

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПАХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЯЗЫКА

Данилова А.Э., Максимов А.Ю., Снежко А.В., Енгибарян М.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: danilova_2022@rambler.ru

В настоящее время рак языка сохраняет лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости злокачественными опухолями головы и шеи и при этом имеет клинически непредсказуемый прогноз, дифференциальный для разных гистологических подтипов этого заболевания. Соответственно, выявление новых прогностических факторов является актуальным направлением исследований. К таким факторам относят транскриптомные характеристики опухолей, определяющие особенности патогенеза в каждом конкретном гистологическом подтипе. Поэтому целью исследования стало изучение профиля экспрессии генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка с применением биоинформационных и молекулярных подходов. На первом этапе был проведен биоинформационный анализ баз данных. Основной этап исследования был выполнен на 300 больных с местнораспространенными злокачественными опухолями языка. Методом количественной ПЦР в режиме реального времени определяли величины относительной экспрессии 23 генетических локусов, выявленных на этапе биоинформационного анализа. Обнаружено изменение экспрессии 14 генов (*MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *LAMC-2*, *MMP-3*, *ANX-A1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU*) в опухолевой ткани относительно нормальной, при этом профиль экспрессии имел значительную гетерогенность в ряду исследованных биологических образцов. Это позволило выделить из общей выборки пациентов 3 группы, отличающиеся по экспрессии генов. Эти группы соответствовали базалоидному, акантолитическому и обычному гистологическому подтипу. Таким образом, проведенное исследование позволило выявить ряд молекулярных маркеров плоскоклеточного рака языка, дифференциальных для 3 гистологических подтипов этого заболевания.

Ключевые слова: экспрессия генов, плоскоклеточный рак языка, гистологические подтипы, кластерный анализ.

GENE EXPRESSION PROFILE IN DIFFERENT HISTOLOGICAL SUBTYPES OF TONGUE SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Danilova A.E., Maksimov A.Yu., Snezhko A.V., Yengibaryan M.A.

National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: danilova_2022@rambler.ru

Currently, tongue cancer retains a leading position in the overall structure of head and neck malignant tumors incidence, and at the same time has a clinically unpredictable prognosis, differential for different histological subtypes of this disease. Accordingly, the identification of new prognostic factors is an important research area. These factors include the transcriptomic characteristics of tumors, which determine the features of pathogenesis in each specific histological subtype. Therefore, the aim of the research was to study the gene expression profile in various histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma using bioinformatic and molecular approaches. At the first stage, a bioinformatic analysis of databases was carried out. The main stage of the study was performed on 300 patients with locally advanced malignant tumors of the tongue. The values of the relative expression of 23 genetic loci identified at the stage of bioinformatics analysis were determined by real-time quantitative PCR. Changes in the expression of 14 genes (*MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *LAMC-2*, *MMP-3*, *ANX-A1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* and *CLU*) in tumor relatively normal tumor tissue, while the expression profile had significant heterogeneity in a number of biological samples studied. This made it possible to isolate 3 groups from the total sample of patients, differing in gene expression. These groups corresponded to the basaloid, acantholytic and usual histological subtypes. Thus, the study made it possible to identify a number of molecular markers of the tongue squamous cell carcinoma that are differential for 3 histological subtypes of this disease.

Keywords: gene expression, tongue squamous cell carcinoma, histological subtypes, cluster analysis.

Основную долю злокачественных новообразований полости рта занимают опухоли языка [1], которые сохраняют лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости и

смертности среди злокачественных опухолей головы и шеи (более 135 000 летальных случаев в 2021 году) [2]. Рак языка имеет клинически непредсказуемый прогноз, учитывая повышенную частоту скрытых метастазов у пациентов с небольшими первичными опухолями и отсутствием клинических признаков метастатического заболевания [3].

Гистопатологически наиболее частым вариантом является обычный тип плоскоклеточного рака языка (частота 54%) без казуистики. Вторым по частоте встречающимся гистопатологическим подтипом является акантолитический, диагностируется у 26% больных. Базалоидный подтип диагностируется в 13% случаев [4].

Выявление новых прогностических факторов является актуальным направлением исследований. Развитие и прогрессирование предраковых заболеваний языка обусловлено не только необратимыми изменениями в последовательности ДНК, но также и изменениями в экспрессии генов [5-8]. К таким факторам относят транскриптомные характеристики опухолей, определяющие особенности патогенеза в каждом конкретном гистологическом подтипе [9].

Поэтому целью исследования стало изучение особенностей транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка с применением биоинформационных и молекулярных подходов.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в 2019-2022 гг. В работе использовали биологический материал 300 пациентов с местнораспространенными злокачественными опухолями языка.

Для этого этапа исследования использовали интерактивный веб-сервер анализа данных по экспрессии мРНК 9736 опухолей и 8587 нормальных образцов из проектов TCGA и GTEx с применением стандартного конвейера обработки (GEPIA) [10].

Тотальную РНК выделяли и очищали с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits (QIAGEN) согласно протоколу производителя. Препараты РНК обрабатывали ДНКазой I для устранения следов геномной ДНК [11]. Для наработки кДНК готовили реакционный микс, содержащий рандомные праймеры, RT-буфер, dNTP, ингибитор РНКаз и MMLV-ревертазу. Проводили инкубацию при 44 °С в течение 1 часа, далее обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при 92 °С в течение 10 минут. Полученные препараты использовали для количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) [11].

Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии генов, выявленных на этапе биоинформационного анализа. При выборе референсного гена использовали алгоритм, описанный в работе [12]. В качестве референсных выбрали 2 гена: *GAPDH* и *ACTB*. ПЦР в реальном времени (в 3 технических повторах для каждого образца)

проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация при 94 °С в течение 2 мин.; 35 циклов: 10 с при 94 °С, 30 с при 56 °С, 30 с при 70 °С. Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле $RE = E^{-\Delta\Delta C_t}$, где E – эффективность амплификации, равная $10^{-1/k}$, где k – коэффициент из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \lg P_0 + b$, полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных [13].

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0. Для проведения кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) использовали скрипты на языке R. Нормальность распределения показателей оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$, для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенный биоинформационный анализ с использованием GEPIA [10] выделил 1488 генов, увеличивающих экспрессию, и 589 генов, снижающих экспрессию при плоскоклеточном раке языка. Из этих 2077 генов было выбрано 10 генетических локусов, наиболее сильно увеличивающих экспрессию, и 13 генетических локусов, наиболее сильно снижающих экспрессию в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка (табл.).

Генетические локусы с наибольшими отклонениями транскрипционной активности от нормы

Символ гена	Кратность отличий	Символ гена	Кратность отличий
Гиперэкспрессированные гены		Гипоэкспрессированные гены	
<i>MMP1</i>	6.2	<i>KRT13</i>	-6.4
<i>MMP11</i>	4.4	<i>SPRR3</i>	-5.6
<i>CA9</i>	4.3	<i>KRT4</i>	-9.1
<i>PTHLH</i>	4.1	<i>ANXA1</i>	-2.2
<i>MMP9</i>	4.0	<i>MT-ND6</i>	-1.2
<i>COL1A1</i>	4.0	<i>CNFN</i>	-2.8
<i>LAMC2</i>	3.8	<i>SLPI</i>	-1.1
<i>ISG15</i>	3.8	<i>CRNN</i>	-8.8
<i>MMP3</i>	3.8	<i>MAL</i>	-7.5
<i>SPP1</i>	3.7	<i>TGM3</i>	-6.8
		<i>IL1RN</i>	-2.2
		<i>CLU</i>	-2.5
		<i>CD24</i>	-1.5

Выявленные в ходе биоинформационного анализа аномальные показатели транскрипционной активности генетических локусов были валидированы на тканях 300 больных плоскоклеточным раком языка методом RT-qPCR.

Из 23 генетических локусов, выявленных в ходе биоинформационного анализа, только 14 изменяли свой транскрипционный профиль в опухолевой ткани относительно нормальной (рис. 1). Так, было обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение экспрессии

генов *MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTH1H*, *MMP-9*, *LAMC-2* и *MMP-3* в 4,8 раза, 2,4, 2,1, 4,0, 2,1, 2,0 и 3,5 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной языка. Также было выявлено статистически значимое ($p<0,005$) снижение экспрессии генов *ANXA-1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU* в 2,2 раза, 1,3, 5,2, 7,5, 2,2, 2,3 и 2,6 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной языка (рис. 1).

При анализе данных ПЦР была выявлена гетерогенность данных в ряду исследованных биологических образцов. Был проведен кластерный анализ, который позволил разделить общую выборку из 300 пациентов на 3 группы, отличающиеся по экспрессии генов: кластер 1 ($n=90$), кластер 2 ($n=101$) и кластер 3 ($n=109$).

У пациентов кластера 1 в опухолевой ткани языка была повышена транскрипция *MMP-1*, *CA-9*, *PTH1H* и *ISG-15* в 2,2 раза ($p<0,005$), 2,1 раза ($p<0,001$), 8,8 раза ($p<0,001$) и 6,9 раза ($p<0,05$) соответственно, и снижена транскрипция *ANXA-1*, *MT-ND6* и *MAL* в 6,5 раза ($p<0,005$), 5,9 раза ($p<0,001$) и 9,8 раза ($p<0,005$) соответственно относительно нормальной ткани (рис. 2).

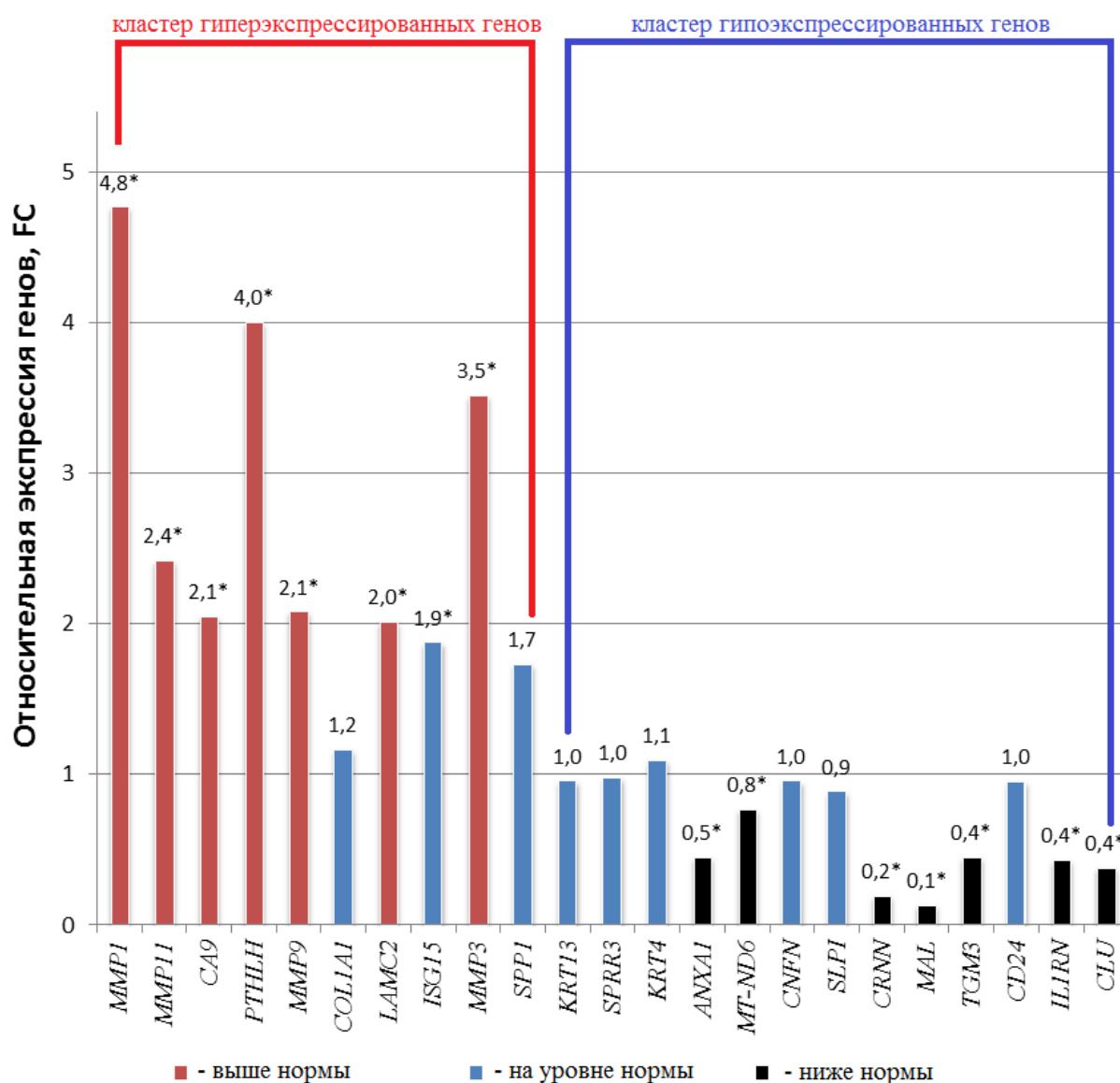


Рис. 1. Относительная экспрессия 23 генов в опухолевой ткани больных плоскоклеточным раком языка. * - статистически значимые отличия от нормальной ткани языка ($p < 0,005$)

У пациентов кластера 2 в опухолевой ткани языка была повышена транскрипция *MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *COL1A1*, *LAMC-2*, *MMP-3* и *SPP-1* в 4,8 раза ($p < 0,05$), 2,4 раза ($p < 0,001$), 2,4 раза ($p < 0,01$), 4,0 раза ($p < 0,05$), 2,1 раза ($p < 0,005$), 3,2 раза ($p < 0,005$), 3,5 раза ($p < 0,001$) и 2,7 раза ($p < 0,05$) соответственно, и снижена транскрипция *KRT-13*, *SPRR-3*, *KRT-4*, *ANXA-1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU* в 6,4 раза ($p < 0,005$), 5,6 раза ($p < 0,001$), 9,2 раза ($p < 0,005$), 1,3 раза ($p < 0,05$), 2,9 раза ($p < 0,05$), 8,9 раза ($p < 0,005$), 7,6 раза ($p < 0,005$), 6,8 раза ($p < 0,05$), 2,3 раза ($p < 0,05$) и 2,6 раза ($p < 0,01$) соответственно относительно нормальной ткани (рис. 2).

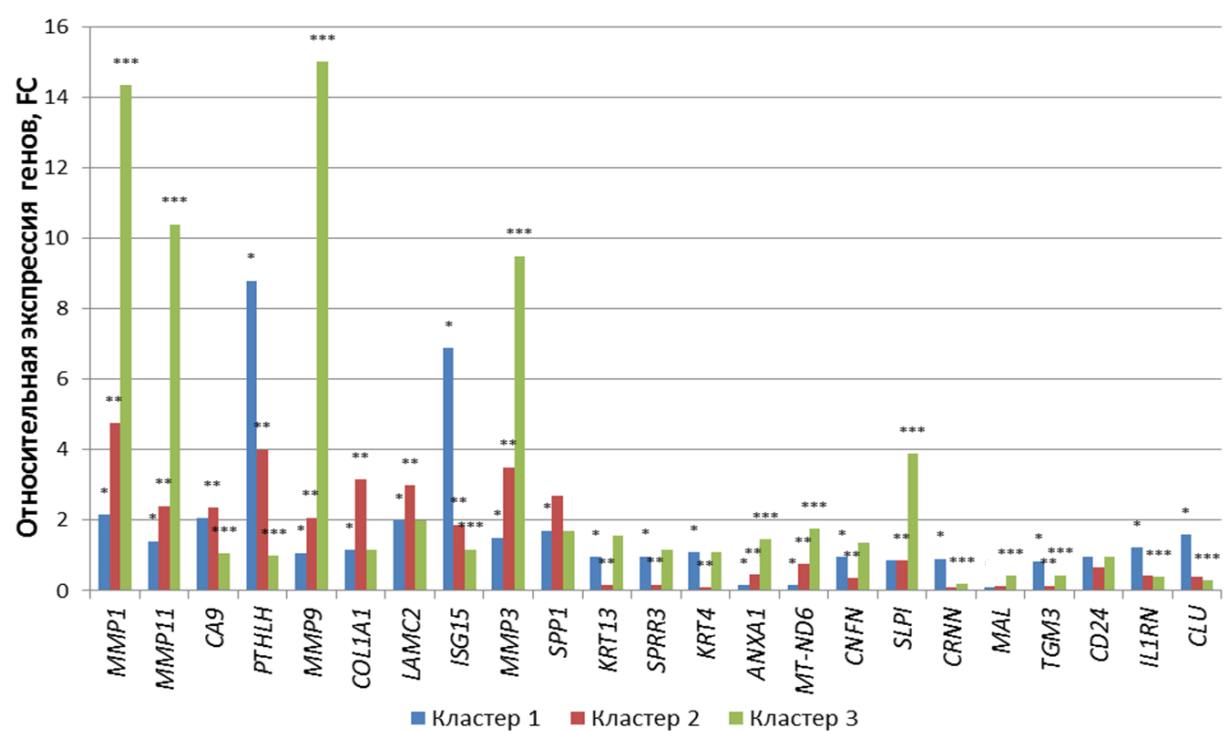
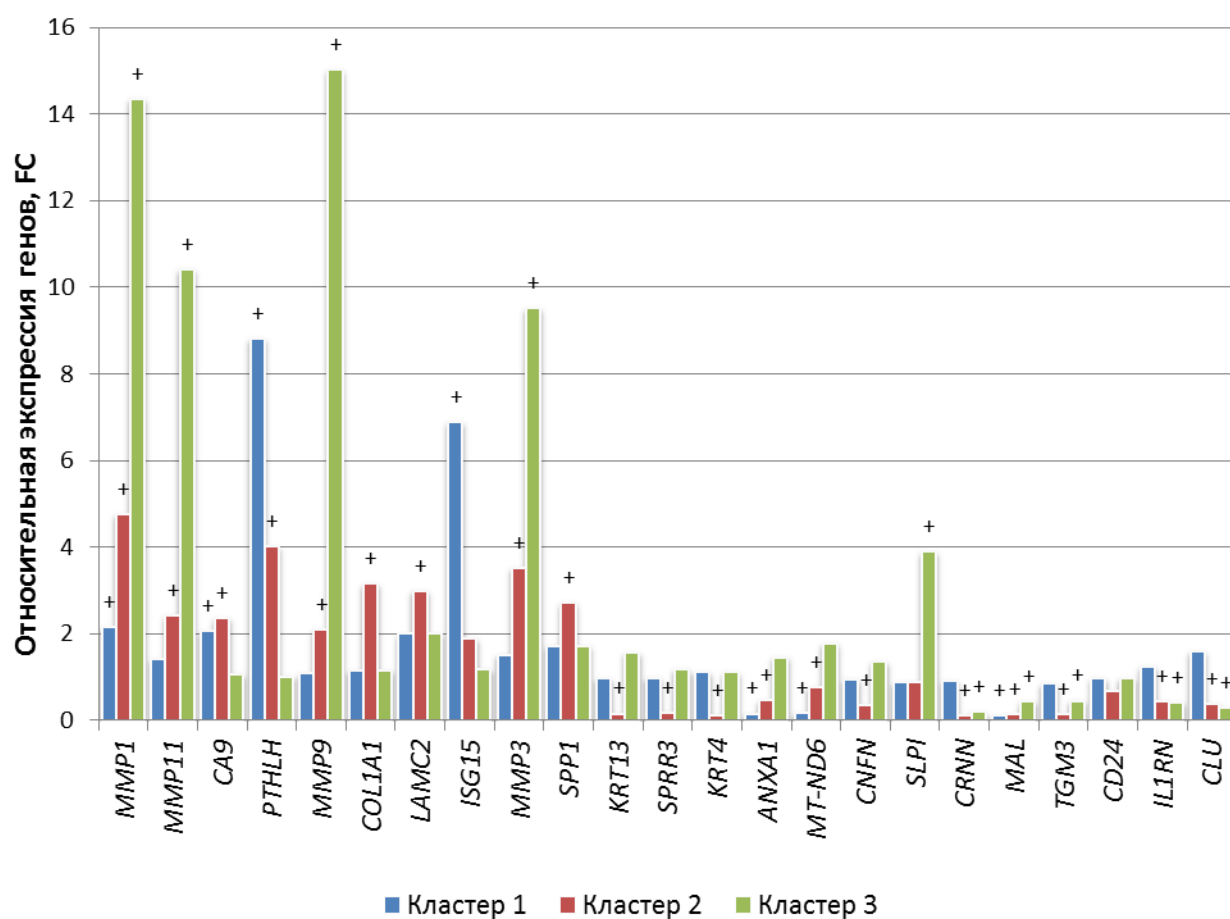


Рис. 2. Транскрипция 23 генетических локусов в операционном материале в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка. + - статистически значимые отличия относительно нормальной ткани ($p < 0,0005$); * - статистически значимые отличия относительно кластера 2 ($p < 0,001$); ** - статистически значимые отличия относительно

кластера 3 ($p < 0,001$); *** - статистически значимые отличия относительно кластера 1 ($p < 0,005$)

У пациентов кластера 3 в опухолевой ткани языка была обнаружена повышенная транскрипция генов *MMP-1*, *MMP-11*, *MMP-9*, *MMP-3* и *SLPI* в 14,4 раза ($p < 0,005$), 10,4 раза ($p < 0,001$), 15,0 раза ($p < 0,001$), 9,5 раза ($p < 0,005$) и 3,9 раза ($p < 0,05$) соответственно, и снижена транскрипция генов *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU* в 5,2 раза ($p < 0,05$), 2,3 раза ($p < 0,01$), 2,2 раза ($p < 0,05$), 2,5 раза ($p < 0,05$) и 3,5 раза ($p < 0,01$) соответственно относительно нормальной ткани (рис. 2).

Между кластерами выявлено наличие дифференциальной экспрессии рассматриваемых генетических локусов. Так, в кластерах 1 и 2 статистически значимо ($p < 0,001$) отличается экспрессия *MMP-1*, *MMP-11*, *PTHLH*, *MMP-9* и *COL1-A1* в 2,2, 1,7, 2,2, 1,9 и 2,7 раза соответственно, а также экспрессия *LAMC-2*, *ISG-15*, *MMP-3*, *SPPI*, *KRT-13* и *SPRR-3* в 1,5, 3,7, 2,3, 1,6, 6,1 и 5,5 раза соответственно и генов *KR-T4*, *ANX-A1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU* в 10,2, 3,0, 4,5, 2,7, 8,1, 5,8, 2,8 и 4,1 раза соответственно. Между кластерами 2 и 3 статистически значимо ($p < 0,001$) отличается экспрессия генов *MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *COL1-A1*, *LAMC-2*, *ISG-15*, *MMP-3*, *KRT-13*, *SPRR-3*, *KRT-4*, *ANXA-1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *SLPI* и *TGM3* в 3,0, 4,3, 2,2, 4,0, 7,2, 2,7, 1,5, 1,6, 2,7, 10,0, 6,6, 10,2, 3,2, 2,3, 3,9, 4,4 и 3,0 раза соответственно.

Между кластерами 1 и 3 статистически значимо ($p < 0,001$) отличается экспрессия генов *MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *ISG-15*, *MMP-3*, *ANX-A1*, *MT-ND6*, *SLPI*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU* в 6,7, 7,4, 1,9, 8,7, 13,9, 5,8, 6,3, 9,5, 10,4, 4,4, 4,7, 4,2, 1,9, 3,0 и 5,6 раза соответственно.

Выявленная при валидации данных биоинформационного анализа дифференциальная экспрессия 14 генов в опухолевой и нормальной ткани языка (*MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *LAMC-2*, *MMP-3*, *ANX-A1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU*) приводит к изменению ключевых сигнальных каскадов, ответственных за развитие кожи, дифференцировку клеток эпидермиса, метаболизм коллагена, чувствительность к УФ и активность металлопептидаз. Развитие рака языка представляет собой сложный многоэтапный процесс, в ходе которого генетические события в путях передачи сигналов, управляющих нормальной клеточной физиологией, изменяются количественно или качественно. В нормальных тканях языка клетки эпителия жестко контролируются различными сигнальными путями, регулирующими деление, дифференцировку и старение клеток. Сигнальные пути кератиноцитов могут быть разнообразными и одновременно содержать одни и те же ключевые функциональные элементы [15].

Стремительное развитие технологии полногеномного секвенирования и баз данных TCGA и GEO позволило создать мощные ресурсы для выявления биомаркеров ранней диагностики, стратификации пациентов, а также мишеней для персонализированной терапии [16]. Так, в работе Zhang H. и коллег [17] был проведен биоинформационный анализ базы данных GEO и выявлено 1752 дифференциально экспрессирующихся гена, из которых 1050 было гиперэкспрессировано и 702 гипоекспрессировано. Эти гены в основном были задействованы в регуляции клеточной пролиферации, адгезии и апоптоза. Результаты нашего биоинформационного анализа с использованием GEPIA несколько отличаются от данных Zhang H. и соавторов [17]. Нами выявлено 2077 дифференциально экспрессирующихся генов, из которых 1488 генов, увеличивающих экспрессию, и 589 генов, снижающих экспрессию при плоскоклеточном раке языка относительно нормальной ткани.

К тому же в нашем исследовании выявлены 3 транскрипционных кластера в образцах рака языка. Проведенный гистологический анализ позволил сопоставить эти кластеры и гистологические подтипы плоскоклеточного рака языка. Так, кластер 1 соответствовал базалоидному подтипу рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP-1*, *CA-9*, *PTHLH* и *ISG-15* и сниженной экспрессией генов *ANX-A1*, *MT-ND6* и *MAL* относительно нормальной ткани. Кластер 2 соответствовал акантолитическому подтипу рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*, *PTHLH*, *MMP-9*, *COL1-A1*, *LAMC-2*, *MMP-3* и *SPP-1* и сниженной экспрессией генов *KRT-13*, *SPRR-3*, *KRT-4*, *ANX-A1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM-3*, *IL1RN* и *CLU* относительно нормальной ткани. Часть выявленных дифференциально экспрессирующихся генов в кластере 2 совпадала с таковыми в кластере 1: *MMP-1*, *CA-9*, *PTHLH* (гиперэкспрессия) и *ANX-A1*, *MT-ND6*, *MAL* (гипоекспрессия). Отличия в перечне дифференциально экспрессирующихся генов (*MMP-11*, *MMP-9*, *COL1-A1*, *LAMC-2*, *ISG-15*, *MMP-3*, *SPP-1*, *KRT-13*, *SPRR-3* и других) в двух группах пациентов, очевидно, обеспечивают различия в гистологии и течении акантолитического и базалоидного подтипа рака языка. Кластер 3 соответствовал обычному типу плоскоклеточного рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP-1*, *MMP-11*, *MMP-9*, *MMP-3*, *SLPI* и сниженной экспрессией генов *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*. По количеству дифференциально экспрессирующихся генов этот подтип (10 генов) занимает промежуточное место между базалоидным подтипом (7 генов) и акантолитическим подтипом (20 генов). При этом направления изменения экспрессии 2 генетических локусов (*MMP-1*, *MAL*) совпадают во всех 3 группах.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило установить как общие для всех подтипов плоскоклеточного языка паттерны экспрессии генов (*MMP-1*, *MMP-11*, *CA-9*,

PTHLH, MMP-9, LAMC-2, MMP-3, ANX-A1, MT-ND6, CRNN, MAL, TGM-3, IL1RN), так и уникальные транскрипционные особенности каждого гистологического подтипа. Данные особенности могут обеспечивать различное клиническое течение и ответ на терапию этих заболеваний.

Список литературы

1. Льянова А.А., Владимирова Л.Ю., Франциянц Е.М., Кутилин Д.С., Енгибарян М.А. Молекулярные основы современной таргетной терапии плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта моноклональными антителами // Злокачественные опухоли. 2017. № 7 (4). С. 77-87.
2. GBD 2019 Cancer Risk Factors Collaborators. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010-19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet. 2022. V. 400 (10352). P. 563-591.
3. Byers R.M., El-Naggar A.K., Lee Y.Y., Rao B., Fornage B., Terry N.H., Sample D., Hankins P., Smith T.L., Wolf P.J. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue. Head Neck. 1998. V. 20 (2). P. 138-144.
4. Ion Ciucă Mărășescu F.I., Marasescu P.C., Matei M., Florescu A.M., Margaritescu C., Petrescu S.M.S., Dumitrescu C.I. Epidemiological and Histopathological Aspects of Tongue Squamous Cell Carcinomas-Retrospective Study. Curr Health Sci J. 2018. V. 44 (3). P. 211-224.
5. Lingen M.W., Pinto A., Mendes R.A., Franchini R., Czerninski R., Tilakaratne W.M. et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: Current status and future research. Oral Dis. 2011. V. 17 (1). P. 7-22.
6. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 2002. V. 3. P. 415-428.
7. Kyrgidis A., Tzellos T.G., Triaridis S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. J. Carcinog. 2010. V. 9. P. 3.
8. Khan S.S., Kamboj M., Verma R., Kumar M. Epigenetics in oral cancer- neoteric biomarker. J Oral Med Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol. 2016. V. 2. P. 62-65.
9. Владимирова Л.Ю., Льянова А.А., Франциянц Е.М., Кутилин Д.С., Енгибарян М.А. Молекулярные механизмы резистентности к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта // Злокачественные опухоли. 2018. № 4. С. 13-25.

10. Tang Z., Li Ch., Kang B., Gao G., Li C., Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*. 2017. V. 45 (W1). P. W98-W102.
11. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Габричидзе П.Н., Донцов В.А., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Солнцева А.А., Крохмаль Ю.Н. Аберрантная транскрипционная активность генов как фактор радиорезистентности клеток линии НТ-29 // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29831> (дата обращения: 28.10.2022).
12. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002. V. 3 (7). P. 1-12.
13. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // *Молекулярная биология*. 2020. № 54 (4). С. 580-595.
14. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести // *Успехи молекулярной онкологии*. 2020. № 7 (2). С. 30-44.
15. Shah S., Pathak P., Gulati N. Cell signaling pathways in oral cancer: A review. *Journal of Applied Dental and Medical Sciences*. 2015. V. 1 (1). P. 69-75.
16. Liu J., Lichtenberg T., Hoadley K.A., Poisson L.M., Lazar A.J., Cherniack A.D. et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell*. 2018. V. 173 (2). P. 400-416. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.052.
17. Zhang H., Liu J., Fu X., Yang A. Identification of Key Genes and Pathways in Tongue Squamous Cell Carcinoma Using Bioinformatics Analysis. *Med Sci Monit*. 2017. V. 23. P. 5924-5932.