

КОМПЛЕКСНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ: МАРКЕРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Кечерюкова М.М., Снежко А.В., Вереникина Е.В., Меньшенина А.П., Адамян М.Л., Арджа А.Ю., Кечерюкова Т.М.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: madina.kecheryukova@ya.ru

Во всем мире ежегодно регистрируют более полумиллиона новых случаев рака шейки матки (РШМ), при этом общая выживаемость обычно высока, однако наличие метастазов в лимфатических узлах в четыре раза снижает этот показатель. Поэтому в настоящее время весьма актуальной остается проблема точного и эффективного определения метастазов в лимфатических узлах при РШМ. Целью данного исследования стал анализ баз данных и литературы по РШМ с акцентом на выявление клинических и молекулярных ассоциаций, а также функционально измененных сигнальных путей, которые могут стимулировать онкогенез и метастазирование, а также служить прогностическими или терапевтическими маркерами. Оценка геномных и протеомных характеристик позволяет разделить РШМ на несколько подтипов, включающих плоскоклеточные опухоли с низкой и высокой экспрессией генов кератина и аденокарциномы. Во множестве исследований *ErbB3*, *Casp8*, *HLA-A*, *SHKBP1* и *TGFBR2* были идентифицированы как гены с наиболее сильно выраженными мутационными изменениями при первичном РШМ. Кроме того, идентифицированы амплификации в генах *CD274* и *PDCD1LG2*. Обнаружен ряд эндометриально-подобных раковых заболеваний шейки матки, характеризующихся мутациями в *KRAS*, *ARID1A* и *PTEN*. Важно отметить, что более 70% случаев РШМ проявляют геномные изменения в сигнальных путях *PI3K-MAPK* и *TGFβ*. Результаты исследований последнего десятилетия свидетельствуют, что показатель копийности генов *LAMP3*, *PROX1*, *PRKAA1* и *WNT2* является потенциальным предиктором метастазирования в лимфатические узлы, а сами гены – многообещающей терапевтической мишенью при РШМ. Представленные данные дают понимание о молекулярных подтипах РШМ и служат обоснованием необходимости разработки различных методов их лечения.

Ключевые слова: рак шейки матки, NGS, копийность генов, мутации, микроРНК, субклональные популяции опухолевых клеток, метастазы.

COMPLEX MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CERVICAL CANCER: METASTATIC MARKERS

Kecheryukova M.M., Snezhko A.V., Verenikina E.V., Menshenina A.P., Adamyan M.L., Arja A.Yu., Kecheryukova T.M.

National Medical Research Oncology Center, Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: madina.kecheryukova@ya.ru

More than 500000 new cases of cervical cancer (CC) are reported annually all over the world, while overall survival is usually high, however, metastases presence in lymph nodes reduces this figure by 4 times. Therefore, at present, problem of accurate and effective metastases determination in the lymph nodes in CC remains very urgent. The aim of this study was to analyze databases and literature on CC, with a focus on identifying clinical and molecular associations, as well as functionally altered signaling pathways that can stimulate oncogenesis and metastasis, and serve as prognostic or therapeutic markers. Evaluation of genomic and proteomic characteristics allows us to divide CC into several subtypes, including squamous tumors with low and high keratin genes expression and adenocarcinoma. In many studies, *ErbB3*, *Casp8*, *HLA-A*, *SHKBP1* and *TGFBR2* were identified as genes with the most pronounced mutational changes in primary CC. In addition, amplifications were identified in the genes *CD274* and *PDCD1LG2*. A number of endometrial-like cancers of the cervix uteri were found, characterized by mutations in *KRAS*, *ARID1A* and *PTEN*. It is important to note that more than 70% of CC cases show genomic changes in *PI3K-MAPK/TGFβ* signaling pathways. The results of studies indicate that the CNV of *LAMP3*, *PROX1*, *PRKAA1* and *WNT2* genes is a potential predictor of metastasis to the lymph nodes, and the genes themselves are a promising therapeutic target for CC. These data give an idea of CC molecular subtypes and substantiate the need for development of their treatment methods.

Keywords: cervical cancer, NGS, gene copy number variation, mutations, miRNAs, subclonal populations of tumor cell, metastases.

Во всем мире ежегодно регистрируют 528 000 новых случаев рака шейки матки и 266 000 смертей от него, что превышает показатели любой другой гинекологической патологии [1]. 95% случаев вызваны персистирующими инфекциями ВПЧ [2]. Хотя ранние стадии рака шейки матки можно лечить хирургическим методом или лучевой терапией, метастатический рак шейки матки неизлечим, и необходимы новые терапевтические подходы [3].

Хотя большинство инфекций ВПЧ исчезают в течение месяцев, некоторые сохраняются и экспрессируют вирусные онкогены, которые инактивируют p53 и RB, что приводит к повышенной нестабильности генома, накоплению соматических мутаций и в некоторых случаях – к интеграции ВПЧ в геном хозяина [4, 5]. Связь с риском развития рака и гистологическими подтипами существенно различается среди канцерогенных типов ВПЧ, но причины этих различий плохо изучены. Кроме того, клинически значимые подгруппы пациентов с раком шейки матки еще предстоит определить. Целью данного исследования является всесторонний анализ баз данных и литературы по инвазивному раку шейки матки с акцентом на выявление клинических и молекулярных ассоциаций, а также функционально измененных сигнальных путей, которые могут стимулировать онкогенез и метастазирование и служить прогностическими или терапевтическими маркерами.

Соматические геномные изменения

С использованием базы данных TCGA было проанализировано 337 образцов опухолей шейки матки. В совокупности образцы содержали 43 324 соматические мутации, в том числе 24 551 миссенс, 2470 нонсенс, 9 260 сайленс, 5 841 некодирующую, 535 сплайс-сайтов, 74 нон-стоп мутации, 475 вставок и делеций со смещением рамки считывания (Indels) и 118 инсерций в рамке считывания. Одиннадцать опухолей с наибольшей частотой мутаций (>600 на образец) были классифицированы нами как «гипермутанты». Совокупная плотность мутаций составила 4,04 мутации на 1 Мб во всех опухолях и 2,53 после исключения опухолей-«гипермутантов».

Четырнадцать генов, в которых мутации встречались с наибольшей частотой (FDR <0,1), были выделены с использованием алгоритма MutSig2CV. Мы определили *SHKBP1*, *ErbB3*, *Casp8*, *HLA-A* и *TGFBR2* в качестве новых статистически значимо мутированных генов (СМГ) при раке шейки матки, а также подтвердили, что *PIK3CA*, *EP300*, *FBXW7*, *HLA-B*, *PTEN*, *NFE2L2*, *ARID1A*, *KRAS* и *MAPK1* являются статистически значимо мутированными, как было показано ранее [6, 7] (рис. 1).

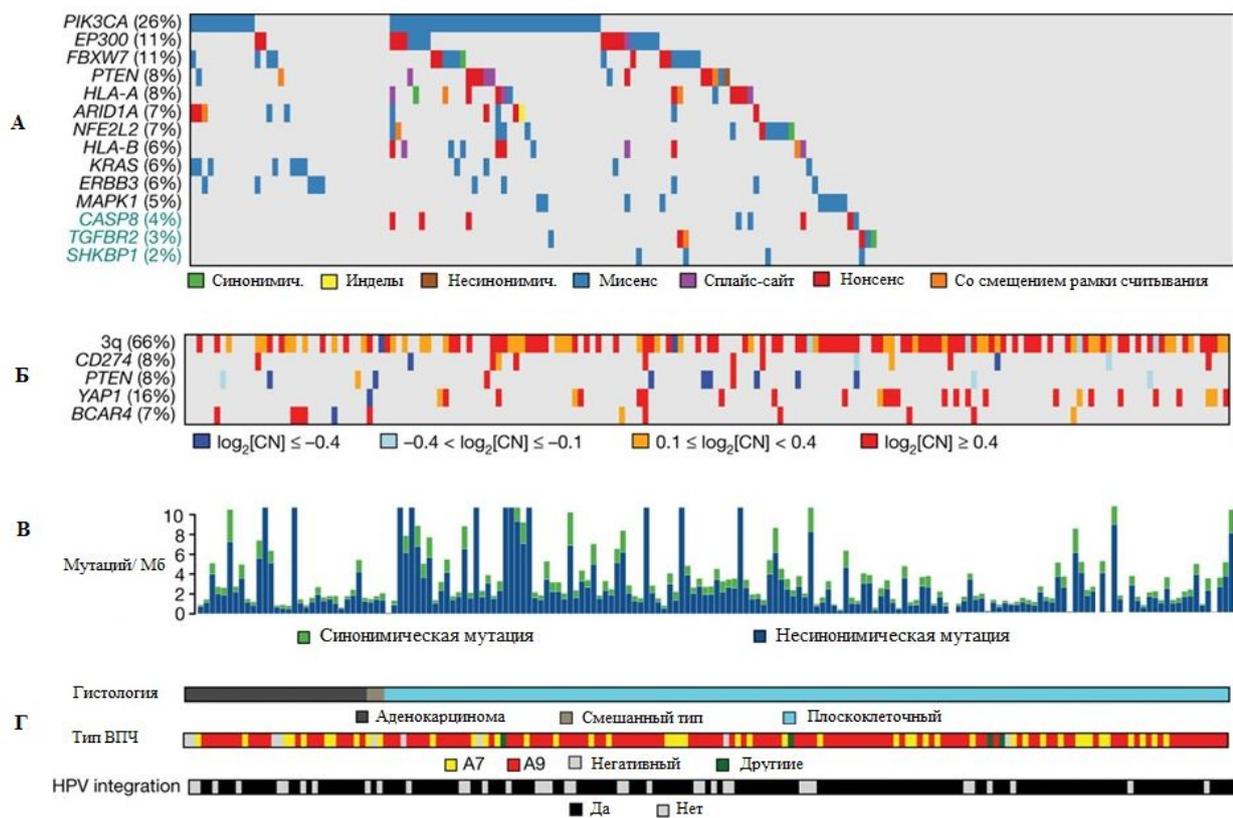


Рис. 1. Соматические геномные изменения при раке шейки матки:

А – гены со статистически значимыми мутациями, Б – изменения количества копий гена,
 В – образцы рака шейки матки, упорядоченные по гистологии и частоте мутаций,
 Г – клинические особенности исследованных образцов

В таблице 1 показано сравнение СМГ, идентифицированных на основе данных TCGA и ранее опубликованных данных [7]. Мутации в 7 из 14 СМГ (по данным TCGA) присутствовали по меньшей мере в одной плоскоклеточной карциноме и одной аденокарциноме. Однако мутации в *HLA-A*, *HLA-B*, *NFE2L2*, *MAPK1*, *Casp8*, *SHKBP1* и *TGFBR2* были найдены исключительно в плоскоклеточных опухолях.

В гене *PIK3CA* описаны в основном активирующие мутации E542K и E545K. Эти данные схожи с результатами, полученными по раку мочевого пузыря [8] и ВПЧ-положительному плоскоклеточному раку головы и шеи (HNSCs), но отличаются от данных по раку молочной железы и большинству других видов рака [9].

Таблица 1

Результаты MUTSIG2CV

Данные TCGA (без гипермутантов) (n=181)		Данные Ojesina et al. [7](n=115)	
Ген	q-value	Ген	q-value
<i>FBXW7</i>	1.02E-12	<i>FBXW7</i>	7.16E-11
<i>KRAS</i>	1.02E-12	<i>KRAS</i>	0.00347
<i>MAPK1</i>	3.69E-08	<i>MAPK1</i>	0.00304
<i>PTEN</i>	1.17E-06	<i>PTEN</i>	3.29E-05

<i>HLA-A</i>	4.38E-06	<i>HLA-A</i>	0.439
<i>HLA-B</i>	2.95E-05	<i>HLA-B</i>	0.0065
<i>ARID1A</i>	4.76E-04	<i>ARID1A</i>	1.00E+00
<i>EP300</i>	1.35E-03	<i>EP300</i>	0.00418
<i>PIK3CA</i>	2.92E-03	<i>PIK3CA</i>	<1.82e-11
<i>NFE2L2</i>	6.41E-03	<i>NFE2L2</i>	0.14
<i>CASP8</i>	3.13E-02	<i>CASP8</i>	0.141
<i>ERBB3</i>	5.80E-02	<i>ERBB3</i>	1.00E+00
<i>STK11</i>	1.00E+00	<i>STK11</i>	0.138
Данные TCGA (без гипермутантов)		Данные Ojesina et al. [7]	
Плоскоклеточный рак (n=148)		Плоскоклеточный рак (n=79)	
Ген	q-value	Ген	q-value
<i>FBXW7</i>	2.70E-08	<i>FBXW7</i>	4.03E-12
<i>MAPK1</i>	3.64E-08	<i>MAPK1</i>	6.71E-04
<i>HLA-A</i>	1.84E-06	<i>HLA-A</i>	2.81E-01
<i>HLA-B</i>	1.24E-05	<i>HLA-B</i>	1.69E-03
<i>PTEN</i>	2.23E-04	<i>PTEN</i>	6.93E-02
<i>NFE2L2</i>	2.85E-03	<i>NFE2L2</i>	5.97E-02
<i>EP300</i>	5.51E-03	<i>EP300</i>	3.54E-02
<i>PIK3CA</i>	6.92E-03	<i>PIK3CA</i>	9.08E-12
<i>CASP8</i>	2.68E-02	<i>CASP8</i>	1.10E-01
<i>ERBB3</i>	7.22E-02	<i>ERBB3</i>	1.00E+00
<i>KRAS</i>	7.22E-02	<i>KRAS</i>	1.00E+00
<i>TGFBR2</i>	7.22E-02	<i>TGFBR2</i>	1.00E+00
<i>SHKBP1</i>	8.45E-02	<i>SHKBP1</i>	1.00E+00
<i>STK11</i>	1.00E+00	<i>STK11</i>	1.20E-02
Данные TCGA (без гипермутантов)		Данные Ojesina et al. [7]	
Аденокарцинома (n=30)		Аденокарцинома (n=24)	
Ген	q-value	Ген	q-value
<i>KRAS</i>	1.38E-09	<i>KRAS</i>	1.31E-01
<i>ARID1A</i>	8.78E-04	<i>ARID1A</i>	9.38E-01
<i>CBFB</i>	1.00E+00	<i>CBFB</i>	3.42E-02
<i>ELF3</i>	1.00E+00	<i>ELF3</i>	3.00E-02

Важной молекулярной характеристикой любого типа опухолей является показатель копийности генов (Copy Number Variation (CNV)). CNV – вид генетического полиморфизма, результатом которого может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена – белка или некодирующей РНК [10-12].

Все образцы

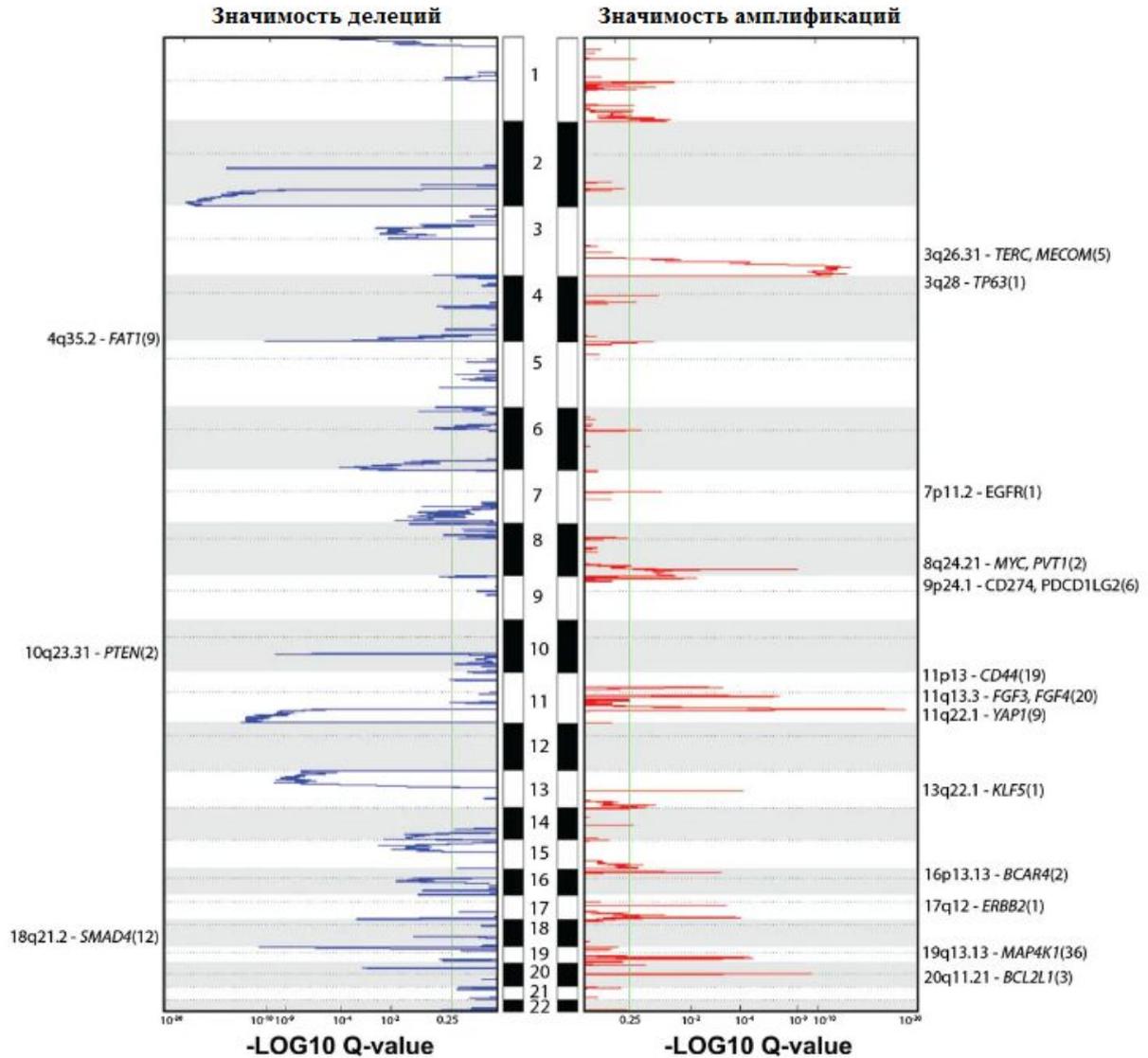


Рис. 2. Хромосомная локализация статистически значимых амплификаций (красный) и делеций (синий) генов, значения представлены по шкале $-\log_{10} q$ для всех образцов TCGA. Пики аннотированы драйверными генами. Общее количество генов в области пика указано в скобках. Аннотированные гены имеют значительную положительную корреляцию с экспрессией, соответствующей мРНК

Проанализировав данные TCGA, мы обнаружили в среднем на опухоль изменение копийности 88 генов, что меньше, чем при HNSC и раке яичников [13, 14, 15]. Анализ GISTIC2.0 выявил 26 амплификаций генов и 37 делеций (рис. 2). Амплификации были идентифицированы в участках 7p11.2 (*EGFR*, 17%), 9p24.1 (*CD274*, *PDCD1LG2*, 21%), 13q22.1 (*KLF5*, 18%) и 16p13.13 (*BCAR*, 420%), 3q26.31 (*TERC*, *MECOM*, 78%), 3q28 (*TP63*, 77%), 8q24.21 (*MYC*, *PVT1*, 42%), 11q22.1 (*YAP1*, *BIRC2*, *BIRC3*, 17%) и 17q12 (*ERBB2*, 17%).

Делеции были идентифицированы в 3p24.1 (*TGFBR2*, 36%) и 18q21.2 (*SMAD4*, 28%), 4q35.2 (*FAT1*, 36%) и 10q23.31 (*PTEN*, 31%). Кластер с большими изменениями числа копий генов в основном содержал плоскоклеточные опухоли с амплификациями участков 11q22 (*YAP1*, *BIRC2*, *BIRC3*) и 7p11.2 (*EGFR*), в то время как кластер с низкой частотой изменения числа копий генов включал большинство аденокарцином и был представлен опухолями с делециями *TGFBR2* и *SMAD4*, а также амплификациями *ERBB2* и *KLF5* (рис. 3).

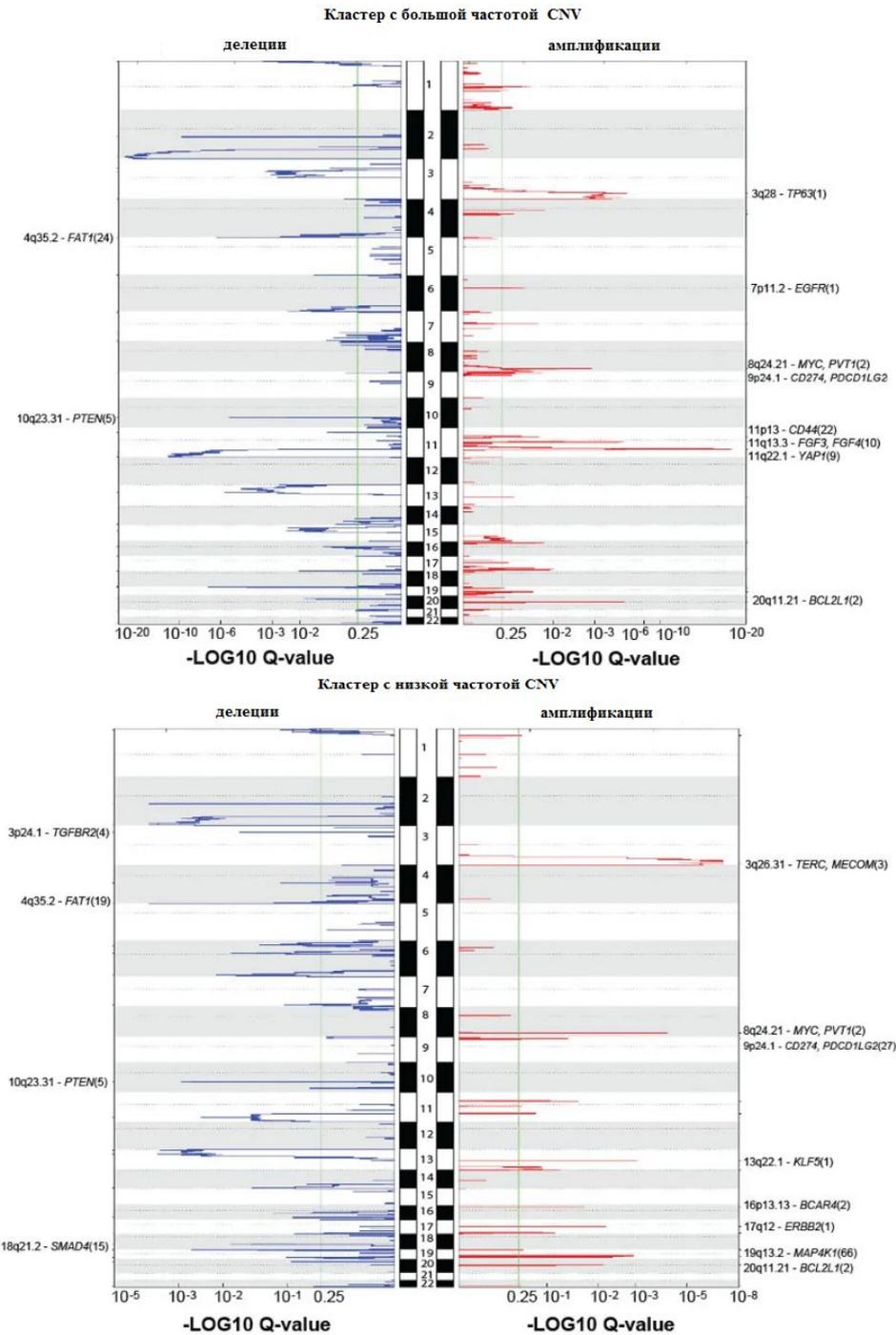


Рис. 3. Графики амплификаций и делеций генов по CNV-кластерам (получены с помощью модуля *GISTIC2.0*)

Примечательно, что обе группы имели амплификации с участием *CD274 (PD-L1)* и *PDCD1LG2 (PD-L2)*, которые статистически значимо коррелировали ($P < 0,0001$) с экспрессией двух ключевых иммунных цитолитических эффекторных генов – гранзима А и перфорина [16]. Это подчеркивает потенциал иммунотерапевтических стратегий для некоторых видов рака шейки матки.

Структурные перестройки были идентифицированы с помощью данных секвенирования РНК (RNA-seq) (TCGA, n=78) и данных секвенирования всего генома (WGS). Как RNA-seq, так и WGS выявили 22 структурные перестройки у 14 пациентов. В общей сложности было обнаружено 26 слияний (рис. 4). Анализ данных RNA-seq выявил четыре образца с 16p13 слияниями гена *ZC3H7A – BCAR4*, в результате чего экзон 1 *ZC3H7A* был связан с последним экзоном *BCAR4*. WGS обнаружил тандемную дупликацию и увеличение числа копий *BCAR4* на хромосоме 16p13.13.

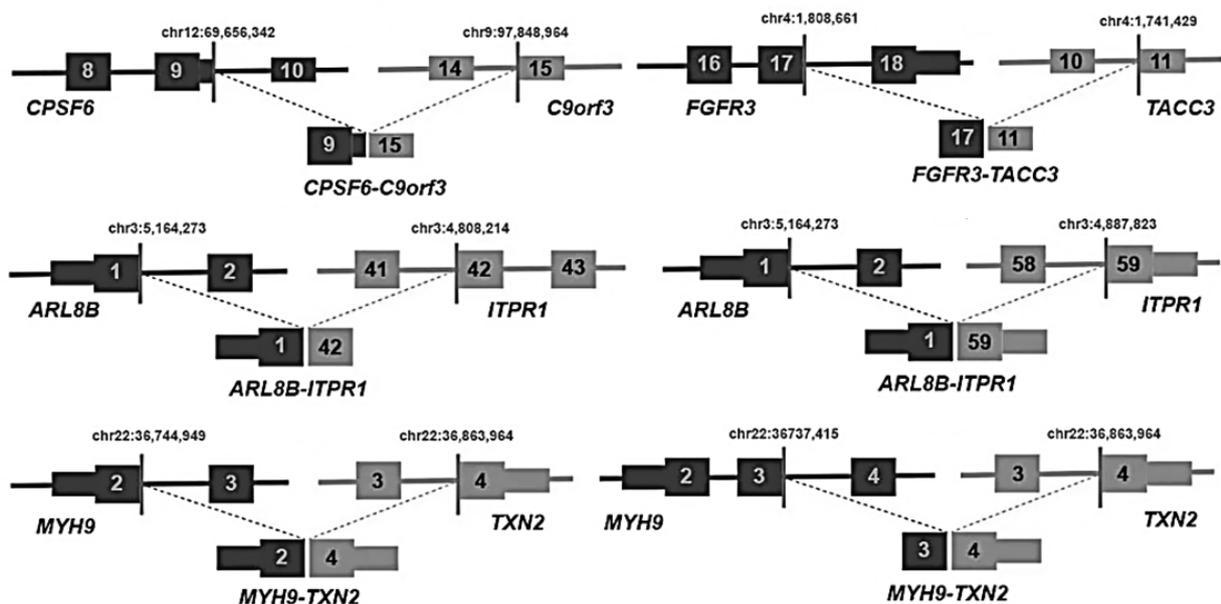


Рис. 4. Схема слияния *CPSF6-C9orf3*, *ARL8B-ITPR1* и *MYH9-TXN2*, а также слияний с известными проявлениями при других типах рака (*FGFR3-TACC3*), обнаруженных по меньшей мере в двух исследованиях RNA-seq

BCAR4 – это длинная некодирующая РНК, способствующая метастазированию, которая усиливает пролиферацию клеток при резистентном к эстрогену раке молочной железы, активируя путь *HER2/HER3*. Лапатиниб, ингибитор EGFR / HER2, противодействует росту опухоли, вызванной *BCAR4* in vitro, что требует дальнейших исследований для оценки потенциала этого терапевтического средства при *BCAR4*-положительном раке шейки матки [17].

Комплексный анализ молекулярных подгрупп рака шейки матки

Интеграция данных о копииности генов, метилировании, экспрессии мРНК и микроРНК с использованием iCluster [18] показала молекулярную гетерогенность рака шейки матки. Были идентифицированы 3 кластера, которые в основном соответствуют кластерам экспрессии мРНК: кластер (к-1) – плоскоклеточный рак с высокой экспрессией семейства кератиновых генов, кластер (к-2) – плоскоклеточный рак с более низкой экспрессией генов кератина и кластер аденокарцином (к-3). Мутации в генах *KRAS* ($P=9,7 \times 10^{-5}$), *ERBB3* ($P=2,6 \times 10^{-3}$) и *HLA-A* ($P=0,03$) были связаны с кластерами, при этом мутации *KRAS* отсутствовали в кластере с высоким уровнем экспрессии генов кератина, а мутации *HLA-A* отсутствовали в кластере аденокарцином (рис. 5). Гены *ARID1A* ($P=0,02$), *NFE2L2* ($P=6,9 \times 10^{-6}$) и *PIK3CA* ($P=0,01$) были дифференциально экспрессированы в кластерах 1 и 2.

Иерархическая кластеризация переменных данных по оценке уровня ДНК-метилирования позволила выделить три группы, включая кластер CpG-островков с гиперметилированием (CIMP(CpG island methylator phenotype)-high), кластер с промежуточным уровнем CIMP и кластер с низким уровнем CIMP, которые были связаны с уровнем мРНК генов эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) [19].

Большинство образцов в кластере аденокарциномы имели высокий уровень CIMP, тогда как другие группы iCluster содержали образцы с промежуточным и низким уровнем CIMP (рис. 5). Сравнивая все опухоли шейки матки с нормальными образцами, взятыми из 12 проектов TCGA, мы идентифицировали 1026 эпигенетически подавленных генов, включая *ZNF*, *ADAM*, *ADAMTS* и *COL*, которые были метилированы в большей степени при раке, чем в нормальных тканях.

Кластеризация по уровню экспрессии микроРНК позволила выделить 6 кластеров ($P=1,7 \times 10^{-19}$). Образцы из кластера аденокарцином перекрывались с кластером № 5 miRNA и характеризовались высокой экспрессией miR-375 и низкой экспрессией miR-205-5p и miR-944 (рис. 6).

Уровни экспрессии опухолевых супрессоров miR-99a-5p и miR-203a были значительно выше в образцах кластера с высоким уровнем экспрессии генов кератина, чем в образцах кластера с низким уровнем экспрессии генов кератина ($P=0,01$ и $P=0,008$ соответственно).

Среди miRNAs со значительными и функционально подтвержденными антикорреляциями 22 генов и белков выделяются микроРНК семейства miR-200, которые коррелировали с EMT-связанными факторами транскрипции *ZEB1*, *ZEB2* и *SNAI2*, геном *YAP1*, *ERBB2*, *ERBB3* и *AXL* и геном рецептора эстрогена *ESR1*. Анализ белковых RPPA (reverse phase protein lysate microarray)-микрочипов со 192 антителами (рис. 6) выявил 3 кластера, достоверно связанных с группами iCluster ($P=1,8 \times 10^{-4}$) и экспрессий мРНК EMT.

Образцы из кластера EMT были связаны с кластером плоскоклеточного рака с низким уровнем экспрессии кератина, тогда как образцы PI3K-AKT и гормонального кластера были связаны с кластерами плоскоклеточного рака с высоким уровнем кератина и аденокарциномой, что указывает на активацию различных сигнальных путей в этих подтипах рака шейки матки.

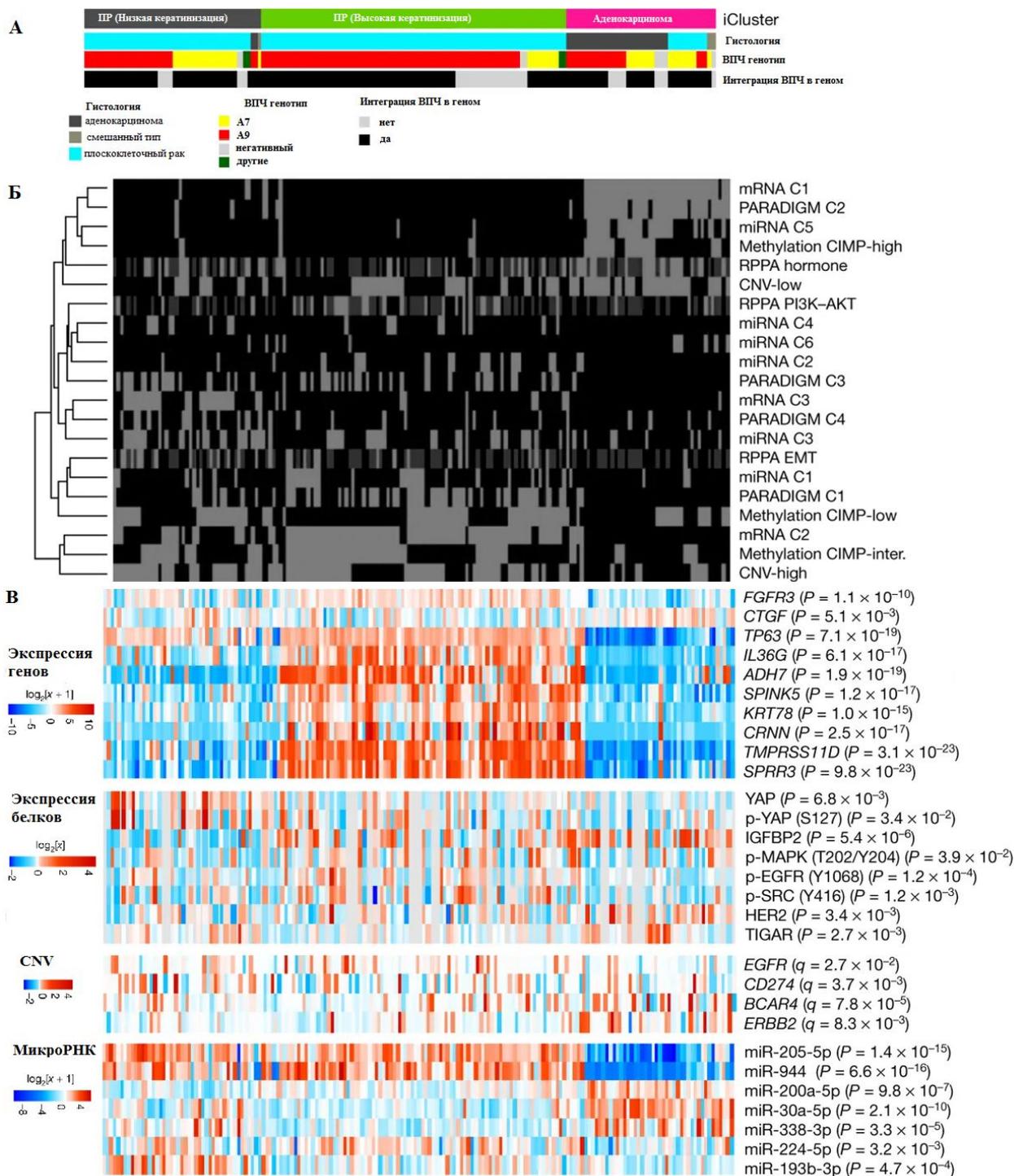


Рис. 5. Мультиплатформенная интегративная кластеризация опухолей шейки матки:

А. Интегративная кластеризация 178 образцов цервикального рака с использованием данных мРНК, метилирования, микроРНК и вариации числа копий (CNV) идентифицирует две группы плоскоклеточного рака (с низкой и высокой экспрессией генов кератина) и одну

группу аденокарциномы. Представленные характеристики включают гистологию, статус ВПЧ и статус интеграции ВПЧ, UCES-подобный статус, уровень мутагенеза APOBEC, показатель мРНК EMT, чистоту опухоли и три SMG (*KRAS*, *ERBB3* и *HLA-A*), которые значительно связаны между тремя кластерами, идентифицированными с помощью *iCluster*.

Б. Тепловая карта кластеров (данные по мРНК, микроРНК, метилированию, CNV и PARADIGM). C1 – C6 обозначают кластеры.

В. Тепловые карты показывают выбранные мРНК, микроРНК, белки и CNV, которые либо значительно связаны с группами *iCluster*, либо были идентифицированы как маркеры в других анализах

Дифференциальные уровни экспрессии фосфорилированных белков p-MAPK, p-EGFR (Y1068), p-SRC (Y416), IGFBP2 и TIGAR в двух кластерах плоскоклеточного рака предполагают различные паттерны активации *RTK*, *MAPK*, *PI3K* и метаболических сигнальных путей, которые могут лежать в основе молекулярного разнообразия плоскоклеточного рака шейки матки (рис. 6).

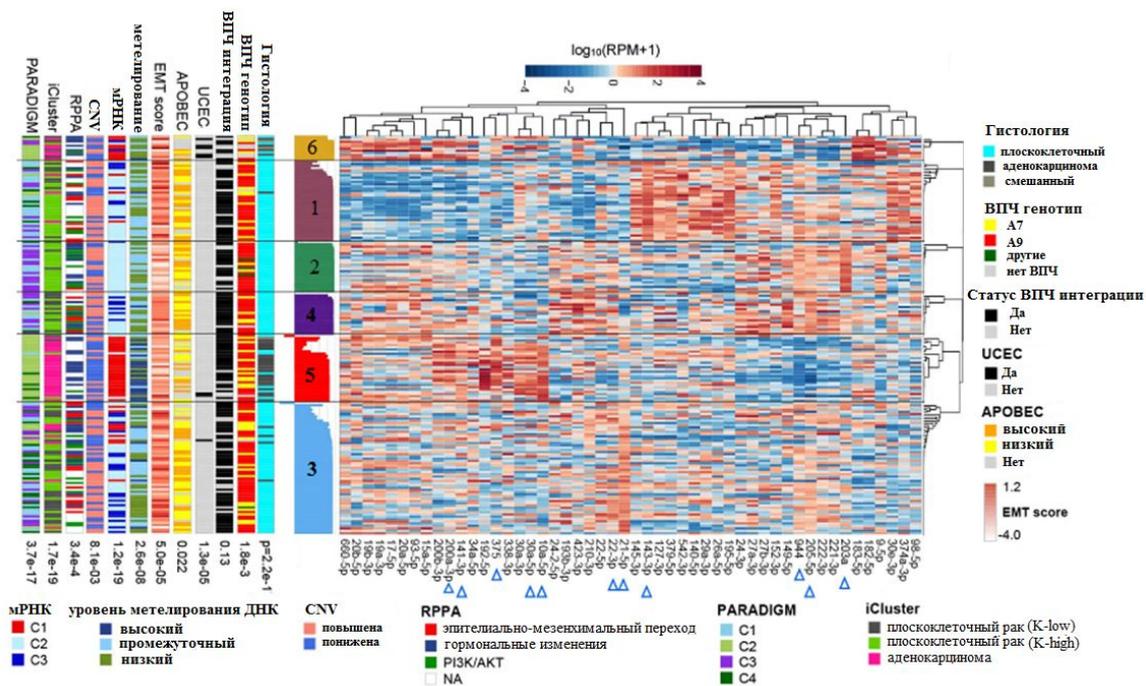


Рис. 6. Кластеры микроРНК в 178 образцах опухолей шейки матки (данные *SAMseq*) и их корреляционные взаимосвязи между генами и белками. Синими треугольниками отмечены микроРНК, ассоциированные с раком, дифференциально экспрессированные при различных гистологических подтипах

Основные члены каждого кластера RPPA были связаны с пятилетней выживаемостью, причем группа EMT показала худший результат. Примечательно, что это была единственная

платформа (протеомное профилирование), на которой кластеры связаны с выживаемостью. Образцы в кластере EMT показали наличие подмножества стромальных опухолей, которые имеют высокую экспрессию *MYH11* и *RAB11*. YAP был наиболее сильно экспрессированным белком, отличающим образцы кластера EMT от всех других, и ген *YAP1* также был гиперэкспрессирован в образцах из кластера EMT по сравнению с кластером PI3K-AKT. Регулирование связанных с EMT молекул YAP и ZEB1 [20, 21, 22] также может быть обусловлено значительно более низкими уровнями экспрессии miR-200a-3p в образцах из кластера EMT по сравнению с образцами из других кластеров RPPA. Эти результаты подчеркивают потенциальную роль YAP в EMT-регулируемой прогрессии рака шейки матки.

Алгоритм модулей взаимной исключительности (MEMo) [23] использует данные соматических мутаций и числа копий гена для идентификации онкогенных сетей с взаимоисключающими геномными изменениями. Поскольку экспрессия miR-200a и miR-200b (miR-200a / b) отрицательно коррелировала с оценками мРНК EMT, Gregory P. и соавторы использовали MEMo для изучения изменений в генных сетях miR-200a/b и EMT и обнаружили потенциальную связь между путем TGFβ и изменениями miR-200a/b в регуляции EMT [24, 25]. Делеции и мутации, затрагивающие ген рецептора *TGFBR2*, модулирующие гены *CREBBP* и *EP300* и фактор транскрипции *SMAD*, вероятно, влияют на рост-подавляющие и проапоптотические функции (рис. 7) и наблюдались в 30% плоскоклеточных карцином.

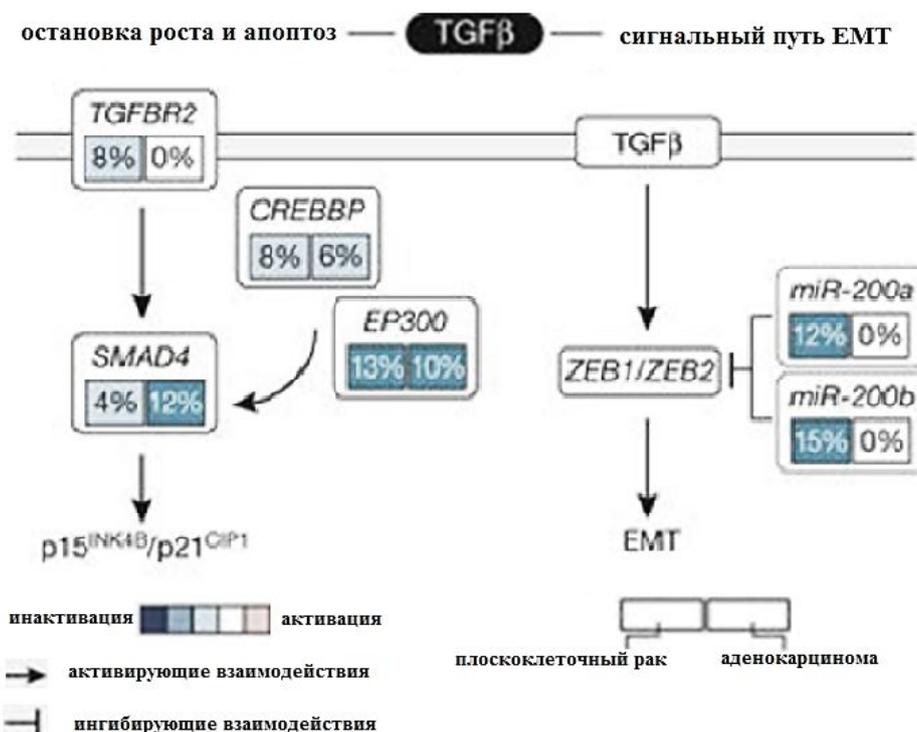


Рис. 7. Взаимоисключительность соматических изменений в сигнальном пути $TGF\beta R2$.

(Сигналы $TGF\beta$ часто изменяются в опухолях шейки матки. Изменения в этом пути делятся между теми, которые, вероятно, влияют на функции подавления опухоли $TGF\beta$, и теми, которые влияют на программу EMT, управляемую $TGF\beta$.)

Плоскоклеточные опухоли с низкой экспрессией генов кератина как с гиперметилированием, так и с пониженной регуляцией miR-200a / b показали значительную активацию как *ZEB1*, так и *ZEB2* и были взаимоисключающими с изменениями в сигнальном пути $TGF\beta$. Примечательно, что образцы с измененным miR-200a / b показали более высокие оценки мРНК EMT, чем неизмененные образцы, тогда как не было обнаружено существенного различия между образцами с изменениями $TGF\beta$ -пути или без них. Эти результаты подчеркивают потенциальные подходы к лечению этой подгруппы пациентов с раком шейки матки, поскольку нацеливание на EMT может сделать опухоли более чувствительными к низкомолекулярным ингибиторам и цитотоксической химиотерапии [19, 26, 27].

Анализ MEMO также показал различия в терапевтически значимых изменениях путей RTK, PI3K и MAPK при раке шейки матки. Обнаружена сильная тенденция к совместному появлению изменений ERBB2 и ERBB3 в аденокарциномах, что указывает на то, что подгруппа этих опухолей может демонстрировать aberrантную передачу сигналов HER3 через взаимодействия между мутантом HER3 и активированным HER2 и, следовательно, способна потенциально обеспечить преимущество HER2- и HER3-ориентированной терапии [28]. Аберрации в *PIK3CA* также имеют тенденцию сочетаться с соматическими мутациями и делециями *PTEN*, что аналогично опухолям эндометрия с небольшим изменением числа копий и предполагает потенциальную терапевтическую пользу от PI3K-таргетных препаратов [14].

PARADIGM [29, 30], которая объединяет копийность генов, данные RNA-seq и взаимодействие сигнальных путей, показал заметно отличающиеся молекулярные профили между плоскоклеточным раком и аденокарциномой. PARADIGM идентифицировал более высокую предполагаемую активацию сигнальных путей *p53*, *p63*, *p73*, *AP-1*, *MYC*, *HIF1A*, *FGFR3* и *MAPK* в качестве ключевых отличительных признаков плоскоклеточного рака, сходного с другими плоскоклеточными раками [31]. В отличие от этого, аденокарциномы демонстрировали более высокую активацию путей *ERα*. Ведущую роль в патогенезе данного заболевания играет гиперэстрогения. Эстрогены стимулируют пролиферацию клеток, индуцируя синтез факторов роста и их рецепторов, в том числе и эстрогеновый рецептор α типа ($ER\alpha$ или ESR1) [32]. Возможные механизмы, лежащие в основе повышающей

активности ER α , могут проистекать из экспрессии miR-193b-3p, прямого регулятора *ESR1*, который был значительно подавлен при аденокарциномах по сравнению с плоскоклеточным раком, или от передачи сигналов эстрогена в стромальных клетках [33].

Генотипы и интеграция ВПЧ

Из 178 опухолей 169 (95%) были ВПЧ-положительными, 120 (67%) имели альфа-9 (A9) типы (103 ВПЧ16), 45 (25%) имели альфа-7 (A7) типы (27 HPV18) и 9 (5%) были HPV-отрицательными. Варианты ВПЧ были преимущественно европейскими (137 из 169, 81% вариантов A), и была отмечена значительная связь неевропейских вариантов ВПЧ16 с аденокарциномами. Все HPV-положительные виды рака имели детектируемую экспрессию мРНК E6- и E7-онкогена HPV, которые кодируют белки, ингибирующие функции p53 и RB соответственно [5, 34, 35]. Примечательно, что HPV18 опухоли имели значительно более высокие соотношения несплайсированных и сплайсированных транскриптов, кодирующих активный онкопротеин E6, чем другие опухоли, что указывает на различные функциональные значения E6 и E7 в опухолях, связанных с разными генотипами ВПЧ.

Типы ВПЧ A7 были представлены в кластерах с плоскоклеточным раком и аденокарциномами. Большинство опухолей ВПЧ A7 были слабо метилированы (CIMP-low), а HPV-отрицательные опухоли образовывали отчетливую подгруппу в кластере CIMP-low со значительно более низким средним уровнем промотора-метилирования, чем в других образцах в этом кластере. Образцы с самой высокой степенью сайленсинга генов были ВПЧ-положительными аденокарциномами (генотип A9). Функциональный эпигенетический модуль анализа, который объединяет данные ДНК-метилирования и экспрессии генов с использованием сетей взаимодействий, выявил обратные корреляции между метилированием и экспрессией генов при ВПЧ-положительном и ВПЧ-отрицательном раке шейки матки. Анализ выявил 12 статистически значимых подсетей для рака шейки матки. miR-944, miR-767-5p и miR-105-5p были наиболее дифференцированно экспрессируемыми miRNAs между HPV-положительными и HPV-отрицательными образцами. Экспрессия miR-944 также была значительно выше, в то время как экспрессия miR-375 была значительно ниже при плоскоклеточном раке с HPV16 по сравнению с плоскоклеточным раком с HPV18. Примечательно, что HPV-негативные виды рака имели значительно более высокий показатель мРНК EMT и более низкую частоту сигнатуры мутагенеза APOBEC по сравнению с HPV-положительными опухолями [36].

PARADIGM использовали для оценки молекулярных путей, дифференциально активированных в плоскоклеточных опухолях с инфекциями HPV генотипов A7 и A9. Наблюдалась более высокая активация сигнальных путей p53 и p63 и более низкая – сигнального пути FOXA1 в опухолях, инфицированных типами A9 (рис. 8). Более высокая

активация пути SFN также наблюдалась при A9-позитивных опухолях, что согласуется с низким метилированием и высоким уровнем экспрессии генов SFN, обнаруженным при функциональном анализе эпигенетического модуля. Примечательно, что SFN белок (также известный как 14-3-3σ) ранее был связан с эпителиальной иммортализацией и плоскоклеточным раком, измененной активацией сигнального пути p53 и Wnt-опосредованной передачей сигналов β-катенином [37, 38].

Вирусно-клеточные транскрипты, указывающие на интеграцию ВПЧ в геном хозяина, наблюдались в 141 из 169 (83%) ВПЧ-позитивных опухолей, включая все ВПЧ-18-позитивные формы. Из этих 141 опухоли 90 (64%) имели одно событие интеграции ВПЧ, 35 имели два события и 16 имели три или более событий (всего 220 уникальных событий интеграции). События интеграции ВПЧ повлияли на все хромосомы, включая некоторые ранее описанные горячие точки, такие как 3q28 и 8q24 (рис. 8).

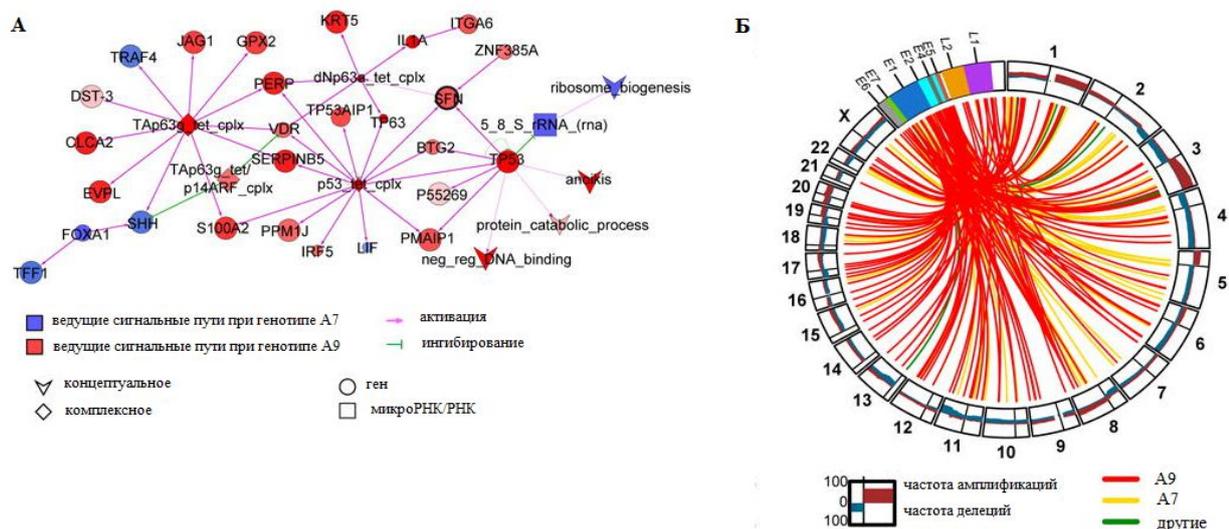


Рис. 8. Интеграция ВПЧ и активация сигнальных путей, дифференциальных между подтипами ВПЧ:

А. Результат моделирования в Cytoscape самой большой взаимосвязанной регуляторной сети с функциями интегрированного уровня пути (integrated pathway levels, IPL) PARADIGM, показывающий дифференциальную активацию сигнальных путей при плоскоклеточном раке с HPV A9 и A7. Цвет узла и интенсивность отражают уровень дифференциальной активации. Размер узла представляет уровень значимости.

Б. Диаграмма Circos, показывающая частоту (0–100%) амплификаций и делеций для областей каждой хромосомы (внешнего круга). Линии во внутреннем круге указывают на точки интеграции генома ВПЧ (гены L1, L2, E1, E2, E4, E5, E6 и E7) в геном человека

Геномные локусы, затронутые интеграцией, характеризовались повышенными изменениями числа копий генов и повышенной экспрессией генов. Кроме того, 153 (70%)

слитых транскриптов включали известные или предсказанные гены, тогда как остальные включали межгенные области [39].

Молекулярные механизмы и маркеры регионарного метастазирования при раке шейки матки

Общая выживаемость обычно высока среди пациентов с ранними стадиями рака шейки матки; тем не менее наличие метастазов в лимфатических узлах в четыре раза снижает выживаемость [40]. Молекулярные маркеры как средство выявления метастазов в лимфатических узлах могут иметь важное терапевтическое значение. Одним из таких маркеров может выступать изменение копийности генов (CNV). CNV представляет собой критическое генетическое событие, которое способствует развитию и прогрессированию (метастазированию) злокачественных новообразований у человека [41, 42].

Как описано выше, геномные изменения при раке шейки матки, в частности амплификации в хромосомах 1q, 3q и 5p, были зарегистрированы во многих исследованиях [43]. Потенциальные гены, представляющие интерес в этих областях амплификации, включают *LAMP3*, *CCND1*, *PROX1* и *PRKAA1*. *LAMP3* находится в области, имеющей большое значение для канцерогенеза шейки матки. Высокая экспрессия этого гена связана с повышенным метастатическим потенциалом при раке шейки матки. Ген *PROX1* является специфическим маркером лимфатического эндотелия, участвующим в регуляции развития лимфатической системы. *PRKAA1*, клеточный регулятор метаболического стресса, может способствовать росту опухолевых клеток в условиях стресса и является потенциальным маркером канцерогенеза шейки матки [40]. *CCND1* – генетический маркер клеточной пролиферации. Сверхэкспрессия *CCND1* также связана с метастазами в лимфатические узлы [44].

В работе Wangsa D. и соавторов [40] обнаружено, что анализ числа геномных копий *LAMP3*, *PROX1* и *PRKAA1* позволяет статистически значимо прогнозировать метастазы в лимфатические узлы для рака шейки матки. Также в этой работе обнаружено, что клональные паттерны могут различаться между первичной опухолью и ее метастазированием, что указывает на то, что определенные клоны способны иметь преимущество при росте в среде лимфатического узла. До этого ни одно другое исследование не проводило анализы FISH для прогнозирования метастазов в лимфатических узлах при раке шейки матки. В исследованиях, направленных на прогнозирование метастазов в лимфатических узлах, использовались такие методы, как иммуногистохимия, ОТ-ПЦР и профилирование экспрессии генов. Иммуногистохимия является экономически эффективным методом, но для прогнозирования метастазов в лимфатических узлах при раке шейки матки сообщалось о различных эпитопах (Cox-2, p16, CXCR4, CCR7, D2-40 и т.д.) и

противоречивых результатах [40]. Исследования профилирования экспрессии генов также обнаружили расходящиеся результаты в исследовании Biewenga et al. [45], который не смог предсказать метастазы в лимфатические узлы на ранней стадии рака шейки матки, в то время как в исследовании Kim et al [46] это было сделано. Biewenga et al. [45] обнаружил 5 генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию между пациентами с метастазами в лимфатических узлах и без них. Прогнозирование метастатического поражения лимфатических узлов поможет в разработке адекватных вариантов лечения для пациентов, поскольку гистологически необнаружимые микрометастазы в лимфатической системе могут быть причиной рецидива рака шейки матки. Гистологические исследования не являются непогрешимыми, так как включают только небольшую часть лимфатических узлов, а исследователь имеет шанс 1% обнаружить микрометастатический очаг в пределах диаметра трех опухолевых клеток [40].

Амплификация генов является распространенным механизмом активации онкогена, и при раке шейки матки часто наблюдается увеличение количества хромосом 1q, 3q и 5p [43]. В исследовании Wangsa D. и соавторов [40] *LAMP3* амплифицирован, что подтверждает прирост числа копий в области 3q. Амплификация хромосомы 3q также была связана с метастазами в лимфатических узлах в двух исследованиях с использованием сравнительной геномной гибридизации, которая показала увеличение прироста числа копий 3q в первичных опухолях с метастазированием в лимфатические узлы; однако результаты не были статистически значимыми. Хотя функция *LAMP3* полностью не известна, предполагают, что *LAMP3* может быть вовлечен в миграцию опухолевых клеток в окружающие лимфатические сосуды. *PROX1* был обнаружен исключительно в лимфатических эндотелиальных клетках и жизненно важен для развития эмбриональных лимфатических узлов [47]. Снижение экспрессии *PROX1* было обнаружено при нескольких видах рака, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак желчных протоков и рак молочной железы. Однако при раке толстой кишки избыточная экспрессия *PROX1* вызывает прогрессирование рака толстой кишки, способствуя переходу от доброкачественного к высокодиспластическому фенотипу. При раке шейки матки *PROX1* находится в области амплификации (хромосома 1q), что может указывать на то, что прирост числа копий *PROX1* может функционировать аналогично таковому при раке толстой кишки. Развитие рака шейки матки также связано с увеличением числа копий в области хромосомы 5p, причем *PRKAA1* является потенциально интересным геном. Так, показано, что высокая экспрессия *PRKAA1* может помогать злокачественным опухолям поддерживать устойчивость к гипоксическому состоянию [48].

Клональные паттерны могут варьировать среди первичных опухолей шейки матки. Исследование Wangsa D. и соавторов [40] – это первое исследование, изучающее разницу в

паттернах маркеров между клетками первичного рака шейки матки и синхронными метастазами в лимфатических узлах. В этой работе несколько случаев показали одинаковые клоны и их частоту между первичной опухолью и метастазами в лимфатических узлах, что указывает на то, что основной клон(ы) первичной опухоли были также наиболее успешными клонами для формирования метастазов в лимфатических узлах. Следовательно, в этих случаях, по крайней мере на тестируемом геномном уровне, большинство клеток первичной опухоли могут стать метастатическими клетками. В этом случае метастатический потенциал уже будет присутствовать в объеме опухоли. Однако в некоторых случаях изменения в клональной конституции между первичной опухолью и метастазами в лимфатических узлах указывают на то, что ранее существовавший, но незначительный клон в первичной опухоли имел преимущества для развития метастазов в лимфатических узлах по сравнению с основным клоном первичной опухоли. Это соответствует гипотезе о том, что подмножество клеток в первичной опухоли имеет генетическую структуру, которая в конечном итоге приводит к метастазированию, что может указывать на то, что для метастазирования необходимы дополнительные мутации в нескольких клетках. Это различие в паттернах может отражать различные механизмы развития метастазов в лимфатических узлах при раке шейки матки.

В исследовании Zhou Y и соавторов [49] экспрессия *WNT2* часто наблюдалась в образцах с метастазами в периферические лимфатические узлы (PLNM) по сравнению с экспрессией в образцах без PLNM и, таким образом, выделялась в качестве потенциального гена-кандидата в регуляции PLNM. Семейство генов WNT человека состоит из 19 членов, которые кодируют эволюционно консервативные гликопротеины. Передача сигналов WNT участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и миграции клеток. В последнее десятилетие раскрыта роль *WNT2* в развитии и прогрессировании различных видов рака. Так, *WNT2* активируется при раке желудка и может влиять на образование, инвазию и распространение опухоли. Опухолевые фибробластные клетки также секретируют *WNT2*, который действует как фактор, способствующий росту и инвазии, активируя канонический сигнальный путь WNT / β -catenin в раковых клетках пищевода [49].

В исследовании Zhou Y и соавторов уровень экспрессии WNT2 (как мРНК, так и белка) повышен при раке шейки матки по сравнению с неопухолевыми тканями шейки матки. Наблюдалась значительная связь между высокой экспрессией *WNT2* и размером опухоли. Важно, что уровни экспрессии *WNT2* и PLNM были независимыми прогностическими факторами для плохих показателей выживаемости у пациентов на ранней стадии рака шейки матки. Более того, нокдаун *WNT2* приводит к снижению подвижности

клеток [49]. Учитывая это, можно считать, что *WNT2* является потенциальным новым предиктором PLNM и многообещающей терапевтической мишенью при раке шейки матки.

До сих пор стандартное лечение ранней стадии рака шейки матки включало радикальную гистерэктомию плюс лимфаденэктомию или химиорадикотерапию, при которых имеются сходные показатели выживаемости. Химиолучевая терапия необходима для пациентов с метастазами в лимфатических узлах, что делает начальную хирургическую процедуру ненужной в ретроспективе. Тем не менее, поскольку невозможно точно и эффективно клинически определить метастазы в тазовые и парааортальные лимфатические узлы, онкологи не могут определять стратегию лечения, избегать ненужного хирургического вмешательства [49].

Точность прогнозирования PLNM путем определения экспрессии *WNT2* (высокая или низкая) составляет 36%. Поскольку сообщаемый показатель микрометастаза в лимфатических узлах тазовых органов составляет 15% у пациентов с ранней стадией рака шейки матки, весьма вероятно, что фактическая точность прогнозирования PLNM путем определения экспрессии *WNT2* может составлять 51% [40].

Заключение

Благодаря комплексному молекулярному профилированию в настоящее время выявлены новые геномные и протеомные характеристики, которые подразделяют рак шейки матки на несколько подтипов. Кластерный анализ идентифицировал слабokerатинизированные плоскоклеточные опухоли, кератинизированные плоскоклеточные опухоли и аденокарциномы, отличающиеся по ВПЧ-статусу и молекулярным особенностям. *ErbB3*, *Casp8*, *HLA-A*, *SHKBP1* и *TGFBR2* были идентифицированы как гены с наиболее сильно выраженными мутационными изменениями при первичном раке шейки матки, а *ErbB3* (*HER3*) – непосредственно как терапевтическая мишень. Кроме того, идентифицированы амплификации в генах *CD274* и *PDCD1LG2*, которые кодируют хорошо известные мишени для иммунотерапии. Был обнаружен ряд эндометриально-подобных раковых заболеваний шейки матки, состоящих преимущественно из ВПЧ-негативных опухолей и характеризующихся мутациями в *KRAS*, *ARID1A* и *PTEN*, при этом белки *PTEN* и, возможно, *ARID1A* могут служить терапевтическими мишенями. Важно отметить, что более чем в 70% случаев рака шейки матки отмечаются геномные изменения в одном или обоих сигнальных путях *PI3K-MAPK* и *TGFβ*, что иллюстрирует потенциальную клиническую значимость терапевтических агентов, нацеленных на участников этих путей. Вместе эти результаты дают представление о молекулярных подтипах рака шейки матки и служат обоснованием необходимости разработки различных методов лечения для этих подтипов.

В настоящее время невозможно точно и клинически эффективно указать метастазы в тазовые и парааортальные лимфатические узлы при раке шейки матки, поэтому онкологи не могут точно определять стратегию лечения и избежать ненужного хирургического вмешательства. Однако результаты исследований последнего десятилетия свидетельствуют, что показатель копийности генов *LAMP3*, *PROX1*, *PRKAA1* и *WNT2* является потенциальным новым предиктором метастазирования в лимфатические узлы, а сами гены – многообещающей терапевтической мишенью при раке шейки матки.

Список литературы

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 2015. V. 136. P.359-386.
2. Schiffman M., Wentzensen N., Wacholder S., Kinney W., Gage J.C., Castle P.E. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011. V. 103(5). P.368-383.
3. Uyar D., Rader J. Genomics of cervical cancer and the role of human papillomavirus pathobiology. *Clin. Chem.* 2014. V. 60. P.144-146.
4. Moody C.A., Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. P.550-560.
5. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. № 1. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29529> (дата обращения: 11.02.2020).
6. Chung T.K.H. Genomic aberrations in cervical adenocarcinomas in Hong Kong Chinese women. *Int. J. Cancer*. 2015. V. 137. P. 776-783.
7. Ojesina A.I., Lichtenstein L., Freeman S.S., Peadarallu C.S., Imaz-Rosshandler I., Pugh T.J., Cherniack A.D., Ambrogio L., Cibulskis K., Bertelsen B., Romero-Cordoba S., Treviño V., Vazquez-Santillan K., Guadarrama A.S., Wright A.A., Rosenberg M.W., Duke F., Kaplan B., Wang R., Nickerson E., Walline H.M., Lawrence M.S., Stewart C., Carter S.L., McKenna A., Rodriguez-Sanchez I.P., Espinosa-Castilla M., Woie K., Bjorge L., Wik E., Halle M.K., Hoivik E.A., Krakstad C., Gabiño N.B., Gómez-Macías G.S., Valdez-Chapa L.D., Garza-Rodríguez M.L., Maytorena G., Vazquez J., Rodea C., Cravioto A., Cortes M.L., Greulich H., Crum C.P., Neuberger D.S., Hidalgo-Miranda A., Escareno C.R., Akslen L.A., Carey T.E., Vintermyr O.K., Gabriel S.B., Barrera-

Saldaña H.A., Melendez-Zajgla J., Getz G., Salvesen H.B., Meyerson M. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2014. V. 506 (7488). P. 371-375.

8. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014. V. 507. P. 315–322.

9. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015. V. 517. P.576-582

10. Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Карнаухов Н.С., Кит О.И. Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой лёгкого // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 6. С. 731-738.

11. Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Кит О.И., Кутилин Д.С. Зависимость общей и безрецидивной выживаемости больных от молекулярногенетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода // Вопросы онкологии. 2019. Т.65(5). С. 691-700

12. Кит О.И., Кутилин Д.С., Водолажский Д.И., Малейко М.Л., Двадненко К.В., Антонен А.В., Максимов А.Ю., Енин Я.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генов при малигнизации тканей желудка // Евразийский онкологический журнал. 2014. Т.3 (3). С. 436.

13. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011. V. 474. P.609-615.

14. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013. V. 497. P.67-73.

15. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кутилин Д.С. Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 1. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29428> (дата обращения: 19.04.2020).

16. Rooney M.S., Shukla S.A. Wu C.J., Getz G., Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015. V. 160. P. 48-61.

17. Godinho M. F. E.. BCAR4 induces antioestrogen resistance but sensitises breast cancer to lapatinib. *Br. J. Cancer*. 2012. V. 107. P. 947-955.

18. Shen R., Olshen A.B., Ladanyi M. Integrative clustering of multiple genomic data types using a joint latent variable model with application to breast and lung cancer subtype analysis. *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P.2906–2912.

19. Byers L. A. An epithelial–mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin. Cancer Res*. 2013. V. 19. P.279-290.

20. Seton-Rogers S. Oncogenes: all eyes on YAP1. *Nat. Rev. Cancer*. 2014. V. 14. P.514-515.

21. Shao D.D. KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. *Cell*. 2014. V. 158. P.171-184.
22. Vandewalle C., Van Roy F., Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci*. 2009. V. 66. P.773-787.
23. Ciriello G., Cerami E., Sander C., Schultz N. Mutual exclusivity analysis identifies oncogenic network modules. *Genome Res*. 2012. V. 22. P.398-406.
24. Gregory P. A. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol*. 2008. V. 10. P. 593-601.
25. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2012. V. 13. P. 616-630.
26. Haslehurst A. M. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2012. V. 12. P.91.
27. Taube J.H. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. 15449-15454.
28. Jaiswal B.S., Kljavin N.M., Stawiski E.W., Chan E., Parikh C., Durinck S., Chaudhuri S., Pujara K., Guillory J., Edgar K.A., Janakiraman V., Scholz R.P., Bowman K.K., Lorenzo M., Li H., Wu J., Yuan W., Peters B.A., Kan Z., Stinson J., Mak M., Modrusan Z., Eigenbrot C., Firestein R., Stern H.M., Rajalingam K., Schaefer G., Merchant M.A., Sliwkowski M.X., de Sauvage F.J., Seshagiri S. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell*. 2013. V. 23(5). P. 603-617.
29. Sedgewick A.J., Benz S.C., Rabizadeh S., Soon-Shiong P., Vaske C.J. Learning subgroup-specific regulatory interactions and regulator independence with PARADIGM. *Bioinformatics* 2013. V. 29. P.62-70.
30. Vaske C.J. Inference of patient-specific pathway activities from multi-dimensional cancer genomics data using PARADIGM. *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P.237-245.
31. Hoadley K. A. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell*. 2014. V. 158. P.929–944.
32. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Никитин И.С., Моисеенко Т.И., Франциянц Е.М. Транскриптомная активность эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 115. С. 294-304.
33. den Boon J.A. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: role of stromal estrogen receptor signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V.112. P.3255–3264.
34. Roman A., Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. 2013. V.445. P.138-168.

35. Vande Pol S.B., Klingelhutz A.J. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013. V. 445. P. 115–137.
36. Jiao Y., Widschwendter M., Teschendorff A. E. A systems-level integrative framework for genome-wide DNA methylation and gene expression data identifies differential gene expression modules under epigenetic control. *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P.2360-2366.
37. Moreira J.M.A., Gromov P., Celis J.E. Expression of the tumor suppressor protein 14-3-3 σ is down-regulated in invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol. Cell. Proteomics*. 2004. V. 3. P.410–419.
38. Chang T.-C. 14-3-3 σ regulates β -catenin-mediated mouse embryonic stem cell proliferation by sequestering GSK-3 β . *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e40193.
39. Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004. V. 64. P.3878-3884.
40. Wangsa D., Heselmeyer-Haddad K., Ried P., Eriksson E., Schäffer A.A., Morrison L.E., Luo J., Auer G., Munck-Wikland E., Ried T., Lundqvist E.A. Fluorescence in situ hybridization markers for prediction of cervical lymph node metastases. *Am. J. Pathol*. 2009. V. 175(6). P.2637-2645.
41. Кит О.И., Кутилин Д.С., Франциянц Е.М., Татимов М.З., Колесников Е.Н., Маслов А.А. Тест-система для прогнозирования развития метастазов у больных раком желудка на основании определения числа копий HV2 мтДНК. Патент на изобретение №2683571 (от 29.03.2019).
42. Кит О.И., Солдатова К.И., Колесников Е.Н., Кутилин Д.С. Способ прогнозирования развития метастазов в печени у больных раком толстой кишки. Патент на изобретение № 2686687 (от 30.04.2019).
43. Kuglik P., Smetana J., Vallova V., Moukova L., Kasikova K., Cvanova M., Brozova L. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014. V. 7(8). P.5071-5082.
44. Monteiro L.S., Diniz-Freitas M., Warnakulasuriya S., Garcia-Caballero T., Forteza-Vila J., Fraga M. Prognostic Significance of Cyclins A2, B1, D1, and E1 and CCND1 Numerical Aberrations in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018. V 2018. P.7253510.
45. Biewenga P., Buist M.R., Moerland P.D., Ver Loren van Themaat E., van Kampen A.H.C., ten Kate F.J.W., Baas F. Gene expression in early stage cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008. V.108. P.520-526.

46. Kim T.-J., Choi J.-J., Kim W.Y., Choi C.H., Lee J.-W., Bae D.-S., Son D.-S., Kim J., Park B.K., Ahn G., Cho E.Y., Kim B.-G. Gene expression profiling for the prediction of lymph node metastasis in patients with cervical cancer. *Cancer Sci.* 2008. V.99. P.31-38.
47. Wu Z.S., Ding W., Cai J., Bashir G., Li Y.Q., Wu S. Communication Of Cancer Cells And Lymphatic Vessels In Cancer: Focus On Bladder Cancer. *Onco Targets Ther.* 2019. V.12. P.8161-8177.
48. Seth Nanda C., Venkateswaran S.V., Patani N., Yuneva M. Defining a metabolic landscape of tumours: genome meets metabolism. *Br J Cancer.* 2020. V. 122(2). P.136-149.
49. Zhou Y., Huang Y., Cao X., Xu J., Zhang L., Wang J., Huang L., Huang S., Yuan L., Jia W., Yu X., Luo R., Zheng M. WNT2 Promotes Cervical Carcinoma Metastasis and Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS One.* 2016. V.11(8). P. e0160414.