

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ К ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Н. Н. Цаплина¹, Д. С. Кутилин², Н. Б. Фатькина², М. А. Гусарева², Н. В. Порханова³

¹ ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России

³ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. Во всем мире по заболеваемости рак шейки матки (РШМ) занимает 4-е место среди онкологических заболеваний у женщин. В стандарты лечения ранней стадии РШМ входит радикальная гистерэктомия и/или лучевая терапия (ЛТ), а местнораспространенные формы рака подвергаются ЛТ, иной раз в сочетании с химиотерапией. При ЛТ полный клинический ответ достигается лишь у части пациенток, что обусловлено формированием радиорезистентности опухолевых клеток. К настоящему времени выявлен значительный перечень маркеров для предсказания ответа на ЛТ, однако ни один из них пока не вошел в клиническую практику.

Цель исследования. Биоинформационный и лабораторный скрининг молекулярных маркеров для малоинвазивного определения чувствительности рака шейки матки (РШМ) к лучевой терапии (ЛТ).

Материалы и методы. Исследование выполнено на 300 больных РШМ (IВ1, IВ2, IIА1, опухоль < 4 см) и 30 донорах без онкопатологии. Для идентификации потенциальных маркеров проводился анализ базы данных The Cancer Genome Atlas, для получения данных использовали пакет TCGABiolinks языка R. Для идентификации областей генома, размер которых значительно изменялся в ряде образцов опухолей, применяли алгоритм GISTIC. Для валидации данных биоинформационного анализа использовали срезы тканей из FFPE-блоков и плазму крови пациенток. Выявленные на биоинформационном этапе маркеры валидировали методом Real-Time-PCR в образцах ДНК, выделенной из опухолевых и нормальных клеток, а также в образцах внеклеточной ДНК. Опухолевые и нормальные клетки из тканей шейки матки выделяли с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом. Дистанционная ЛТ выполнялась на линейном ускорителе Varian TrueBeam в режиме VMAT/IMRT (СОД 50 Гр). Для оценки различий показателя копийности генов применяли критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты. Анализ результатов ЛТ позволил разделить пациенток на две группы — чувствительных к ЛТ ($n = 170$, группа 1) и резистентных ($n = 130$, группа 2). На этапе биоинформационного анализа был выделен ряд генов, изменяющих копийность и ассоциированных с чувствительностью к ЛТ, — ERBB2, BIRC2, TRPC6, YAP1, MIR569, LRRC31, SPRED3, MIR4456, CYP1A, -A2, CYP11A1, MIR4786, TIGD1, GPX4, ST14, LINC00167, LINC00558, LINC00400, FOXO1, ENOX1, EPST11, NEK5, KCTD4, SERP2, MIR621, PTEN, SOD2, MIR3939, ATM, CASP-1, -4, -5, CHEK1 и H2AFX. Показатель копийности этих генов был проанализирован в ДНК опухолевых и нормальных клеток тканей шейки матки. У пациенток группы 1 обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) копийности H2AFX, ATM, CHEK1, LINC00400 и увеличение ($p < 0,05$) копийности генов CASP-1, -4, -5, CYP1-A1, -A2 и GPX4 в опухолевых клетках относительно этих показателей в нормальных клетках. У пациенток группы 2 обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) копийности генов CASP-4, -5, CYP1A1, YAP1 и увеличение копийности ($p < 0,05$) H2AFX, CHEK1, ERBB2 и BIRC2 в опухолевых клетках относительно этих показателей в нормальных клетках. Копийность генов H2AFX, CHEK1, ERBB2, LINC00400, CASP-4, -5 и CYP1A1 статистически значимо ($p < 0,005$) отличалась в опухолевых клетках у двух групп больных РШМ. Показатель копийности генетических локусов H2AFX, CHEK1, LINC00400, CASP-1, -4, -5, CYP1-A1, -A2, GPX4, YAP1, ERBB2 и BIRC2 далее был проанализирован во внДНК. В группе 1 обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) копийности H2AFX, CHEK1, LINC00400 и увеличение ($p < 0,05$) копийности CASP-4, -5, CYP1-A1, -A2 и GPX4. В группе 2 обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) копийности CASP-4, -5, CYP1-A1 и YAP1 и увеличение копийности ($p < 0,05$) H2AFX, CHEK1, ERBB2 и BIRC2 относительно этих показателей у доноров без онкопатологии. Копийность генов H2AFX, CHEK1, ERBB2, BIRC2, LINC00400, CASP-4, -5 и CYP1A1 статистически значимо ($p < 0,005$) отличалась в двух группах больных РШМ.

Заключение. Выявленные с помощью комбинации биоинформационных и молекулярно-генетических подходов маркеры — показатель копийности H2AFX, CHEK1, ERBB2, BIRC2, LINC00400, CASP4, CASP5 и CYP1A1 во внДНК — могут стать основой малоинвазивного определения чувствительности РШМ к ЛТ.

Ключевые слова: рак шейки матки, копийность генов, лучевая терапия, внеклеточная ДНК

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF THE SENSITIVITY OF MALIGNANT TUMORS OF THE CERVIX TO RADIATION THERAPY

N. N. Tsaplina¹, D. S. Kutilin², N. B. Fatkina², M. A. Gusareva², N. V. Porkhanova³

¹ State Budgetary Healthcare Institution "Clinical Oncological Dispensary № 1"
of the Ministry of Healthcare of Krasnodar Region

² Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Oncology"
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kuban State Medical University"
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Introduction. Cervical cancer is the fourth most commonly occurring cancer in women globally. Treatment standards of early stage cervical cancer include radical hysterectomy and/or radiation therapy (RT), while for locally advanced cancers, radiation therapy, sometimes in combination with chemotherapy are the standard-of-care treatment. Complete clinical response after radiation therapy is achieved only in a fraction of patients, which is due to the development of tumor cell radioresistance. Thus far, a considerable number of markers for the prediction of response to radiation therapy has been identified, however, none of them has entered clinical practice yet.

Objective of the study — is bioinformatics and laboratory screening of molecular markers for minimally invasive testing of cervical cancer sensitivity to radiation therapy.

Materials and Methods. The study was conducted on 300 patients with cervical cancer (IB1, IB2, IIA1, tumor < 4 cm) and 30 donors who had no oncologic disease. The Cancer Genome Atlas database was analyzed to identify potential markers, and the TCGABiolinks R language package was used to obtain the data. The GISTIC algorithm was used to identify regions of the genome, whose size changed significantly in a number of tumor samples. To validate the data of bioinformatics analysis, tissue sections from FFPE-blocks and blood plasma of patients were used. The markers detected at the bioinformatics stage were validated using Real-Time-PCR in DNA samples isolated from tumor and normal cells, as well as in extracellular DNA samples. Tumor and normal cells were isolated from cervical tissue using non-contact laser capture microdissection. Linear accelerator Varian TrueBeam was used to deliver external beam radiation therapy in VMAT/IMRT mode (total focal dose of 50 Gy). Mann-Whitney U test with Bonferroni correction was used to assess the differences in gene copy-number.

Results. Analysis of the results of radiation therapy allowed to divide patients into 2 groups — sensitive to radiation therapy (n = 170, group 1) and resistant (n = 130, group 2). A number of genes associated with copy-number change and sensitivity to radiation therapy were identified at the stage of bioinformatics analysis — ERBB2, BIRC2, TRPC6, YAP1, MIR569, LRRC31, SPRED3, MIR4456, CYP-1A, A2, CYP11A1, MIR4786, TIGD1, GPX4, ST14, LINC00167, LINC00558, LINC00400, FOXO1, ENOX1, EPSTI1, NEK5, KCTD4, SERP2, MIR621, PTEN, SOD2, MIR3939, ATM, CASP-1, -4, -5, CHEK1, and H2AFX. Copy-number variants of these genes were analyzed in the DNA of tumor and normal cells of cervical tissues. Patients in group 1 exhibited a decrease (p < 0.05) in H2AFX, ATM, CHEK1, LINC00400 gene copy-number and an increase (p < 0.05) in CASP-1, -4, -5, CYP1-A1, -A2, and GPX4 gene copy-number in tumor cells, as compared to those copy-number variants in normal cells. A decrease (p < 0.05) in CASP-4, -5, CYP1A1, YAP1 gene copy-number and an increase (p < 0.05) in H2AFX, CHEK1, ERBB2 and BIRC2 gene copy-number in tumor cells, as compared to those variants in normal cells were observed in group 2 patients. The difference between H2AFX, CHEK1, ERBB2, LINC00400, CASP-4, -5, and CYP1A1 gene copy-number variants in tumor cells of two groups of the patients with cervical cancer was statistically significant (p < 0.05). H2AFX, CHEK1, LINC00400, CASP-1, -4, -5, CYP1-A1, -A2, GPX4, YAP1, ERBB2 and BIRC2 genetic loci copy-number was further analyzed in cfDNA. A decrease (p < 0.05) in H2AFX, CHEK1, LINC00400 gene copy-number and an increase (p < 0.05) in CASP-4, -5, CYP1-A1, -A2 and GPX4 gene copy-number were found in group 1. Group 2 exhibited a decrease (p < 0.05) in CASP-4, -5, CYP1-A1 and YAP1 gene copy-number and an increase (p < 0.05) in H2AFX, CHEK1, ERBB2 and BIRC2 gene copy-number variants, as compared to those copy-number variants in donors who had no oncologic disease. The difference between H2AFX, CHEK1, ERBB2, BIRC2, LINC00400, CASP-4, -5, and CYP1A1 gene copy-number variants in tumor cells of two groups of patients with cervical cancer was statistically significant (p < 0.05).

Conclusion. Markers, identified by a combination of bioinformatics and molecular genetic approaches — which are indicators of H2AFX, CHEK1, ERBB2, BIRC2, LINC00400, CASP4, CASP5 and CYP1A1 copy-number variation in cfDNA — can become a basis of minimally-invasive determination of cervical cancer sensitivity to radiation therapy.

Keywords: cervical cancer, gene copy-number, radiation therapy, cell-free DNA

Введение

Во всем мире по заболеваемости рак шейки матки (РШМ) занимает 4-е место среди онкологической патологии у женщин [1,2]. Ежегодно регистрируют более 500 000 новых случаев рака шейки матки и 260 000 смертей от него, что превышает показатели любой другой гинекологической патологии [2–4].

В стандарты лечения ранней стадии РШМ входит радикальная гистерэктомия и/или лучевая терапия (ЛТ), а местнораспространенные формы рака лечатся только ЛТ [5]. Поражение раковых клеток достигается путем облучения высокой дозой энергии в диапазоне от 40 до 85 Гр, в зависимости от размера опухоли и границы расстояния от непораженной ткани [6]. По рекомендациям FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), больным РШМ IB1, IB2 и IIA1 (опухоль размером < 4 см) при невозможности проведения хирургического этапа лечения по соматическим показаниям или по желанию пациентки рекомендовано проводить самостоятельную химио-лучевую терапию (ХЛТ): ДЛТ в суммарной дозе 50 Гр одновременно с химиотерапией (ХТ, еженедельно ≥ 5 циклов цисплатина в РД 40 мг/м²) или самостоятельно, без ХТ [7].

Несмотря на широкое применение лучевой терапии в клинической практике, эффективность при лечении рака шейки матки, по мнению ряда исследователей, является спорным. Так, показано, что операция и лучевая терапия при раке шейки матки связаны с одинаковыми показателями выживаемости у пациенток на ранней стадии, но лучевая терапия имеет более низкий уровень тяжелых осложнений. Также показано, что ответ на лучевую терапию может варьироваться в зависимости от различных клинических характеристик пациенток и молекулярных характеристик ткани опухоли [4].

Была исследована связь между микроРНК и устойчивостью к ЛТ у больных раком шейки матки [8]. По оценкам авторов, 60 % больных РШМ получают лучевую терапию в качестве стандартного лечения, однако около половины из них приобретают резистентность к ЛТ, и это является основным фактором, способствующим неэффективности лечения и, соот-

ветственно, развитию рецидивов. Имеющиеся данные показывают, что некоторые микроРНК тесно коррелируют с радиорезистентностью при РШМ. Так, исследование Zhang et al. (2013) показало, что 14 микроРНК (miR-1246, 1290, 137, 150*, 3138, 3663–3p, 371–5p, 3926, 4271, 4327, 572, 584, 630, 765) были гиперэкспрессированы и 6 микроРНК (miR-BHRF1–1, 1271, 15b*, 19b-1*, 378*, 95) были гипорэкспрессированы в клеточных линиях радиорезистентного рака шейки матки [9]. Авторы идентифицировали сигнатуру экспрессии miRNAs (miR-630, 1246, 1290, 3138), которая связана с повышенной радиорезистентностью при раке шейки матки. miR-630 взаимодействует с инсулиноподобным рецептором фактора роста, регулируя прогрессирование рака [10].

Таким образом, при ЛТ РШМ, как и в случае с другими нозологиями, полный клинический ответ достигается лишь у части пациентов, в то время как у другой части формируется радиорезистентность опухолевых клеток [11, 12]. К настоящему времени выявлен значительный перечень маркеров для предсказания ответа на ЛТ, однако ни один из них пока не вошел в клиническую практику [8].

Поэтому **целью исследования** стал биоинформационный и лабораторный скрининг молекулярных маркеров для малоинвазивного определения чувствительности РШМ к ЛТ.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 300 больных раком шейки матки (IB1, IB2, IIA1, опухоль < 4 см) и 30 донорах без онкопатологии. Средний возраст пациенток составлял $59,1 \pm 7,6$ года. Дистанционная ЛТ (ДЛТ) выполнялась на линейном ускорителе Varian TrueBeam в режиме VMAT или IMRT (РОД 2 Гр до СОД 50 Гр). На фоне дистанционной лучевой терапии проводилось еженедельное введение цисплатина в РД 40 мг/м² от 4 до 6 введений (в зависимости от переносимости и показателей ОАК, биохимического анализа крови). После этого пациентки получали курс внутрисполостной брахитерапии на аппарате Multisource HDR в РОД 6,5–7 Гр до СОД 35–40 Гр по изоэффекту (EQD2). Таким образом, достигались суммарные дозы на первичный очаг шейки матки 85–90 Гр (EQD2).

Первым этапом работы явился биоинформационный анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). На втором этапе для высококачественной дифференцировки опухолевых и нормальных клеток шейки матки использовали подход, основанный на лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом. Определение относительной копийности генетических локусов в нормальных и опухолевых клетках шейки матки проводили методом Real-Time qPCR.

Биоинформационный анализ данных. Ключевым этапом исследования стал биоинформационный анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://portal.gdc.cancer.gov/>). Для получения данных из Genomic Data Commons Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) использовали пакет TCGABiolinks языка R v.4.0.0 в оболочке Rstudio. Для идентификации областей генома, размер которых значительно изменялся в ряде образцов опухолей шейки матки, применяли алгоритм GISTIC [13].

Лазерная микродиссекция с бесконтактным захватом. Материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded)-блоков 300 пациенток. Срезы, полученные на микротоме, фиксировались на предметных стеклах с PEN-мембраной (PolyethyleneNaphthalatемемbrane). Выделение и разделение опухолевых и нормальных клеток яичников осуществляли с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия) [14].

Определение показателя относительной копийности генов в опухолевых и нормальных клетках. Из клеток, извлеченных путем лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом, методом фенол-хлороформной экстракции было выделено 600 образцов ДНК (300 из опухолевых и 300 из нормальных клеток). Полученная ДНК использовалась для определения относительной копийности генов методом ПЦР в режиме реального времени (Real-Time qPCR). Для осуществления этого подхода предварительно, с использованием базы данных NCBI GenBank, были сконструированы последовательности 37 пар синтетических оли-

гонуклеотидов (праймеров), включая пары для референсных локусов (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*).

Список генов, выбранных в ходе биоинформационного анализа, включал 34 локуса (*ERBB2*, *BIRC2*, *TRPC6*, *YAP1*, *MIR569*, *LRRC31*, *SPRED3*, *MIR4456*, *CYP-1A*, *-A2*, *CYP11A1*, *MIR4786*, *TIGD1*, *GPX4*, *ST14*, *LINC00167*, *LINC00558*, *LINC00400*, *FOXO1*, *ENOX1*, *EPST11*, *NEK5*, *KCTD4*, *SERP2*, *MIR621*, *PTEN*, *SOD2*, *MIR3939*, *ATM*, *CASP-1*, *-4*, *-5*, *CHEK1* и *H2AFX*). Количественная ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем EvaGreen®Dye (Biotium, США) проводилась на термоциклере Bio-Rad CFX96.

Аmplификация каждого образца осуществлялась в трех технических повторах. При этом усредненные данные по каждому генетическому локусу нормализовались относительно усредненного показателя референсных генов:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{(среднее гена мишени)}} - C(t)_{\text{(среднее геометрическое 3 референсных генов)}} \cdot$$

Копийность гена (rCN) вычисляли по формуле $rC = E^{-\Delta C(t)}$, где E — эффективность реакции амплификации, рассчитанная по формуле $E = 10^{-1/h}$, где h — коэффициент уравнения $C(t) = h \cdot \log P_0 + b$, полученный путем линейной аппроксимации экспериментальных данных ($E = 2,0$).

Далее вычисляли медиану $rC_{\text{оп}}$ для образцов опухолевых клеток и медиану $rCN_{\text{н}}$ для образцов нормальных клеток по каждому генетическому локусу и рассчитывали кратность изменения (fold change, FC) копийности генов в опухолевых образцах по отношению к нормальным: $FC = rCN_{\text{опухоль}} / rCN_{\text{норма}} = E^{-\Delta C(t)_{\text{опухоль}}} / E^{-\Delta C(t)_{\text{норма}}}$ [15].

Статистический анализ. Статистический и биоинформационный анализ данных выполняли в Statistica 10.0 (StatSoft, США) и Rstudio (v4.0.1). Для проверки распределения признаков на соответствие закону нормального распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для оценки различий значений количественных показателей применяли t -критерий Стьюдента (для нормального распределения) или непараметрический U -критерий Манна-Уитни (для распределения отклоняющегося

от нормального). Для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Критерий Краскела-Уоллиса использовали для оценки различий между тремя и более независимыми группами. Для разделения генов по функциональным модулям использовали алгоритм FMD (Functional module detection), основанный на методе k -ближайших соседей (k -nearest neighbors algorithm, KNN) и методе определения множества Лувена для кластеризации тесно связанных генетических локусов в отдельные модули, которые подвергаются процедуре функционального обогащения. Результатом выполнения алгоритма является графическое представление сигнальных путей, в которых участвуют гены, по сходным признакам объединенные в кластеры, а также результирующее значение Q . Значение Q каждого члена функционального модуля рассчитывается с использованием одностороннего точного критерия Фишера и поправки Бенджамини-Хохберга для корректировки множественного сравнения [16].

Результаты исследования и обсуждение

Анализ данных проекта TCGA. Показатель числа копий генов (CNV, copy number variation) — полиморфизм, приводящий к изменению копийности определенного генетического локуса и, как следствие, изменению экспрессии этого гена и его продукта — белка или некодирующей РНК [17]. В настоящее время накоплены значительные объемы данных о копийности генов в клетках опухолей, в том числе при раке шейки матки. Чтобы подобрать перечень потенциальных молекулярных маркеров для диагностики чувствительности этих опухолей к ЛТ, мы использовали данные проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), которые были извлечены с портала Genomic Data Commons. Портал содержит информацию о мутациях, метилировании ДНК, транскриптом, экспрессии микро-РНК и копийности генов в образцах тканей (опухоль, здоровая ткань, клетки крови) более чем

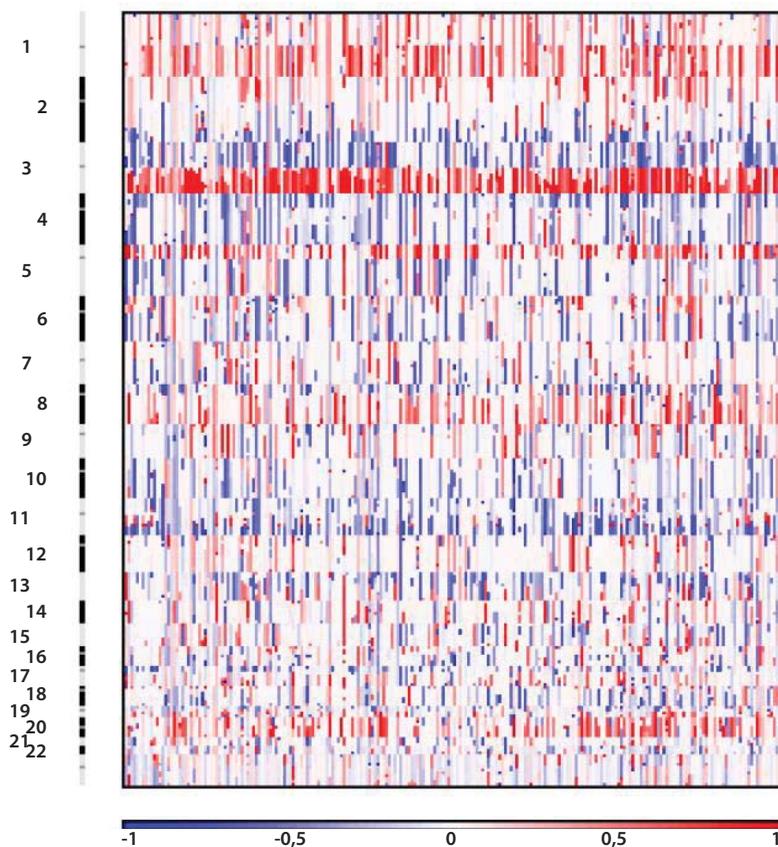


Рис. 1. Геномное положение участков с амплификациями и делециями

14 тыс. больных 38-ю видами онкологических заболеваний, в том числе 295 больных РШМ, для которых были доступны данные по копияности генов в образцах опухоли и прилегающей здоровой ткани, и данные по проведенной терапии.

Результаты анализа копияности генов с помощью алгоритма GISTIC2. GISTIC идентифицирует области генома, размер которых значительно увеличивается или уменьшается в ряде образцов опухолей. Конвейер сначала фильтрует нормальные образцы из сегментированных данных по копияности, проверяя коды TCGA, и затем выполняется GISTIC 2.0.22.

В этом анализе было использовано 295 образцов опухолей и было обнаружено 25 значимых результатов на уровне фрагментов хромосом, 26 значительных очаговых амплификации и 37 значительных очаговых делеций.

На рисунке 1 показано геномное положение участков с амплификациями и делециями.

Наиболее значимые изменения копияности генов обнаружены в следующих участках хромосом: 1) увеличение копияности 11q22.1, 3q26.31, 17q12, 20q11.21, 8q24.21, 19q13.13, 9p24.1, 5p15.33, 13q22.1, 17q25.1, 1q21.3, Xq28,

16p13.13, 11q13.3, 6p21.33, 15q26.1, 7p11.2, 2q33.1, 13q34, 1p31.3, 11p12, 21q22.13, 2p24.3, 19p13.2, 4q12 и 19p13.3; 2) снижение копияности 2q37.1, 2q22.1, 19p13.3, 11q25, 13q14.2, 4q35.2, 10q23.31, 3p14.2, 20p12.1, 6q26, 11q23.3, 5q12.1, 15q21.1, 16q23.1, 17q25.3, 1p36.23, 14q32.31, 22q13.32, 7q34, 18q21.2, 4q22.1, Xq21.33, 13q12.11, 1p13.2, 8p23.1, 16q11.2, Xp11.3, 11p15.1, 17p12, 19q13.33, 4q21.3, 6p24.2, 4p16.3, 8p23.3, 21q11.2, 5q35.2 и 3p22.1.

В итоге было зарегистрировано изменение копияности 4350 генетических локусов. Данные гены были распределены по функциональным модулям с использованием алгоритма FMD (рис. 2 и 3).

Была проведена фильтрация сигнальных путей для генов, снизивших копияность, и выбраны только те локусы и регулируемые ими сигнальные каскады, которые могут быть ассоциированы с устойчивостью к лучевой терапии: регуляция продукции интерлейкинов, клеточного ответа на облучение, клеточного ответа на стимулы внешней среды, регуляция убиквитинирования белка, активация иммунного ответа, апоптотическая фрагментация ДНК, регуляция активности фосфатидилинозитол-3-киназы,

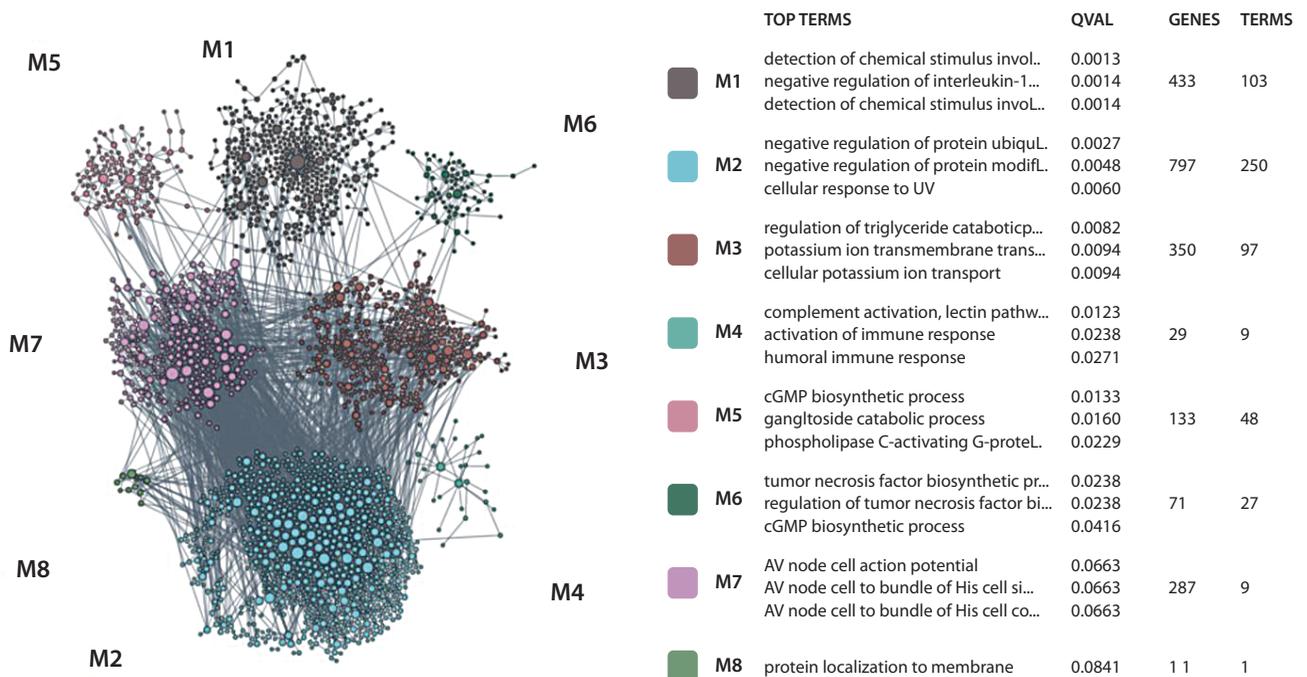


Рис. 2. Распределение снизивших копияность генов по функциональным модулям с использованием алгоритма FMD (а) и ключевые сигнальные пути, в которых они задействованы (б)

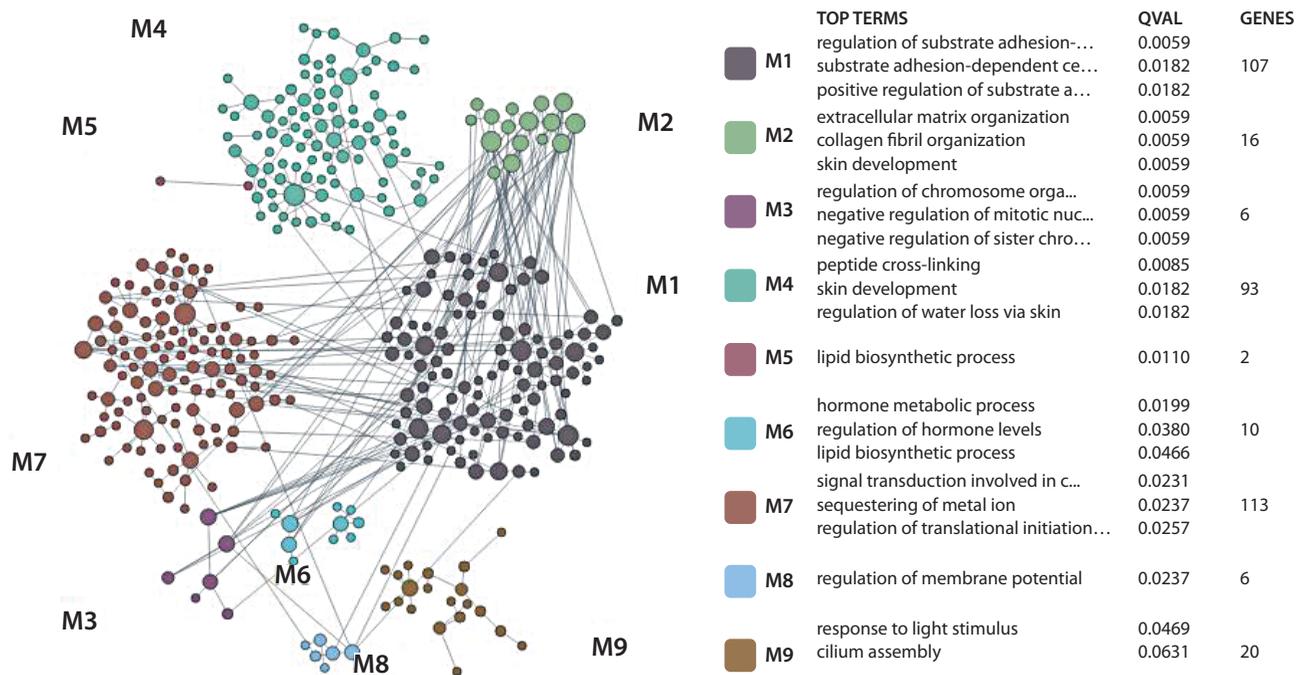


Рис. 3. Распределение увеличивших копийность генов по функциональным модулям с использованием алгоритма FMD (а) и ключевые сигнальные пути, в которых они задействованы (б)

репарация межнитевых поперечных связей ДНК.

Аналогичная фильтрация была выполнена для генов с повышенной копийностью относительно нормальной ткани. Были идентифицированы следующие сигнальные пути: регуляция распространения клеток, зависящего от адгезии к субстрату, клеточное деление, реорганизация внеклеточного матрикса, регуляция организации хромосом, регуляция митотического деления, водный гомеостаз многоклеточных организмов, регуляция уровня гормонов, передача сигналов регуляции контрольных точек клеточного цикла, реакция на ионизирующее излучение.

Таким образом, из более чем 4000 генов были выбраны 34 локуса, с наибольшей вероятностью ассоциированные с чувствительностью к лучевой терапии: *ERBB2, BIRC2, TRPC6, YAP1, MIR569, LRRC31, SPRED3, MIR4456, CYP-1A, CYP-A2, CYP11A1, MIR4786, TIGD1, GPX4, ST14, LINC00167, LINC00558, LINC00400, FOXO1, ENOX1, EPST11, NEK5, KCTD4, SERP2, MIR621, PTEN, SOD2, MIR3939, ATM, CASP-1, CASP-4, CASP-5, CHEK1* и *H2AFX*.

Анализ копийности генов с помощью ПЦР в опухолевых клетках.

Анализ результатов ЛТ позволил разделить 300 пациенток на две группы: чувствительных к ЛТ ($n = 170$, группа 1) и резистентных ($n = 130$, группа 2). Выявленный на этапе биоинформационного анализа паттерн генов — *ERBB2, BIRC2, TRPC6, YAP1, MIR569, LRRC31, SPRED3, MIR4456, CYP-1A, -A2, CYP11A1, MIR4786, TIGD1, GPX4, ST14, LINC00167, LINC00558, LINC00400, FOXO1, ENOX1, EPST11, NEK5, KCTD4, SERP2, MIR621, PTEN, SOD2, MIR3939, ATM, CASP-1, -4, -5, CHEK1* и *H2AFX* — был валидирован методом ПЦР на ДНК из опухолевых и нормальных клеток тканей шейки матки. У пациенток группы 1 обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение копийности генов *H2AFX, ATM, CHEK1, LINC00400* в 2, 2,5, в 1,7, 4,5 раза и увеличение копийности генов *CASP-1, -4, -5, CYP1-A1, -A2* и *GPX4* в 1,8, 2,5, 2, 2,7, 2,1 и 2,6 раза соответственно в опухолевых клетках относительно этих показателей в нормальных клетках (рис. 4). У пациенток группы 2 обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение копийности генов *CASP4, CASP5,*

CYP1A1, *YAP1* в 3,3, 1,7, 1,4, 2 раза и увеличение копийности генов *H2AFX*, *CHEK1*, *ERBB2* и *BIRC2* в 3,5, 3,2, 2,8 и 3,4 раза соответственно в опухолевых клетках относительно этих показателей в нормальных клетках шейки матки (рис. 4).

Копийность генов *H2AFX*, *CHEK1*, *ERBB2*, *LINC00400*, *CASP-4*, *-5* и *CYP1A1* статистически значимо ($p < 0,005$) отличалась в опухолевых клетках у двух групп больных РШМ. Так, копийность гена *H2AFX* в 7 раз была выше в опухолевых клетках в группе пациенток, резистентных к ЛТ, гена *CHEK1* в 5,3 раза выше, гена *ERBB2* в 2,3 раза выше, *LINC00400* в 6,8 раза выше, а *CASP-4* в 8,3 раза ниже, *CASP-5* в 3,3 раза выше и *CYP1A1* в 3,9 раза ниже, чем в опухолевых клетках в группе пациенток, чувствительных к ЛТ (рис. 4).

Анализ копийности генов во внеклеточной ДНК (внДНК) плазмы крови. Для разработки эффективных малоинвазивных методов определения чувствительности РШМ к ЛТ необходим скрининг молекулярных маркеров внДНК плазмы крови. В качестве таких маркеров большим потенциалом обладает показатель числа копий генов (CNV). Данный показатель обладает достаточной стабильностью во внеклеточных средах организма человека, в том числе в плазме крови [18]. ВнДНК плазмы крови может происходить из ядерной и митохондриальной ДНК соматических или опухолевых клеток, подвергшихся апоптозу; из ДНК клеток крови, вирусной и бактериальной ДНК [19]. Проведенный анализ позволил выделить ряд генов, показатель CNV которых имеет потенциал для малоинвазивной диагностики чувствительности РШМ

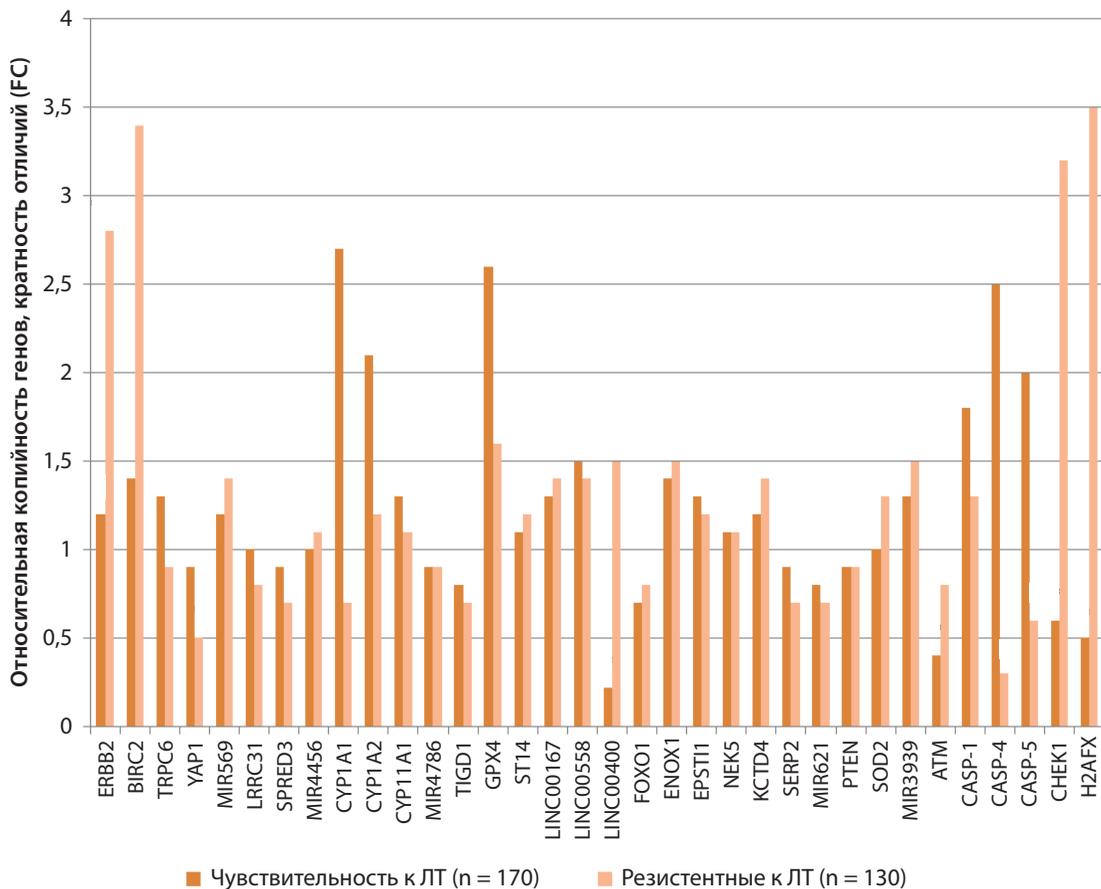


Рис. 4. Особенности копийности генетических локусов в опухолевых клетках шейки матки относительно нормальных клеток:

* — статистически значимые отличия от нормальных клеток;

** — статистически значимые отличия между копийностью генов в опухолевых клетках пациенток, резистентных к ЛТ, и копийностью генов в опухолевых клетках пациенток, чувствительных к ЛТ

к ЛТ. Показатель копийности генетических локусов *H2AFX*, *CHEK1*, *LINC00400*, *CASP-1*, *-4*, *-5*, *CYP1-A1*, *-A2*, *GPX4*, *YAP1*, *ERBB2* и *BIRC2* далее был проанализирован во вДНК плазмы крови пациенток, чувствительных и резистентных к ЛТ.

В группе 1 обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) копийности *H2AFX*, *CHEK1*, *LINC00400* в 1,7, 2,5, 2,5 раза и увеличение ($p < 0,05$) копийности *CASP-4*, *-5*, *CYP1-A1*, *-A2* и *GPX4* в 2,8, 3, 2,3, 2,2 и 2 раза соответственно. В группе 2 обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) копийности *CASP-4*, *CASP-5*, *CYP1-A1*, *YAP1* в 2,0, 2, 3,3, 2 раза и увеличение копийности ($p < 0,05$) *H2AFX*, *CHEK1*, *ERBB2* и *BIRC2* в 3,8, 3,6, 2,2 и 3 раза соответственно относительно этих показателей у доноров без онкопатологии. Копийность генов *H2AFX*, *CHEK1*, *ERBB2*, *BIRC2*, *LINC00400*, *CASP-4*, *-5* и *CYP1-A1* статистически значимо ($p < 0,005$) отличалась в двух группах больных РШМ. Так,

копийность *H2AFX*, *CHEK1*, *ERBB2*, *BIRC2*, *LINC00400* была выше в группе пациенток, резистентных к ЛТ, в 6,3, 9, 1,8, 2,1, 3,8 раза соответственно, а копийность *CASP-4*, *-5* и *CYP1-A1* была в 5,6, 6,0 и 7,7 раза ниже, чем в группе пациенток чувствительных к ЛТ (рис. 5).

Возможным эффектом, опосредованным изменением копийности этих генов, может быть изменение последовательности событий, необходимых для репарации двунитевых разрывов ДНК. Ионизирующее излучение, воздействуя на клетку, приводит к индукции двуцепочечных разрывов ДНК, после чего должна запускаться цепь событий, направленных на элиминацию этих структурных аномалий. Известно, что для этого хроматин должен быть деконденсирован (ремоделирован), так как конденсированный эукариотический хроматин представляет преграду для многих биологических процессов, связанных с присоединением ферментов к определенным локусам ДНК [20].

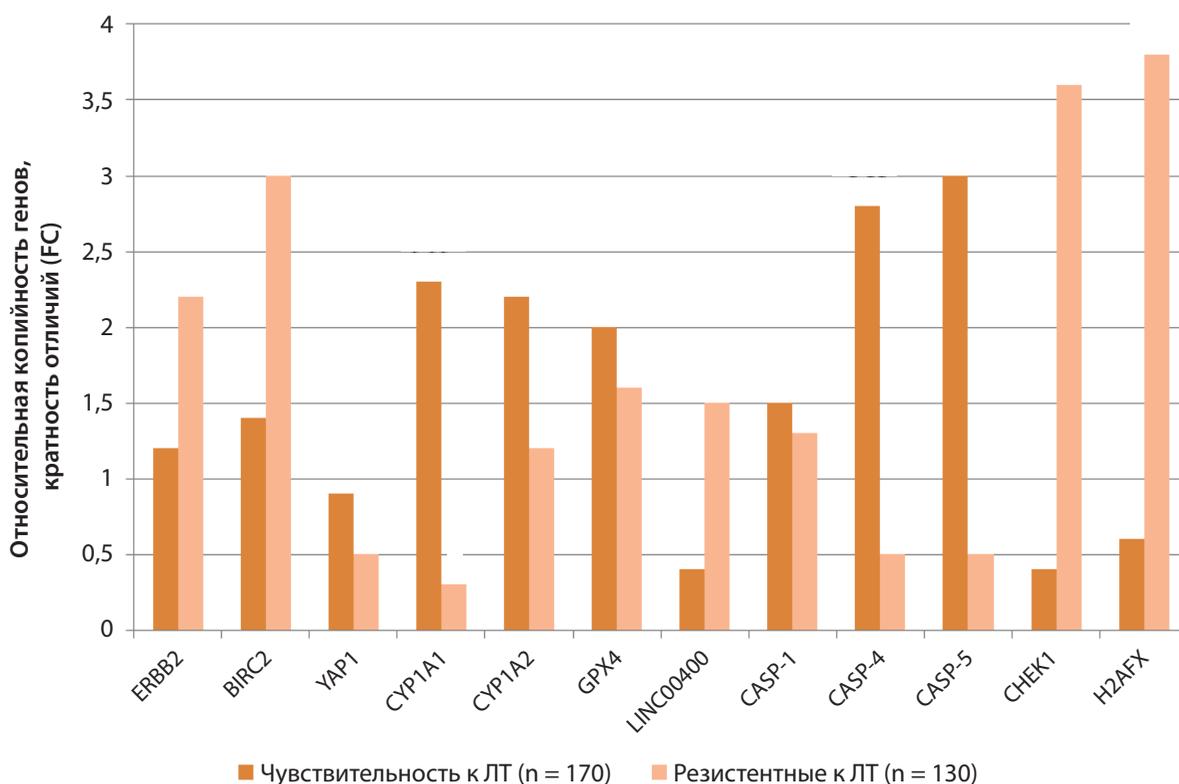


Рис. 5. Особенности копийности генетических локусов во вДНК плазмы крови:

* — статистически значимые отличия от копийности во вДНК условно-здоровых доноров;

** — статистически значимые отличия между копийностью генов во вДНК пациенток, резистентных к ЛТ, и копийностью генов во вДНК пациенток, чувствительных к ЛТ

В одном из ключевых этапов этого процесса и задействован ген *H2AFX* (*H2AX*, H2A histone family member X), кодирующий гистоновый белок, который в ответ на ионизирующее излучение фосфорилируется по серину и переходит в модифицированную форму γ H2AX. Из-за этого хроматин становится менее конденсированным, и белковые комплексы, необходимые для осуществления процесса репарации ДНК, могут к нему присоединиться [21].

Повреждение ДНК вызывает активацию *CHK1*, что способствует инициации реакции контрольных точек клеточного цикла. Реакция на повреждение ДНК представляет собой сеть сигнальных путей, которая приводит к активации контрольных точек, репарации ДНК и апоптозу, чтобы препятствовать выживанию поврежденных клеток. Белок Chk1, кодируемый геном *CHK1*, регулируется ATR посредством фосфорилирования, образуя сигнальный путь ATR-Chk1. Этот комплекс распознает одноцепочечную ДНК, которая может быть результатом повреждения, вызванного излучением [21]. Регуляторные белки, такие как белок репликации А, Claspin, Tim/Tipin, Rad 17, TopBP1, могут участвовать в активации Chk1. Активация Chk1 также может быть ATR-независимой за счет взаимодействия с другими протеинкиназами, такими как РКВ/АКТ, MAPKAPK и p90/RSK [22].

Chk1 взаимодействует со многими нижестоящими эффекторами, вызывая остановку клеточного цикла. В ответ на повреждение ДНК Chk1 в первую очередь фосфорилирует Cdc25, что приводит к его протеасомной деградации [21]. Деградация оказывает ингибирующее действие на образование циклинзависимых киназных комплексов, которые являются ключевыми факторами клеточного цикла [23].

Chk1 играет центральную роль в координации ответа на повреждение ДНК и, следовательно, представляет большой интерес для онкологии и разработки противоопухолевой терапии [24]. Было показано, что Chk1 сверхэкспрессируется во многих опухолях, включая рак молочной железы, толстой кишки, печени, желудка и носоглотки. Существует положительная корреляция с экспрессией Chk1, степе-

нью опухоли и рецидивом заболевания, что позволяет предположить, что Chk1 может способствовать росту опухоли [22].

Chk1 необходим для выживания клеток и благодаря высоким уровням экспрессии в опухолях может индуцировать пролиферацию опухолевых клеток. Опухолевые клетки с повышенным уровнем Chk1 приобретают преимущества в плане выживания благодаря способности переносить более высокий уровень повреждения ДНК. Следовательно, Chk1 может способствовать резистентности к ЛТ и химиотерапии [25].

Клеточные сигнальные пути, регулирующие апоптоз, также вовлечены в формирование чувствительности к ЛТ. Так, белок, кодируемый геном *BIRC2*(*cIAP1*), является членом семейства белков, ингибирующих апоптоз путем связывания с факторами, ассоциированными с рецептором фактора некроза опухоли, *TRAF1* и *TRAF2*, а также путем вмешательства в активацию ICE-подобных протеаз. Этот многофункциональный белок регулирует не только каспазы и апоптоз, но также модулирует воспалительные сигнальные пути и иммунитет, клеточную пролиферацию, клеточную инвазию и метастазирование. Он действует как убиквитин-протеинлигаза E3, регулирующая передачу сигналов NF-каппа-B, и регулирует как каноническую, так и неканоническую передачу сигналов NF-каппа-B, действуя в противоположных направлениях: как положительный регулятор канонического пути и как подавляющий конститутивную активацию (неканоническая передача сигналов NF-каппа-B). Его мишенями являются *RIPK1*, *RIPK2*, *RIPK3*, *RIPK4*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *TRAF2*, *DIABLO/SMAC*, *MAP3K14/NIK*, *MAP3K5/ASK1*, *IKBKG/NEMO*, *IKBKE* и *MXD1/MAD1* [26].

Каспазы 4 и 5, кодируемые генами *CASP-4/-5* соответственно, представляют собой ферменты, которые протеолитически расщепляют другие белки по остатку аспарагиновой кислоты и принадлежат к семейству цистеиновых протеаз. Функции каспазы 4 и 5 до конца не известны, но считается, что они являются воспалительными каспазами и наряду с каспазой 1 играют важную роль в иммунной системе [27].

По данным GeneCards (<https://www.genecards.org/>), LINC00400 (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 400) представляет собой ген длинной, не кодирующей белок РНК (lncRNA). Публикации, описывающие функции этой РНК, не многочисленны. В 2019 г. в работе Yuan W. и соавторов было показано, что LINC00400 играет важную роль в развитии и прогрессировании колоректального рака (КРР). Был проведен анализ экспрессии LINC00400 с соседними генами, кодирующими белки. Результаты показали, что LINC00400 не экспрессировалась совместно ни с одним из соседних белковых генов, что указывает на то, что она не имеет цисрегуляторной функции и не участвует непосредственно в регуляции транскрипционного или посттранскрипционного уровня генов. Одним из возможных способов для lncRNA регулировать посттранскрипционную активность генов является механизм регуляции ceRNA (конкурентно взаимодействующих РНК). Существующие исследования показали, что lncRNA может действовать как «губка» miRNAs, конкурентно связывая miRNA и, таким образом, влияя на регуляцию нижестоящих генов-мишеней [12]. Потенциальными ceRNA-мишенями LINC00400 являются микро-РНК, взаимодействующие с генами сигнального пути p53 и регулирующие тем самым апоптоз и клеточное деление [28].

В регуляции деления клеток также задействован исследованный нами ген *ERBB2* (*HER2*), который кодирует her2 (erbB-2) (human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) — мембранный белок, тирозиновую протеинкиназу семейства рецепторов эпидермального фактора роста EGFR/ErbB. В нормальной клетке есть две копии этого гена, в раковой — намного больше, в результате на поверхности опухолевой клетки располагается много молекул белка her2, что приводит к нарушению регуляции роста клеток. Такие опухоли быстрее растут, более агрессивны и меньше подвержены воздействию химиотерапии и лучевой терапии [29]. Амплификация или повышенная экспрессия этого

гена играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов рака, является важным биомаркером и терапевтической мишенью [30]. Амплификация her2 связана с устойчивостью к противораковому препарату цетуксимаб [31].

Her2 в отличие от других членов семейства erbB напрямую не связывает лиганд. Активация происходит в результате гетеродимеризации с другим членом erbB или гомодимеризации, когда концентрация her2 высока, например при раке [32]. Амплификация гена *ERBB2* происходит примерно в 15–30 % случаев рака молочной железы [33], также при раке яичников, желудка, аденокарциноме легкого [34] и агрессивных формах рака тела матки, таких как серозная аденокарцинома эндометрия [35].

Хорошо известно, что в патогенезе ряда гинекологических злокачественных опухолей важную роль играет эндогенная или экзогенная гиперэстрогения [36]. По данным О. И. Кита и соавторов [36, 37], одним из ключевых факторов в канцерогенезе РШМ может быть метаболическая активация эстрадиола. Ген *CYP11A1* кодирует фермент из семейства цитохромов P450, который катализируют гидроксирование 17-β-эстрадиола в положении С-2. Из данной литературы известно, что в некоторых гинекологических опухолях повышена экспрессия генетических локусов, регулирующих гидроксирование эстрадиола (*CYP11A1*) [38].

Таким образом, проведенный анализ копийности генетических локусов и регулируемых ими сигнальных путей позволил установить, что у больных РШМ чувствительность к ЛТ ассоциирована с особенностями регуляции репарации ДНК, апоптоза, пролиферации клеток и метаболизма эстрадиола.

Заключение

Выявленные с помощью комбинации биоинформационных и молекулярных подходов маркеры — показатель копийности *H2AFX*, *CHEK1*, *ERBB2*, *BIRC2*, *LINC00400*, *CASP4*, *CASP5* и *CYP11A1* во вДНК могут стать основой малоинвазивного определения чувствительности РШМ к ЛТ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Tsaplina N. N., Porkhanova N. V., Fatkina N. B., Zinkovich M. S., Gusareva M. A., Solntseva A. A., Vasilieva E. O., Kosheleva N. G., Tolmacheva E. A., Martynova K. V., Udalenkova I. A., Rozenko L. Ya., Selezneva O. G., Pustovalova A. V., Chalabova T. G., Shlyakhova O. V., Meshcheryakov P. N., Oskin S. V., Kit O. I., Kutilin D. S. From bioinformatic screening to low-invasive molecular diagnostics of the cervical tumor sensitivity to radiation therapy. *J Clin Oncol* 40, 2022 (suppl 16; abstr e17512). DOI 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e17512.
2. Паяниди Ю. Г., Винокурова С. В. HPV-ассоциированные опухоли женской репродуктивной системы. Факторы риска. Концепция снижения вреда // Онкогинекология. — 2020. — № 2. — С. 51–60.
3. 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. vol.136. P. 359–386.
4. Yang J, Cai H, Xiao ZX, Wang H, Yang P. Effect of radiotherapy on the survival of cervical cancer patients: An analysis based on SEER database. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(30):e16421. DOI: 10.1097/MD.00000000000016421. PMID: 31348242; PMCID: PMC6708958.
5. Uyar D., Rader J. Genomics of cervical cancer and the role of human papillomavirus pathobiology. *Clin. Chem*. 2014. vol. 60. P. 144–146.
6. Boon SS, Luk HY, Xiao C, Chen Z, Chan PKS. Review of the Standard and Advanced Screening, Staging Systems and Treatment Modalities for Cervical Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(12):2913. DOI: 10.3390/cancers14122913. PMID: 35740578; PMCID: PMC9220913.
7. Kehoe S., Bhatla N. (2021), FIGO Cancer Report 2021. *Int J Gynecol Obstet*, 155: 5–6. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13882>.
8. Marima R, Francies FZ, Hull R, Molefi T, Oyomno M, Khanyile R, Mbatha S, Mabongo M, Owen Bates D, Dlamini Z. MicroRNA and Alternative mRNA Splicing Events in Cancer Drug Response/Resistance: Potent Therapeutic Targets. *Biomedicines*. 2021;9(12):1818. DOI: 10.3390/biomedicines9121818. PMID: 34944633; PMCID: PMC8698559.
9. Zhang, B.; Chen, J.; Ren, Z.; Chen, Y.; Li, J.; Miao, X.; Song, Y.; Zhao, T.; Li, Y.; Shi, Y.; et al. A specific miRNA signature promotes radioresistance of human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2013, 13, 118.
10. Corcoran C.; Rani S.; Breslin S.; Gogarty M.; Ghobrial I. M.; Crown J.; O'Driscoll L. MiR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. *Mol. Cancer* 2014, 13, 71.
11. Kutilin D. Genetic and epigenetic bases of prostate tumor cell radioresistance. *Klin Onkol* 2021; 34(3): 1–15 DOI: 10.48095/ccko20211.
12. Kutilin D. S., Gusareva M. A., Kosheleva N. G., Kit O. I. Regulatory network of competitively interacting RNAs and effectiveness of rectal tumors radiotherapy. *Klin Onkol* 2022; 35(4): 297–306.
13. Gao J., Aksoy B. A., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer S. O., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E., Cerami E., Sander C., Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):p11.
14. Колесников Е. Н., Максимов А. Ю., Кут О. И., Кутилин Д. С. Зависимость общей и без рецидивной выживаемости больных от молекулярно-генетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода // Вопросы онкологии. — 2019. — № 5. — С. 691–700.
15. Кутилин Д. С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // Молекулярная биология. — 2020. — Т. 54. — № 4. — С. 580–595.
16. 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.
17. Кутилин Д. С., Кечерюкова М. М. От биоинформационного скрининга генетических маркеров к малоинвазивной диагностике метастазов в лимфатических узлах у пациенток с раком шейки матки // Казанский медицинский журнал. — 2022. — Т. 103. — № 5. — С. 725–736. DOI: 10.17816/KMJ2022–725.
18. Кутилин Д. С., Айрапетова Т. Г., Анистратов П. А., Пыльцин С. П., Лейман И. А., Карнаухов Н. С., Кут О. И. Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой легкого // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2019;167(6):731–738.
19. Кутилин Д. С., Айрапетова Т. Г., Анистратов П. А., Пыльцин С. П. [и др.]. Изменение относительной копийности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2017;3–2(195–2):74–82.

20. Кутилин Д. С., Кошелева Н. Г., Гусарева М. А., Харагезов Д. А. [и др.]. Влияние транскрипционной активности генов, регулирующих репарацию ДНК, на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки // Современные проблемы науки и образования. — 2019. — № 6. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29353>.
21. Кошелева Н. Г., Гусарева М. А., Удаленкова И. А., Фаткина Н. Б. [и др.]. 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. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30396>
22. Zhang Y., Hunter T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International Journal of Cancer*. 134 (5): 1013–23.
23. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development*. 14 (12): 1448–59.
24. Goto H, Izawa I, Li P, Inagaki M (2012). Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Science*. 103 (7): 1195–200.
25. Liang Y, Lin SY, Brunicardi FC, Goss J, Li K (2009). DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World Journal of Surgery*. 33 (4): 661–6.
26. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*. 379 (6563): 349–53.
27. Martinon F, Tschopp J (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*. 14 (1): 10–22. DOI:10.1038/sj.cdd.4402038.
28. Yuan W, Li X, Liu L, Wei C, Sun D, Peng S, Jiang L. Comprehensive analysis of lncRNA-associated ceRNA network in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;508(2):374–379. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.151. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30503344.
29. Ménard S., Casalini P., Campiglio M., et al. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell. Mol. Life Sci.*: journal. — 2005. — Vol. 61, no. 23. — P. 2965–2978. DOI:10.1007/s00018–004–4277–7.
30. Barh D., Gunduz M. (2015). *Noninvasive Molecular Markers in Gynecologic Cancers*. CRC Press. p. 427.
31. Yonesaka K., Zejnullahu K., Okamoto I., Satoh T., Cappuzzo F., Souglakos J., et al. (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science Translational Medicine*. 3 (99): 99ra86.
32. Hsu JL, Hung MC (2016). The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 35 (4): 575–588.
33. Tan M, Yu D (2007). Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. *Breast Cancer Chemosensitivity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 608. pp. 119–29.
34. Kumar V, Abbas A, Aster J (2013). *Robbins basic pathology*. Philadelphia: Elsevier/Saunders. p. 179. ISBN 9781437717815.
35. Chiosea SI, Williams L, Griffith CC, Thompson LD, Weinreb I, Bauman JE, et al. (2015). Molecular characterization of apocrine salivary duct carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 39 (6): 744–752.
36. Кит О. И., Водолажский Д. И., Кутилин Д. С., Моисеенко Т. И., Никитин И. С., Франциянц Е. М. Изменение экспрессии эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки // Кубанский научный медицинский вестник. — 2016. — № 2. — С. 84–90.
37. 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.
38. Кит О. И., Водолажский Д. И., Кутилин Д. С., Моисеенко Т. И., Никитин И. С., Франциянц Е. М. Способ прогнозирования рецидивов рака тела матки на основании уровня экспрессии генов PTEN и CYP1B1. Патент на изобретение RU 2605302 С1, 20.12.2016.

АВТОРЫ

Цаплина Наталья Николаевна, врач-онколог отделения онкогинекологии Клинического онкологического диспансера № 1 Министерства здравоохранения Краснодарского края, ассистент кафедры онкологии Кубанского государственного медицинского университета Минздрава России, Россия, г. Краснодар, Porhanova.nat@mail.ru

Tsaplina Natalia N., M.D., Oncologist of the Department of Gynecologic Oncology of State Budgetary Healthcare Institution “Clinical Oncological Dispensary №1” of the Ministry of Healthcare of Krasnodar Region, 350051, Krasnodar, Dimitrova street, 146. Assistant Professor of the Chair of Oncology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kuban State Medical University”. E-mail: Porhanova.nat@mail.ru

Кутилин Денис Сергеевич, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии Минздрава России, кандидат биологических наук, Россия, г. Ростов-на-Дону, k.denees@yandex.ru ORCID 0000-0002-8942-3733

Kutilin Denis S., Ph.D. in Biological Sciences, Leading Research Associate of the Laboratory of Molecular Oncology, Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 14-th line, 63, Rostov-on-the-Don, 344037; ORCID 0000-0002-8942-3733, e-mail: k.denees@yandex.ru

Фаткина Наталья Борисовна, врач-радиотерапевт отделения радиотерапии № 1 Национального медицинского исследовательского центра онкологии Минздрава России, кандидат медицинских наук, Россия, г. Ростов-на-Дону, f-iona@yandex.ru ORCID 0000-0003-2418-891X

Fatkina Natalia B., M.D., Ph.D. in Medical Sciences, Radiotherapist of the Department of Radiation Therapy № 1, Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ORCID 0000-0003-2418-891X, e-mail: f-iona@yandex.ru

Гусарева Марина Александровна, заведующая отделением радиологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии Минздрава России, кандидат медицинских наук, Россия, г. Ростов-на-Дону, oncorad@mail.ru ORCID 0000-0002-9426-9662

Gusareva Marina A., M.D., Ph.D. in Medical Sciences, Chief of the Department of Radiology; Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 14-th line, 63, Rostov-on-the-Don, 344037; ORCID 0000-0002-9426-9662, e-mail: oncorad@mail.ru

Порханова Наталья Владимировна, доцент кафедры онкологии Кубанского государственного медицинского университета Минздрава России, доктор медицинских наук, Россия, г. Краснодар, Porhanova.nat@mail.ru

Porkhanova Natalia V., M.D., Ph.D. in Medical Sciences, Assistant Professor of the Chair of Oncology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kuban State Medical University”, Krasnodar, Mitrofana Sedina street, 4A, e-mail: Porhanova.nat@mail.ru