

ОСОБЕННОСТИ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ В НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕВЫХ МЕТАСТАЗОВ ИЗ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Кечерюкова М.М., Снежко А.В., Вереникина Е.В., Меншенина 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

В настоящее время летальность от рака шейки матки (РШМ) превышает данный показатель от любых других гинекологических опухолей. Общая выживаемость пациенток с РШМ значительно снижается при наличии метастазов в лимфатических узлах. Больным с метастатическим поражением лимфатических узлов показана химиолучевая терапия, что делает первичное хирургическое вмешательство ненужным. Однако, так как пока невозможно точно и эффективно выявлять метастазы в лимфатических узлах, врачи-онкологи не могут определять стратегию лечения и избегать ненужных хирургических процедур. Это делает поиск молекулярно-генетических маркеров регионарного метастазирования актуальной задачей молекулярной онкологии. В качестве подобных маркеров может выступать показатель копийности генов (CNV). Поэтому целью исследования стал анализ особенностей копийности генов в нормальных клетках, в клетках первичной опухоли и в клетках опухолевых метастазов из лимфатических узлов у больных РШМ. Для исследования использовали срезы тканей из FFPE-блоков 50 пациенток с диагнозом РШМ и метастатическим поражением регионарных лимфоузлов. Клетки первичной опухоли, клетки опухолевых метастазов и нормальные клетки извлекали с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом. CNV 14 генов (*LAMP3, PRKAA1, TORC2, FOXO3, HDAC5, MEF2C, MLXIPL, EP300, HNF4A, TP53, SREBF1, SREBF2, PPARGC1A* и *CCND1*) определяли методом Real-Time qPCR. В ходе исследования зафиксированы статистически значимое увеличение копийности генов *LAMP3* и *TORC2*, снижение копийности *TP53* и *FOXO3* в клетках первичной опухоли. В клетках опухолевых метастазов из лимфатических узлов обнаружены статистически значимое увеличение копийности генов *CCND1* и *TORC2*, а также снижение копийности *PPARGC1A* и *TP53* относительно нормальных клеток шейки матки. Клетки первичной опухоли и метастазов отличались по CNV генов *CCND1, LAMP3, PPARGC1A* и *FOXO3*. Таким образом, был выявлен перечень генов, показатель копийности которых может иметь потенциал для диагностики первичной опухоли шейки матки, а также для диагностики ее метастазов в регионарные лимфатические узлы.

Ключевые слова: копийность генов, регионарное метастазирование, рак шейки матки, лазерная микродиссекция.

FEATURES OF GENES COPY NUMBER VARIATION IN NORMAL CELLS, PRIMARY TUMOR AND TUMOR METASTASES CELLS FROM THE LYMPH NODES IN PATIENTS WITH CERVICAL CANCER

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

Currently, the mortality rate from cervical cancer (CC) exceeds this figure in any other gynecological tumors. The overall survival of patients with cervical cancer is significantly reduced in the presence of metastases in the lymph nodes. For patients with lymph node metastases, chemoradiotherapy is indicated, making the initial surgical procedure unnecessary. However, since it is impossible to accurately and effectively detect lymph node metastases, oncologists cannot determine the treatment strategy and avoid unnecessary surgery. This makes the search for molecular markers of lymph node metastases an urgent task in molecular oncology. One of these markers may be the gene copy number variation (CNV). Therefore, the aim of the study was to analyze the characteristics of the copy number of genes in normal cells, cells of the primary tumor and cells of tumor metastases from the lymph nodes in patients with cervical cancer. For the study, tissue sections from FFPE blocks of 50 patients diagnosed with CC and metastatic lesions of regional lymph nodes were used. Primary tumor cells, tumor metastatic cells and normal cells were isolated by laser microdissection with non-contact capture. CNV 14 genes (*LAMP3, PRKAA1, TORC2, FOXO3, HDAC5, MEF2C, MLXIPL, EP300, HNF4A, TP53, SREBF1, SREBF2, PPARGC1A, and CCND1*) were determined by the Real-Time qPCR method. A statistically significant increase in the copy number of the *LAMP3* and *TORC2* genes and decrease in the CNV of *TP53* and *FOXO3* in the cells of the primary tumor were found. In cells of tumor metastases from lymph nodes, a statistically significant increase in the CNV

of *CCND1* and *TORC2* genes, as well as a decrease in the CNV of *PPARGC1A* and *TP53* relative to normal cells of the cervix, was found. Cells of primary tumor and metastases differed in CNV genes *CCND1*, *LAMP3*, *PPARGC1A* and *FOXO3*. Thus, a list of genes was identified, the copy number of which may have the potential for diagnosing a primary tumor of the cervix, as well as for diagnosing its metastases to regional lymph nodes.

Keywords: copy number variation of genetic loci, regional metastasis, cervical cancer, laser microdissection.

В мире ежегодно выявляют более 500 тыс. новых случаев рака шейки матки (РШМ) и более 260 тыс. летальных исходов при этой патологии, что превышает показатели при любых других гинекологических злокачественных опухолях. При выявлении РШМ на ранних стадиях общая выживаемость пациенток, как правило, достаточно высока, но при наличии метастазов в лимфатических узлах выживаемость снижается в 4 раза [1]. По существующим в настоящее время стандартам лечение ранних стадий опухолей шейки матки включает радикальную гистерэктомию в сочетании с лимфаденэктомией или химиолучевой терапией, при которых показатели выживаемости сходны. Химио- и лучевая терапия применяется для пациентов с метастазами в лимфатических узлах, при этом начальное хирургическое вмешательство не нужно. Однако, поскольку пока невозможно с высокой точностью и эффективностью определить наличие метастазов в тазовых и парааортальных лимфатических узлах, врачи-онкологи не могут определять стратегию лечения и избегать травмирующих операций [2]. Молекулярно-генетические маркеры как средство выявления метастазов в лимфатических узлах могут иметь важное терапевтическое значение. В качестве подобного маркера может выступать показатель копийности генетических локусов (CNV). CNV является критическим генетическим событием, способствующим формированию и прогрессированию (метастазированию) злокачественных новообразований [3, 4].

Амплификация генов или их фрагментов является распространенным механизмом активации онкогенов. При злокачественных опухолях шейки матки также часто наблюдается увеличение количества копий участков хромосом 1q, 3q и 5p [5]. Так, например, в исследовании D. Wangsa и соавторов [1] обнаружена амплификация ряда генов, расположенных в области 3q. Увеличение копийности участка 3q, по данным исследования с использованием сравнительной геномной гибридизации, было ассоциировано с метастатическим поражением лимфатических узлов. В этой работе также было установлено, что показатель копийности генов *LAMP3*, *PROX1* и *PRKAA1* позволяет статистически значимо прогнозировать метастазы в лимфатические узлы при РШМ [1].

Анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) и литературных источников [1, 2] позволил выделить ряд генов-кандидатов: *LAMP3*, *PRKAA1*, *TORC2*, *FOXO3*, *HDAC5*, *MEF2C*, *MLXIPL*, *EP300*, *HNF4A*, *TP53*, *SREBF1*, *SREBF2*, *PPARGC1A* и *CCND1*.

Целью исследования стал анализ показателей копийности генетических локусов *PRKAA1*, *LAMP3*, *SREBF1-2*, *TORC2*, *HNF4A*, *HDAC5*, *MEF2C*, *MLXIPL*, *FOXO3*, *EP300*, *TP53*,

PPARGC1A и *CCND1* в нормальных клетках, в первичных опухолевых клетках и в клетках опухолевых метастазов из лимфатических узлов у больных РШМ.

Материалы и методы исследования

Для проведения данного исследования в качестве исходного материала брали срезы тканей из FFPE-блоков 50 пациентов с диагнозом «рак шейки матки» и метастатическим поражением регионарных лимфоузлов. Срезы размером 3 мкм фиксировали на особых предметных стеклах, покрытых полиэтилен-нафталатной мембраной. Клетки опухоли, опухолевых метастазов и нормальных тканей выделяли со срезов с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом – использовалась система Palm MicroBeam производства Carl Zeiss. [6, 7]. Из извлеченных клеток методом фенол-хлороформной экстракции проведено выделение 150 образцов ДНК (50 образцов из клеток первичной опухоли, 50 образцов из клеток опухолевых метастазов и 50 образцов из клеток нормальных тканей).

Предварительно проведенный биоинформационный скрининг с использованием базы TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) позволил сформировать перечень, состоящий из 14 генов (*LAMP3*, *PRKAA1*, *TORC2*, *FOXO3*, *HDAC5*, *MEF2C*, *MLXIPL*, *EP300*, *HNF4A*, *TP53*, *SREBF1*, *SREBF2*, *PPARGC1A* и *CCND1*). Для последующего определения показателя относительной копийности генов методом Real-Time qPCR с использованием базы данных NCBI GenBank были разработаны последовательности 16 пар синтетических олигонуклеотидов, включая 2 пары для референсных локусов (*ACTB*, *GAPDH*) (табл. 1).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров для определения показателя копийности генов

№	Генетический локус	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
1.	<i>GAPDH</i>	CGCTGAACGGGAAGCTCACT	GCAGGTTTTTCTAGACGGCAGT
2.	<i>ACTB</i>	CCACCCTGAAGTACCCCATCG	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGA
3.	<i>LAMP3</i>	CTTCCTGTGATTGGGGCCAT	CCCCCGGGCAACAATTAGAT
4.	<i>PRKAA1</i>	CATGCGCAGACTCAGTTCCT	GTAGTGGCCGATCTTCACCC
5.	<i>TORC2</i>	GCTCTGACTCTGCCCTTCAT	TAGCAGGTACTTTGGGGTCC
6.	<i>FOXO3</i>	GGCCCCGGGATAACCAACTCT	CTCCACTTCGAGCGGAGAGA
7.	<i>HDAC5</i>	TCCCGTCCGTCTGTCTGTTA	TCGTTGGGAGAGTTCATGCC
8.	<i>TP53</i>	GGTCGGTGGGTTGGTAGTTT	GTGTGGGATGGGGTGAGATT
9.	<i>MEF2C</i>	GAAGCACTTCAACGCTGGAC	TGCACAGCTCAGTTCCTCAAA
10.	<i>MLXIPL</i>	AGCCTCTCTTCTCTCCCAGG	AAAGGCAGGCTCCGAATACC
11.	<i>EP300</i>	TCGGCGAATTTGTGCTCTTG	AGAGGGATGCGGACTCGATA
12.	<i>HNF4A</i>	CCCCCAGTCATTCTGGGAAC	GGATGAGGTTGGGTTGGAGG
13.	<i>SREBF1</i>	CCTCCATGGGGTCAGTTGTC	GACTTCTTGCAGGGAGACCC
14.	<i>SREBF2</i>	CACAGGCTCCAACCTCTGCAA	CTGGATGATCCTCGTCTGCG
15.	<i>PPARGC1A</i>	CCGAGAGTTTCCGTTCCCTT	AAGAGGGTGTCTTCCGACAG
16.	<i>CCND1</i>	TGAGGGACGCTTTGTCTGTC	GCCTTTGGCCTCTCGATACA

ПЦР-амплификация проводилась в термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США) для каждой пробы в трех технических повторах. Усредненные данные по каждому гену-мишени выравнивались по усредненному показателю референсных генов – величина ΔCt (т.е. $\Delta Ct = Ct_{\text{(среднее гена мишени)}} - Ct_{\text{(среднее геометрическое референсных генов)}}$). Относительную копиюность генетического локуса (rC) вычисляли по формуле $rC = \bar{E}^{-\Delta Ct}$, где \bar{E} – эффективность реакции амплификации, рассчитанная по формуле $\bar{E} = 10^{-1/k}$, где, в свою очередь, k – коэффициент из линейного уравнения $C(T) = k \cdot \log P_0 + b$, полученного путем аппроксимации экспериментальных данных ($\bar{E} = 1,971$). Далее определяли значение медианы $rC_{\text{оп1}}$ для опухолевых клеток (или для образцов из метастазов $rC_{\text{оп2}}$) и медианы $rC_{\text{н}}$ для образцов нормальных клеток по каждому локусу и вычисляли значение FC (fold change, кратность изменения) копиюности генетического локуса в опухолевых образцах по отношению к нормальным: $FC = rC_{\text{опухоль(1 или 2)}} / rC_{\text{норма}} = 1,971^{-\Delta Ct(\text{опухоль}1-2)} / 1,971^{-\Delta Ct(\text{норма})}$ [8].

Биоинформационный анализ данных выполняли с использованием языка программирования R. Критерий Колмогорова–Смирнова использовали, чтобы оценить нормальность распределения показателей. Значимость различий проверяли с использованием критерия Манна–Уитни и поправки Бонферрони (для учета множественного сравнения) [9]. Кластеризацию генетических локусов по выполняемой ими функции проводили с помощью стандартного алгоритма FMD (Functional module detection), основанного на методе k-ближайших соседей и Лувенском методе выделения сообщества тесно связанных генов в больших сетях. Значение Q для каждого члена подобной сети, связанного с функциональными модулями, рассчитывается с использованием критерия Фишера и поправки Бенджамини–Хохберга [6].

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе нашего исследования выявлены статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение показателя копиюности генетических локусов *LAMP3* и *TORC2* в 2,5 и 3,2 раза соответственно, а также уменьшение показателя копиюности генетических локусов *TP53* и *FOXO3* в 2,3 и 2,0 раза соответственно в клетках первичной опухоли относительно нормальных клеток шейки матки. Эффект одновременного изменения копиюности генов *LAMP3*, *TORC2*, *TP53* и *FOXO3* наблюдался у 60% выборки, а изменение копиюности генов *LAMP3* и *TP53* – у 80% выборки. В клетках регионарных метастазов зафиксированы статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение показателя копиюности локусов *CCND1* и *TORC2* в 2,0 и 3,5 раза соответственно, а также снижение копиюности гена *PPARGC1A* в 2,1 раза и гена *TP53* в 1,8 раза относительно нормальных клеток шейки матки (рис. 1).

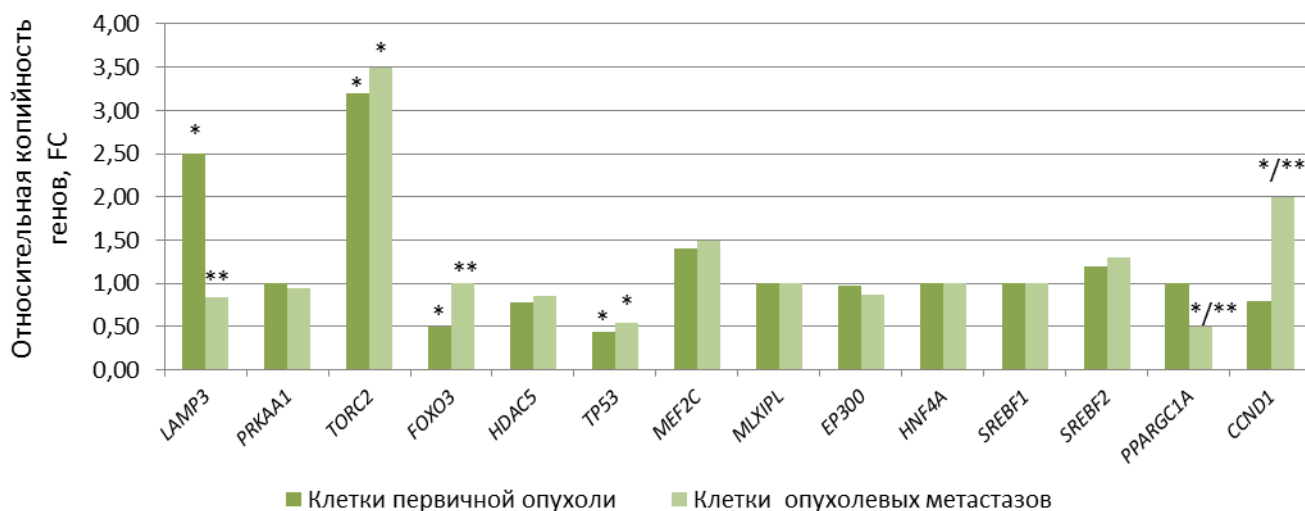


Рис. 1. Уровень относительной копийности генетических локусов в клетках первичной опухоли и опухолевых метастазов. * – статистически значимые отличия от копийности в нормальных клетках ($p < 0,05$), ** – статистически значимые отличия от копийности в клетках первичной опухоли ($p < 0,05$)

Эффект одновременного изменения копийности генов *CCND1*, *TORC2* и *PPARGC1A*, *TP53* наблюдался у 70% выборки, а изменение копийности генов *CCND1* и *TORC2* – у 85% выборки. Клетки первичной опухоли и метастазов отличались по копийности генов *CCND1* (в 2,5 раза ($p < 0,05$) выше в клетках метастазов), *LAMP3* (в 3,0 раза ($p < 0,05$) ниже в клетках метастазов), *PPARGC1A* (в 2,0 раза ($p < 0,05$) ниже в клетках метастазов) и *FOXO3* (в 2,0 раза ($p < 0,005$) выше в клетках метастазов). Статистически значимых отличий в копийности генов *PRKAA1*, *HDAC5*, *MEF2C*, *MLXIPL*, *EP300*, *HNF4A*, *SREBF1* и *SREBF2* между нормальными клетками, клетками первичной опухоли и клетками опухолевых метастазов из лимфатических узлов не обнаружено (рис. 1).

Использование алгоритма FMD (Functional module detection) позволило разделить перечень исследуемых генов на 3 функциональных модуля (кластера), связанных с регуляцией следующих ключевых сигнальных путей: клеточный ответ на уровни питательных веществ, клеточный ответ на внешний раздражитель, регуляция изменения конформации ДНК, гомеостаз анатомической структуры, регулирование стабильности белка и др. (рис. 2, табл. 2).

Таблица 2

Кластеризация генов по выполняемой функции или участию в сигнальных путях

Кластер/модуль	Сигнальный путь	Q value	Гены
M1	cellular response to extracellular stimulus	0.00013871	2
	starvation cellular response	0.00014058	
	nutrient levels cellular response	0.00015050	
	starvation response	0.00015751	

	nutrient levels response	0.00016011	
	response to extracellular stimulus	0.00016054	
	cellular response to external stimulus	0.00016700	
	response to organonitrogen compound	0.00066304	
M2	DNA conformation change	0.00110117	6
	anatomical structure homeostasis	0.00164874	
M3	intracellular receptor signaling pathway	0.00113906	5
	regulation of protein stability	0.00168551	

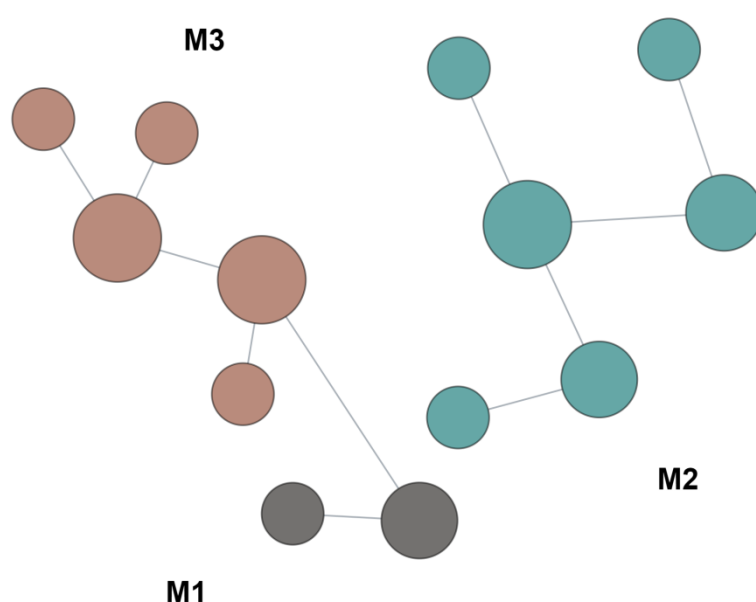


Рис. 2. Визуализации кластеризации генов по выполняемой функции или участию в сигнальных путях

Ген *LAMP3* (Lysosomal-associated membrane protein 3) кодирует гликопротеин лизосомальной мембраны из семейства белков LAMP, экспрессируется в лимфоидных органах и в дендритных клетках. Повышенная экспрессия данного гена наблюдается в клетках злокачественных опухолей пищевода, кишечника, желудка, груди и ряда других тканей [10].

TORC2 является коактиватором транскрипции для транскрипционного фактора CREB и центральным регулятором экспрессии глюконеогенных генов в ответ на цАМФ [11]. Считается, что *TORC2* управляет онкогенезом при различных видах рака [12].

Кодируемый геном *TP53* транскрипционный фактор регулирует клеточный цикл, выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей. Мутации в гене *TP53* обнаруживаются в клетках около 50% известных злокачественных опухолей [13].

Ген *FOXO3* кодирует белок из семейства факторов транскрипции Forkhead. Эти факторы транскрипции участвуют в регуляции сигнального пути PI3K. [14] *FOXO3* также является триггером апоптоза за счет активации генов, необходимых для гибели клеток, таких как *Bim* и *PUMA* [15], или подавления антиапоптотических белков, таких как *FLIP* [16]. Гопинатх и другие (2014) [17] показали участие *FOXO3* в регуляции сигнального пути Notch и самообновлении стволовых клеток. *FOXO3* участвует в онкогенезе [18]. Подавление активности *FOXO3* наблюдается при злокачественных опухолях (например, по увеличению активности Akt в результате потери PTEN).

Ген *PPARGC1A* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) является основным регулятором глюконеогенеза в печени, вызывающим повышенную экспрессию генов, участвующих в энергетическом метаболизме [19]. Этот ген также служит главным регулятором в митохондриальном биогенезе [20]. Кодируемый им белок обеспечивает прямую связь между внешними физиологическими стимулами и регуляцией митохондриального биогенеза. Подтверждено влияние этого белка на поляризацию макрофагов посредством STAT6/PPAR и ингибирование образования провоспалительных цитокинов [21].

Копийности генов можно рассматривать как показатель нестабильности генома, поэтому можно сказать, что в клетках опухолевых метастазов у больных РШМ нестабильность генома выражена столь же значительно, как и в клетках первичной опухоли этих больных, при этом в процесс опухолевой трансформации включаются несколько другие гены (рис. 1). Схожесть молекулярного профиля первичной и метастатической опухоли в данном случае можно попытаться объяснить общностью происхождения этих клеток, а отличия по копииности ряда генов – клональной эволюцией этих клеток, обеспечившей их выживание в области метастатических ниш.

Заключение

Таким образом, клетки первичной опухоли и опухолевые клетки метастазов из лимфатических узлов отличаются по уровню копииности генов от нормальных клеток шейки матки. Соответственно, показатель копииности генов *LAMP3*, *TORC2*, *TP53* и *FOXO3* может иметь потенциал для диагностики первичной опухоли шейки матки, а показатель копииности генов *LAMP3*, *FOXO3*, *CCND1* и *PPARGC1A* – для диагностики ее метастазов в регионарные лимфатические узлы.

Список литературы

1. 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
2. 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.
3. 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).
4. 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).
5. Kuglik P., Smetana J., Vallova V., Moukova L., Kasikova K., Cvanova M., Brozova L. Genome-wide screening of DNA copy number alterations in cervical carcinoma patients with CGH+SNP microarrays and HPV-FISH. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 2014. V. 7 (8). P. 5071-5082.
6. Кутилин Д.С., Цандекова М.Р., Порханова Н.В. Особенности копийности некоторых генов в опухолевых клетках у больных серозной аденокарциномой яичника // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170. № 9. С. 325-333.
7. 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.
8. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595.
9. Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Удаленкова И.А., Фаткина Н.Б., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Карнаухова Е.А., Крохмаль Ю.Н., Кутилин Д.С. Показатель копийности генов во внеклеточной ДНК плазмы крови как маркер для малоинвазивной оценки эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=30396> (дата обращения: 21.05.2021).
10. Tanaka T., Warner B.M., Odani T., Ji Y., Mo Y.Q., Nakamura H., Jang S.I., Yin H., Michael D.G., Hirata N., Suizu F., Ishigaki S., Oliveira F.R., Motta A.C.F., Ribeiro-Silva A., Rocha E.M., Atsumi T., Noguchi M., Chiorini J.A. LAMP3 induces apoptosis and autoantigen release in Sjögren's syndrome patients. *Sci Rep.* 2020. V. 10 (1). P. 15169.

11. Cheng A., Saltiel A.R. More TORC for the gluconeogenic engine. *BioEssays*. 2006. V. 28 (3). P. 231-234.
12. Rodón L., Svensson R.U., Wiater E., Chun M.G., Tsai W.W., Eichner L.J., Shaw R.J., Montminy M.. The CREB coactivator CRTC2 promotes oncogenesis in LKB1-mutant non-small cell lung cancer. *Science Advances*. 2019. V. 5 (7). P. eaaw6455.
13. Teng Z., Chen W., Yang D., Zhang Z., Zhu L., Wu F. Expression of p53 in ground-glass nodule of lung cancer and non-lung cancer patients. *Oncol Lett*. 2019. V. 17 (2). P. 1559-1564.
14. Zhang X., Jiang L., Liu H. Forkhead Box Protein O1: Functional Diversity and Post-Translational Modification, a New Therapeutic Target? *Drug Des Devel Ther*. 2021. V. 15. P. 1851-1860.
15. Ekoff M., Kaufmann T., Engström M., Motoyama N., Villunger A., Jönsson J.I., Strasser A., Nilsson G. The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells. *Blood*. 2007. V. 110 (9). P. 3209-3217.
16. Skurk C., Maatz H., Kim H.S., Yang J., Abid M.R., Aird W.C., Walsh K. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279 (2). P. 1513-1525.
17. Gopinath S.D., Webb A.E., Brunet A., Rando T.A. FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. *Stem Cell Reports*. 2014. V. 2 (4). P. 414-426.
18. Myatt S.S., Lam E.W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007. V. 7 (11). P. 847-859.
19. Klein M.A., Denu J.M. Biological and catalytic functions of sirtuin 6 as targets for small-molecule modulators. *Journal of Biological Chemistry*. 2020. V. 295 (32). P. 11021-11041.
20. Dorn G.W., Vega R.B., Kelly D.P. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes Dev*. 2015. V. 29 (19). P. 1981-1991.
21. Zago G., Saavedra P.H.V., Keshari K.R., Perry J.S.A. Immunometabolism of Tissue-Resident Macrophages - An Appraisal of the Current Knowledge and Cutting-Edge Methods and Technologies. *Front Immunol*. 2021. V. 12. P. 665782.