "Rostov Research Institute of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: onko-sekretar@mail.ru*

In the world, more than 450,000 new cases of esophageal cancer are annually recorded, with squamous cell carcinoma of the esophagus accounting for about 80 % of all cases of the disease. This review analyzes modern literature reflecting molecular changes in tissues in squamous cell carcinoma of the esophagus. The paper considers the predictive (SPRR3) and prognostic (MIB1, NF-κB, HER2 and ER) values of some molecular markers of esophageal cancer. Epigenetic changes taking part in the tumor progression - hypermethylation of BSL3, hypomethylation of LINE1, hypomethylation of Alu repeats are described. Present-day data on the effect of micro RNA on the development of squamous cell carcinoma of the esophagus are presented. A panel of molecular markers whose expression serves as a predictor of the effectiveness of neoadjuvant chemoradiotherapy and the role of the expression of pro-inflammatory interleukin-6 in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus against platinum drugs is described.

Keywords: squamous cell carcinoma of the esophagus, methylation, micro RNA, TP53, IL-6, resistance to chemotherapy.

Рак пищевода (РП) занимает 6 место в структуре онкологической смертности во всем мире. В мире ежегодно регистрируется более 450 тысяч новых случаев рака пищевода и 400 тысяч смертей от этого заболевания [1]. Традиционно выделяют два основных патогистологических типа РП: плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) и аденокарциному пищевода (АР), которые существенно отличаются по этиологии и географическому распространению, при этом ПРП составляет приблизительно 80 % от всех случаев заболевания [2, 3]. 5-летняя общая выживаемость при ПРП резко падает, если опухоль не диагностирована на ранних стадиях [4]. Плоскоклеточная дисплазия эпителия – признанное предраковое поражение, как правило, не выявляется при простой эндоскопии. После

внедрения хромоэндоскопии с раствором Люголя (проба Шиллера) стало возможным обнаружение неокрашенных диспластических участков эпителия [5]. Хромоэндоскопия – дорогостоящий метод, а наличие Люголь-негативного окрашивания воспаленной слизистой оболочки вдоль пищевода компрометирует чувствительность и специфичность, что затрудняет использование методики при скрининге. Поэтому актуальная задача улучшения качества лечения пациентов – поиск предиктивных чувствительных и специфичных маркеров малигнизации тканей пищевода для своевременного проведения лечебных мероприятий.

Теория развития ПРП основана на модели, используемой для других злокачественных заболеваний, описывающей различные стадии прогрессирования опухолевого процесса. После длительного воздействия этиологических факторов происходит неопластическая трансформация эпителиальных клеток слизистой пищевода, которая редко обнаруживается на ранних стадиях. Хирургическое вмешательство является основным методом лечения. Однако у большинства пациентов опухоль выявляется на поздних стадиях, когда, как правило, применяется неоадьювантная химиолучевая терапия с последующим оперативным вмешательством. К сожалению, большинство из них не имеют шансов на долгосрочное выживание. Вмешательство в естественное течение ПРП в качестве первичной профилактики происходит посредством отказа от вредных привычек или снижения интенсивности воздействия основных таких этиологических факторов, как курение и употребление алкоголя; вторичная профилактика может осуществляться в рамках программ скрининга. Далее следуют ранняя диагностика и радикальное хирургическое лечение и, наконец, лечебные мероприятия, обеспечивающие паллиативную помощь хорошего качества [6]. В данном обзоре представлены данные о молекулярных особенностях ПРП и его маркерах, определяющих тактику лечения на разных этапах развития заболевания.

**Этиология и патогенез.** Этиология и патогенез плоскоклеточной карциномы весьма сложны, так как связаны с многоступенчатым воздействием разных факторов на разнородные группы населения, что отражается в поразительной разнице показателей заболеваемости, наблюдаемой в мире [2]. Регион, известный как «Среднеазиатский пояс рака пищевода», простирающийся от Каспийского моря до центральной части Китая, вместе с Южной и Восточной Африкой и частью Южной Америки характеризуется высоким риском развития заболевания, где показатели заболеваемости достигают до 150 человек на 100000 населения [2, 3]. В странах Азии и Африки не обнаружено различий в показателях заболеваемости и влияющих на это этиологических факторов, у мужчин и женщин [7, 8]. Привычка пить очень горячие напитки, пища, содержащая нитросоединения и микотоксины, недостаток антиоксидантов и потребление опиума – вот некоторые из этиологических

факторов [9,10]. В Западных странах, где показатели заболеваемости значительно ниже, злоупотребление алкоголем и курение являются основными факторами риска ПРП, увеличивающими заболеваемость мужчин в 5 раз по сравнению с женщинами, что отражает преобладание вредных привычек среди мужчин [8,10].

**Генетические и эпигенетические изменения при ПРП.** Эпидемиологические исследования демонстрируют связь между воздействием канцерогена и раком в человеческой популяции. Специфические канцерогены окружающей среды влияют на спектр генетических, геномных и эпигенетических изменений. Мутации гена опухолевого супрессора *TP53* (*p53*) являются наиболее частыми генетическими изменениями при ПРП, присутствие которых обнаруживается примерно в 45 % опухолей [11] на ранней стадии опухолевой прогрессии и в окружающей здоровой эпителиальной ткани пищевода [12]. Около половины всех раковых опухолей человека содержат соматические мутации гена *TP53*, и уже описано более 15000 мутаций, приводящих к потере функциональной активности данного гена [13]. Анализ спектра мутаций *TP53* полезен в понимании происхождения мутаций и может помочь выявить этиологические факторы, участвующие в возникновении ПРП. Исследования показывают, что распространенность мутаций *TP53* при ПРП варьирует от 35 % до 89 %, в зависимости от географического региона. В Юго-Восточной Бразилии и Юго-Восточной Франции – двух областях со средней заболеваемостью *TP53*-мутации наблюдались с частотой около 34 %, и мутационный профиль показал высокий процент изменений в паре оснований А:Т [14]. Считается, что данная разновидность мутации возникает под действием ацетальдегида, первого продукта метаболизма этанола [15], что отражает важную роль алкоголя как фактора риска ПРП. Частота мутаций *TP53* неизменно увеличивается в областях с высокой заболеваемостью, превысив 80 % в Нормандии (Франция) [16], 70 % в Китае [17] и 65 % в Северном Иране [18,19]. Структура мутаций является достаточно сложной и неоднородной, что предполагает многообразие видов и механизмов воздействия, участвующих в инициации и прогрессировании ПРП в районах с высокой заболеваемостью. Отличительной особенностью профиля мутаций *TP53*, характерных для ПРП, в географических областях с высокой заболеваемостью, является большая доля изменений CpG-островков. Исследования, проведенные в Иране и Бразилии, показали весьма значительный уровень – 33 % и 18 %, соответственно, G→A замен на CpG участках среди всех мутаций, выявленных в гене *TP53* [18,19]. Замены в CpG сайтах могут быть следствием спонтанного дезаминирования 5-метилцитозина с образованием тимина, а также могут вызываться высоким уровнем оксида азота при хроническом воспалительном процессе [20], который часто присутствует при опухолевом росте [21]. Термическое повреждение хронически раздражает слизистую

оболочку пищевода, вызывая воспалительный процесс, и снижает барьерную функцию эпителия к воздействию канцерогенов [22].

В исследовании Sitas F. и соавт. [23] сделано предположение, что инфекция вирусом папилломы человека (ВПЧ) играет этиологическую роль в развитии ПРП. Однако анализ, проведенный на большом количестве пациентов с применением методик, включающих использование таких маркеров, как мутации гена *TP53* и гиперэкспрессия SKI2A (p16), показали, что ВПЧ играет незначительную роль в развитии ПРП [24,25]. Кроме того, в отличие от рака ротоглотки [26], пациенты с ВПЧ положительными плоскоклеточными карциномами пищевода не имеют лучшего прогноза по сравнению с больными с ВПЧ отрицательными опухолями [27].

Обнаружены предиктивные молекулярные маркеры развития ПРП, например SPRP3 (SmallProline-RichProtein 3). Экспрессия SPRP3 индуцируется в процессе дифференцировки эпидермальных кератиноцитов и рассматривается как маркер дифференциации плоскоклеточного эпителия [28,29]. Данное явление особенно ярко выражено в эпителии ротовой полости и пищевода, а изменения в уровне экспрессии мРНК или белка SPRP3, первоначально наблюдаемые в окружающей слизистой оболочке, представляют собой ранние молекулярные события, относящиеся к злокачественной трансформации [30,31].

Кроме генетических aberrаций, эпигенетические изменения также вносят важный вклад в развитие ПРП. Эпигенетические изменения происходят на ранних стадиях процесса прогрессирования опухоли, и, следовательно, рассматриваются в качестве потенциальных предиктивных диагностических биомаркеров для ПРП. Несколько исследований сосредоточились на роли изменений паттернов метилирования промоторов определенных генов, участвующих в развитии ПРП. Показано, что промотор гена, кодирующего LMP7 (lowmolecular-massprotein 7), гиперметилирован в опухолевой ткани по сравнению с близлежащими нормальными тканями. Отмечено, что паттерны метилирования гена *BCL3*, способного к активации транскрипции путем ассоциации с NF-kB, и протектора слизистой оболочки TFF1 (trefoilfactor1), нарушаются при плоскоклеточной карциноме и в окружающих здоровых тканях [32]. Еще одна важная эпигенетическая особенность ПРП – распространенное гипометилирование повторов в геноме. Различные исследования продемонстрировали гипометилирование LINE1 (long interspersed nucleotide element 1) при ПРП [32,33]. Хотя профиль метилирования не коррелировал со стадией заболевания [33], S. Iwagami с коллегами [34] показали, что существует корреляция с прогнозом заболевания. Кроме LINE1, при плоскоклеточной карциноме было исследовано состояние статуса метилирования Alu-повторов [35]. В данном исследовании выявлены более низкие уровни метилирования не только в опухолях, но и нормальных образцах эпителия, в сравнении со

слизистой оболочкой пищевода у здоровых людей. Полученные результаты позволяют предположить, что гипометилирование Alu-повторов является ранним изменением эпителия пищевода в процессе канцерогенеза.

Нарушение регуляции экспрессии микроРНК, вероятно, происходит на каждом этапе развития ПРП. М. Yang и соавт. [36] показали, что уровни микроРНК-338-3р, микроРНК -218 и микроРНК-139-5р при развитии ПРП снижены по сравнению с прилегающими неопухолевыми тканями, в то время как уровни микроРНК-183, микроРНК-574-5р, микроРНК-21 и микроРНК-601 были повышены. Множественный регрессионный анализ показал, что aberrантная экспрессия микроРНК-338-3р, микроРНК -139-5р, микроРНК -574-5р и микроРНК-601 повышают риск развития РП. Доказано, что определенные дифференциально экспрессирующиеся микро РНК могут быть связаны с заболеваемостью и развитием ПРП. Различные микроРНК, такие как микроРНК-375, микроРНК-192, микроРНК-21, микроРНК-181b, микроРНК-146b и микроРНК-150, в частности, способны предсказывать прогноз при ПРП [37,38]. Данный факт представляет особый интерес, поскольку микроРНК могут быть обнаружены в сыворотке, так как они секретируются в экзосомы и представляют собой не инвазивный способ прогнозирования течения ПРП. Y. Tanaka и соавт. [39] исследовали экзосомальные уровни микро-РНК-21 у больных ПРП и обнаружили, что её экспрессия значительно выше в группе больных раком, чем у больных с доброкачественными заболеваниями с наличием либо без системного воспалительного ответа – СРБ <0,3 мг/дл. Кроме того, микро-РНК-21 не обнаружена в сыворотке, оставшейся после экстракции экзосом, а экзосомальная экспрессия микроРНК-21 коррелирует с запущенными стадиями опухоли, метастазированием в лимфатические узлы, наличием метастазов с воспалением или без воспаления (СРБ <0,3 мг/дл). Это один из первых шагов в направлении использования эпигенетических маркеров в диагностике РП и определении прогноза. Параллельно с диагностикой прилагаются усилия для улучшения результатов лечения ПРП.

**Влияние молекулярных особенностей ПРП на тактику лечения.** Тактика лечения ПРП определяется распространенностью первичной опухоли и вовлеченностью в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов [40]. Прогноз у больных с РП остается малоудовлетворительным, даже после радикальной операции. Плохие результаты хирургического лечения объясняются ранним системным распространением РП из-за морфологических особенностей, строения и локализации пищевода, обладающего богатой системой лимфатического дренажа в подслизистом слое, допускающей обширное микрометастазирование на ранних стадиях развития опухоли [41].

Таким образом, ввиду низкой эффективности хирургического лечения изучаются адьювантная и неадьювантная химиолучевая терапия в качестве компонентов мультимодальной стратегии эрадикации опухоли. В настоящее время принятым стандартом медицинской помощи при распространенном РП является неадьювантная химиолучевая терапия с последующим хирургическим вмешательством, хотя данный подход остается спорным [42]. Совсем недавно исследования показали значительное увеличение общей выживаемости у пациентов с ПРП после химиолучевой терапии спаклитакселом и цисплатином [43] или карбоплатином [44].

Несколько молекулярных маркеров в определенной степени способны прогнозировать ответ ПРП на лечение, наиболее значимым из которых является статус гена *TP53*. Н. Okumura и соавт. [45] показали, что в большинстве случаев, когда обнаружено отрицательное иммуногистохимическое окрашивание на p53, можно предсказать ответ на неадьювантную химиолучевую терапию. Кроме того, мета-анализ 28 исследований показал, что дикий тип *TP53*, низкий уровень экспрессии белка p53 или его отсутствие, связан с хорошим ответом на химиотерапию РП [30]. Оба исследования однозначно показали актуальность изучения *TP53* статуса для прогнозирования ответа на лечение ПРП, хотя в настоящее время маркер не используется в клинической практике.

В стремлении выявить более широкую панель биомаркеров-предикторов эффективности лечения ПРП, был оценен уровень экспрессии 16 белков, в том числе, P53, при проведении одновременной химиолучевой терапии [40]. Авторы показали, что высокие уровни MIB1 (mindbombE3 ubiquitinproteinligase1), низкие уровни NF-κB, HER2 и ER являются хорошими прогностическими факторами для завершающей химиолучевой терапии ПРП.

Помимо генетических маркеров, эпигенетические изменения также способны предсказать ответ на лечение. K. Sugimura и соавт. [46] провели оценку профиля экспрессии микроРНК из 365 резистентных к цисплатину клонов клеток и нашли паттерн из 15 микроРНК, которые могут быть вовлечены в развитие резистентности. Данный паттерн оценивался в биоптатах опухолевой ткани 98 нелеченых больных РП, которые затем получали предоперационную химиотерапию. Интересно, что низкая экспрессия *let-7b* и *let-7c* в биоптатах от 74 пациентов коррелировала с плохим ответом на химиотерапию, как клиническим, так и патогистологическим. Данное соотношение было подтверждено у остальных 24 больных тестовой группы. Авторы также показали, что резистентность к цисплатину опосредована, по крайней мере, частично, цитокином IL-6 (интерлейкин 6), который продуцируют клетки плоскоклеточной карциномы после воздействия цисплатина; IL-6 активировал JAK/STAT3 сигнальный путь по принципу аутокринной регуляции. В этом

контексте, трансфекция *let-7* индуцировала восстановление чувствительности к препарату и интенсификацию апоптоза, непосредственно подавляемого цисплатин-активированным IL6/STAT3 сигнальным путем [44].

В подобном контексте, М. F.Chen и соавт. [47] оценивали потенциальную возможность использования IL-6 в качестве биомаркера ответа на лечение ПРП. Среди изученных 173 образцов ткани РП 51 % оказался IL-6 иммунопозитивными, и была выявлена положительная корреляция между гиперэкспрессией IL-6 и опухолями, имеющими локорегионарные или отдаленные метастазы. Кроме того, экспрессия IL-6 была связана со значительно более слабым ответом на лечение. Авторы также показали, что IL-6 значительно подавлял чувствительность клеток плоскоклеточной карциномы пищевода к облучению *in vitro*. Наконец, уровень IL-6 в сыворотке крови был достоверно повышен у больных с регионарными и отдаленными метастазами по сравнению с теми пациентами, у которых они не выявлялись [47]. Все представленные данные свидетельствуют о важной роли IL-6 в образовании и прогрессировании ПРП. Таким образом, раскрывается потенциал IL-6 не только как предиктора ответа на лечение, но и в качестве новой терапевтической мишени. Поиск новых мишеней для терапии ПРП остается приоритетным, потому что, несмотря на все последние достижения в идентификации биомаркеров ответа на лечение, группа больных, не ответивших на традиционную терапию, не имеет никакого альтернативного варианта лечения.

Возможной мишенью для лечения ПРП может стать гиперэкспрессированный EGFR, который по данным ряда авторов [48] обнаруживается в 90 % случаев и, следовательно, эти пациенты могут быть кандидатами для эффективной EGFR-таргетной терапии. Напротив, в другом исследовании показано, что гиперэкспрессия EGFR и HER2 – не являются распространенными событиями при ПРП, как и активирующие мутации *EGFR*, *KRAS* и *BRAF* [49]. Поэтому большинство больных ПРП не имеют молекулярного профиля, подходящего для анти-HER таргетной терапии, ввиду чего необходимо изучать другие маркеры. Подобного рода «разночтения» могут быть объяснены тем, что исследования проводились на различных популяциях пациентов, и поэтому данный аспект требует дополнительных исследований.

Проходит клинические испытания на различных злокачественных опухолях новый класс лекарственных средств -эпигенетических препаратов, который пока включает: ингибитор ДНК метил-трансферазы- DNMTi (inhibitor of DNAmethyl-transferases) и ингибитор гистоновой деацетилазы-HDACi (inhibitor of histonedeacetylases) [50]. Эпигенетический сайленсинг генов опухолевых супрессоров является распространенным событием при различных злокачественных опухолях. Если эпигенетические изменения,

такие как гиперметилование ДНК или модификации гистонов, обратимы, то, обращая вспять такие состояния, возможно, удастся восстановить нормальный профиль экспрессии генов. Хотя сказанное может восприниматься как далекое будущее, больные миелодиспластическим синдромом уже получают пользу от назначения новых препаратов, и в ближайшее время эти новые направления лечения станут реальными для пациентов с онкологическими заболеваниями, в том числе с ПРП.

**Заключение.** Многие из представленных в обзоре маркеров должны быть валидизированы в конкретных клинических исследованиях, прежде чем они могут быть включены в повседневную клиническую практику. Однако в наметившемся потенциале воздействия на естественное течение ПРП, включение молекулярных маркеров в клиническую практику открывает широкие горизонты для улучшения исходов заболевания у больных плоскоклеточной карциномой пищевода.

### Список литературы

1. World Cancer Report. World Health Organization. 2014. P.528-543.
2. Ferlay J., Shin H. R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010, Vol. 127. P. 2893-2917.
3. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011, Vol. 61. P.69-90.
4. Chen S.B., Weng H.R., Wang G., Yang J.S., Yang W.P., Liu D. T., Chen Y.P., Zhang H. Prognostic factors and outcome for patients with esophageal squamous cell carcinoma underwent surgical resection alone: evaluation of the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer staging system for esophageal squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2013; 8:495–501.
5. Fukuhara T., Hiyama T., Tanaka S., Oka S., Yoshihara M., Arihiro K., Chayama K. Characteristics of esophageal squamous cell carcinomas and lugol-voiding lesions in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Gastroenterol.* 2010. Vol. 44. P.27-33.
6. Gordis L. *Epidemiology.* 4th edn. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. P. 400.
7. Nasrollahzadeh D., Kamangar F., Aghcheli K., Sotoudeh M., Islami F., Abnet C. C., Shakeri R., Pourshams A., Marjani H. A., Nourai M. et al. Opium, tobacco, and alcohol use in relation to oesophageal squamous cell carcinoma in a high-risk area of Iran. *Br. J. Cancer.* 2008; Vol. 98. P.1857-1863.

8. Tran G.D., Sun X.D., Abnet C.C., Fan J.H., Dawsey S.M., Dong Z.W., Mark S.D., Qiao Y. L., Taylor P.R. Prospective study of risk factors for esophageal and gastric cancers in the Linxian general population trial cohort in China. *Int. J. Cancer*. 2005; Vol.113. P.456-463.
9. Islami F., Boffetta P., Ren J. S., Pedoeim L., Khatib D., Kamangar F. High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk-a systematic review. *Int. J. Cancer*. 2009; V.125. P.491-524.
10. Chen Y., Tong Y., Yang C., Gan Y., Sun H., Bi H., Cao S., Yin X., Lu Z. Consumption of hot beverages and foods and the risk of esophageal cancer: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer*. 2015; V.15. P.449.
11. Olivier M., Eeles R., Hollstein M., Khan M.A., Harris C.C., Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum. Mutat*. 2002; V.19. P.607-614.
12. Makino T., Yamasaki M., Miyata H., Yoshioka S., Takiguchi S., Fujiwara Y., Nakajima K., Nishida T., Mori M., Doki Y. p53 Mutation status predicts pathological response to chemoradiotherapy in locally advanced esophageal cancer. *Ann SurgOncol*. 2010; V.17(3). P.804-811.
13. Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S.V., Hainaut P., Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat*. 2007; V.28. P.622-629.
14. Rossini A., de Almeida Simão T., Marques C.B., Soares-Lima S.C., Herbster S., Rapozo D. C., Andreollo N.A. et al. TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil. *Mutat. Res*. 2010; V.696. P.10-15.
15. Noori P., Hou S.M. Mutational spectrum induced by acetaldehyde in the HPRT gene of human T lymphocytes resembles that in the p53 gene of esophageal cancers. *Carcinogenesis*. 2001; V.22. P.1825-1830.
16. Breton J., Sichel F., Abbas A., Marnay J., Arsène D., Lechevrel M. Simultaneous use of DGGE and DHPLC to screen TP53 mutations in cancers of the esophagus and cardia from a European high incidence area (Lower Normandy, France) *Mutagenesis*. 2003; V.18. P. 299-306.
17. Cao W., Chen X., Dai H., Wang H., Shen B., Chu D., McAfee T., Zhang Z.F. Mutational spectra of p53 in geographically localized esophageal squamous cell carcinoma groups in China. *Cancer*. 2004; V.101. P.834-844.
18. Biramijamal F., Allameh A., Mirbod P., Groene H. J., Koomagi R., Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res*. 2001; V.61. P.3119-3123.

19. Sepanlou S.G1., Etemadi A., Kamangar F., Sepehr A., Pourshams A., Poustchi H., Islami F., Sadjadi A. et al. The gastro-esophageal malignancies in Northern Iran research project: impact on the health research and health care systems in Iran. *Arch Iran Med.* 2013; V.16(1). P.46-53.
20. Souici A.C., Mirkovitch J., Hausel P., Keefer L.K., Felley-Bosco E. Transition mutation in codon 248 of the p53 tumor suppressor gene induced by reactive oxygen species and a nitric oxide-releasing compound. *Carcinogenesis.* 2000; V.21. P.281-287.
21. Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; V.3. P.276-285.
22. Lambert R., Hainaut P., Parkin D.M. Premalignant lesions of the esophagogastric mucosa. *Semin. Oncol.* 2004; V.31. P.498-512.
23. Sitas F., Egger S., Urban M.I., et al. InterSCOPE Study: Associations Between Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus Serological Markers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* 2012; V.104(2). P.147-158.
24. Koshiol J., Kreimer A.R. Lessons from Australia: human papillomavirus is not a major risk factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010; V.19. P.1889-1892.
25. Herbst S., Ferraro C.T., Koff N.K., Rossini A., Krueel C.D., Andreollo N.A., Rapozo D.C. et al. HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. *Cancer Lett.* 2012; V.326. P.52-58.
26. D'Souza G., Kreimer A. R., Viscidi R., Pawlita M., Fakhry C., Koch W.M., Westra W.H., Gilliso M.L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007; V.356. P.1944-1956.
27. Antonsson A., Nancarrow D.J., Brown I.S., Green A.C., Drew P.A., Watson D.I., Hayward N.K., Whiteman D.C. Australian cancer study. High-risk human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010; V.19. P. 2080-2087.
28. Liu Q., Zhang C., Ma G., Zhang Q. Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma multiforme. *Oncol. Lett.* 2014. V. 7(2). P.427-432.
29. Zhang S.S., Huang Q.Y., Yang H., Xie X., Luo K. J., Wen J., Cai X. L., Yang F., Hu Y., Fu J.H. Correlation of p53 status with the response to chemotherapy-based treatment in esophageal cancer: a meta-analysis. *Ann. Surg. Oncol.* 2013; V.20. P.2419-2427.
30. Zhang Y., Feng Y. B., Shen X. M., Chen B.S., Du X.L., Luo M.L., Cai Y., Han Y.L., Xu X., Zhan Q.M., et al. Exogenous expression of esophagin/SPRR3 attenuates the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma cells via promoting apoptosis. *Int. J. Cancer.* 2008; V.122. P.260-266.

31. Simão T.A., Souza-Santos P.T., de Oliveira D.S., Bernardo V., Lima S.C., Rapozo D.C., Kruehl C.D., Faria P.A., Ribeiro Pinto L.F., Albano R.M. Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR and its potential use as a biomarker. *Exp. Mol. Pathol.* 2011; V.91. P.584-589.
32. Lima S.C., Hernández-Vargas H., Simão T., Durand G., Kruehl C.D., Le Calvez-Kelm F., Ribeiro Pinto L.F., Hecceg Z. Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. *Epigenetics.* 2011; V.6. P.1217-1227.
33. Iwagami S., Baba Y., Watanabe M., Shigaki H., Miyake K., Ida S., Nagai Y., Ishimoto T., Iwatsuki M., Sakamoto Y., et al. Pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2012; V.19. P.2726-2732.
34. Iwagami S., Baba Y., Watanabe M., Shigaki H., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M., Sakamaki K., Ohashi Y., Baba H. LINE-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg.* 2013; V.257. P.449-455.
35. Matsuda Y., Yamashita S., Lee Y. C., Niwa T., Yoshida T., Gyobu K., Igaki H., Kushima R., Lee S., Wu M. S., et al. Hypomethylation of Alu repetitive elements in esophageal mucosa, and its potential contribution to the epigenetic field for cancerization. *Cancer Causes Control.* 2012; V.23. P.865-873.
36. Yang M., Liu R., Sheng J., Liao J., Wang Y., Pan E., Guo W., Pu Y., Yin L. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2013; V.29. P.169-176.
37. Li J., Li X., Li Y., Yang H., Wang L., Qin Y., Liu H., Fu L., Guan X.Y. Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization. *PLoS ONE.* 2013; V.8:e53582.
38. Zhao Y., Schetter A.J., Yang G.B., Nguyen G. et al. microRNA and inflammatory gene expression as prognostic marker for overall survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2013; V.132. P.2901-2909.
39. Tanaka Y., Kamohara H., Kinoshita K., Kurashige J., Ishimoto T., Iwatsuki M., Watanabe M., Baba H. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013; V.119. P.1159-1167.
40. Shibata-Kobayashi S., Yamashita H., Okuma K., Shiraishi K., Igaki H., Ohtomo K., Nakagawa K. Correlation among 16 biological factors [p53, p21(waf1), MIB-1 (Ki-67), p16(INK4A), cyclin D1, E-cadherin, Bcl-2, TNF-alpha, NF-kappaB, TGF-beta, MMP-7, COX-2,

- EGFR, HER2/neu, ER, and HIF-1alpha] and clinical outcomes following curative chemoradiation therapy in 10 patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* 2013; V.5. P.903-910.
41. Nishimaki T., Shimoji H., Sunagawa H. Recent changes and the future roles of esophageal cancer surgery. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; V.10. P.324-332.
  42. Shridhar R., Almhanna K., Meredith K. L., Biagioli M.C., Chuong M.D., Cruz A., Hoffe S. E. Radiation therapy and esophageal cancer. *Cancer Control.* 2013; V.20. P. 97-110.
  43. Lv J., Cao X.F., Zhu B., Tao L., Wang D.D. Long-term efficacy of perioperative chemoradiotherapy on esophageal squamous cell carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2010; V.16. P.1649-1654.
  44. Van Hagen P., Hulshof M.C., van Lanschot J.J., Steyerberg E.W., van Berge Henegouwen M.I. et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; V.366. P.2074-2084.
  45. Okumura H., Uchikado Y., Setoyama T., Matsumoto M., Owaki T., Ishigami S., Natsugoe S. Biomarkers for predicting the response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Surg. Today.* 2014; V.44(3). P.421-428.
  46. Sugimura K., Miyata H., Tanaka K., Hamano R., Takahashi T. et al. Let-7 expression is a significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2012; V.18. P.5144-5153.
  47. Chen M.F., Chen P.T., Lu M.S., Lin P.Y., Chen W.C., Lee K.D. IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mol. Cancer.* 2013; P.12:26.
  48. Dequanter D., Shahla M., Paulus P., Lothaire P.H. The role of EGFR-targeting strategies in the treatment of head and neck cancer. *Onco Targets Ther.* 2012; V.5. P.127-131.
  49. Gonzaga I.M., Soares-Lima S.C., de Santos P.T., Blanco T.C., de Reis B.S., Quintella D.C., de Oliveira I.M., de Faria P.A., Krueel C.D., Andreollo N.A. et al. Alterations in epidermal growth factor receptors 1 and 2 in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer.* 2012; V.12. P.569.
  50. Nebbioso A., Carafa V., Benedetti R., Altucci L. Trials with 'epigenetic' drugs: an update. *Mol. Oncol.* 2012; V.6. P.657-682.