

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-57-78



Особенности транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка

Д.С. Кутилин, А.Э. Данилова, А.Ю. Максимов, А.В. Снежко, М.А. Енгибарян

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037
Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. На протяжении последнего десятилетия рак языка сохраняет лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости злокачественными опухолями головы и шеи. Плоскоклеточный тип рака языка является агрессивной формой и имеет клинически непредсказуемый прогноз. В настоящее время выделяют несколько гистологических подтипов этой патологии. Поиск новых прогностических факторов, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и давать объективный прогноз развития болезни, является актуальным направлением исследований в молекулярной онкологии. Такими факторами могут выступать определенные транскрипционные характеристики опухолей, определяющие особенности патогенеза в каждом конкретном случае.

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

Материалы и методы. Этап скринингового биоинформационного анализа выполнен с использованием интерактивного веб-сервера анализа данных по экспрессии матричной РНК 9736 образцов опухолей и 8587 образцов нормальной ткани из проектов Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и Genotype-Tissue Expression (GTEx) с применением стандартного конвейера обработки Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). В ходе основного (валидационного) этапа исследования анализировались данные 300 больных с местно-распространенными злокачественными опухолями языка. Уровень относительной экспрессии генов, выявленных на этапе биоинформационного анализа, определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. В ходе биоинформационного анализа выделены 1488 генов, увеличивающих экспрессию, и 589 генов, уменьшающих экспрессию, при плоскоклеточном раке языка. Из этих 2077 генов были выбраны 23 генетических локуса, наиболее сильно изменяющих экспрессию в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка. Из них при валидации методом полимеразной цепной реакции только 14 изменяли свой транскрипционный профиль в опухолевой ткани относительно нормальной: *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*. При анализе данных с помощью полимеразной цепной реакции выявлена значительная гетерогенность в ряде исследованных биологических образцов. Кластерный анализ позволил разделить общую выборку из 300 пациентов на 3 группы, различающиеся по экспрессии генов: кластер 1 ($n = 90$), кластер 2 ($n = 101$) и кластер 3 ($n = 109$), соответствующие базалоидному, акантолитическому и обычному гистологическим подтипам.

Заключение. Таким образом, в ходе исследования выявлен ряд молекулярных маркеров плоскоклеточного рака языка (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*), а также транскрипционные особенности различных гистологических подтипов этого заболевания.

Ключевые слова: экспрессия генов, плоскоклеточный рак языка, сигнальные пути, гистологические подтипы, металлотеопониназы, остеопонтин, NADH-убихиноноксидоредуктаза, дифференцировка кератиноцитов

Для цитирования: Кутилин Д.С., Данилова А.Э., Максимов А.Ю. и др. Особенности транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):57–78. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-57-78

Genes transcriptional activity features in different histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma

D.S. Kutilin, A.E. Danilova, A.Yu. Maksimov, A.V. Snezhko, M.A. Engibaryan

National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line, Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Kutilin *k.denees@yandex.ru*

Introduction. Over the past decade, tongue cancer has maintained a leading position in the overall structure of the incidence of head and neck malignant tumors. Squamous cell carcinoma of the tongue is an aggressive form and has a clinically unpredictable prognosis. Currently, there are several histological subtypes of this disease. And the search for new prognostic factors that could reflect the actual state of tumor progression and give an objective prognosis of disease development is an important research area in molecular oncology. Such factors may be certain transcriptomic characteristics of tumors, which determine the features of pathogenesis in each specific case.

Aim. To research genes transcriptional activity features in various histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma using bioinformatic and molecular approaches.

Materials and methods. The stage of screening bioinformatics analysis was performed using an interactive web server for analyzing data on messenger RNA expression of 9736 tumors and 8587 normal samples from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) projects using a standard processing pipeline (GEPIA). The main (validation) stage of the study was performed on 300 patients with locally advanced malignant tumors of the tongue. The quantitative real-time polymerase chain reaction method was used to determine the values of the relative expression of genes identified at the stage of bioinformatic analysis.

Results. Bioinformatic analysis identified 1488 genes that increase expression and 589 genes that decrease expression in tongue squamous cell carcinoma. Of these 2077 genes, 23 genetic loci were selected that most strongly alter expression in tumor tissue relative to normal tissue of the tongue. Of these, when validated by polymerase chain reaction, only 14 changed their transcriptional profile in tumor tissue relative to normal: *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* and *CLU*. The analysis of polymerase chain reaction data revealed significant heterogeneity in a number of biological samples studied. Cluster analysis made it possible to divide the total sample of 300 patients into 3 groups differing in gene expression: cluster 1 ($n = 90$), cluster 2 ($n = 101$) and cluster 3 ($n = 109$), corresponding to the basaloid, acantholytic and usual histological subtypes. Thus, the study made it possible to identify a number of molecular markers of tongue squamous cell carcinoma (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* and *CLU*), as well as to reveal the transcriptional features of various histological subtypes of this disease.

Keywords: gene expression, tongue squamous cell carcinoma, signaling pathways, histological subtypes, metalloproteinases, osteopontin, NADH-ubiquinone oxidoreductase, keratinocyte differentiation

For citation: Kutilin D.S., Danilova A.E., Maksimov A.Yu. et al. Genes transcriptional activity features in different histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):57–78. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-57-78

ВВЕДЕНИЕ

Плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта составляет 90–95 % всех злокачественных новообразований этой локализации. Основную долю данной патологии занимают опухоли языка и дна ротовой полости (11 %) [1]. На протяжении последнего десятилетия рак языка сохраняет лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости злокачественными опухолями головы и шеи. В 2021 г. в мире от него умерли более 135 тыс. человек [2].

С точки зрения биологического поведения рак языка считается агрессивной формой плоскоклеточного рака. Язык обладает богатой сосудистой лимфатической сетью и хорошо представленной мускулатурой, что объясняет повышенную склонность плоскоклеточного рака этой локализации к инвазии и метастазированию [3]. В то же время данная патология характеризуется клинически непредсказуемым прогнозом с учетом высокой частоты развития скрытых метастазов у пациентов с небольшими первичными опухолями и отсутствием клинических признаков метастатического заболевания [4]. Так, в ряде исследований показано, что у больных раком языка, возникшим в основании языка, 5-летняя выживаемость составляет менее 40 %, а при остальных локализациях этот показатель не превышает 50 % [5].

Наиболее частым гистологическим вариантом является обычный тип плоскоклеточного рака языка (54 %) без казуистики. Эта разновидность данной патологии образована неопластическими клетками с различной степенью дифференцировки [3]. Вторым по частоте встречаемости гистопатологическим подтипом является акантолитический, который диагностируется у 26 % больных. Он характеризуется лобулярным/инсулярным паттерном роста с присутствием псевдожелезистых/псевдолюминальных пространств, возникающих в результате акантолиза [3]. Базалоидный подтип диагностируется в 13 % случаев. Характер роста в данном случае переменный: с дольчатыми/островковыми, трабекулярными, решетчатыми областями и гнездами опухолевых клеток. Основной чертой этого подтипа является наличие опухолевых клеток на периферии неопластических разрастаний. При саркоматоидном подтипе наблюдаются смешанные участки обычной плоскоклеточной карциномы со злокачественной пролиферацией веретенообразных клеток. Паттерн саркоматоидной пролиферации преимущественно фасцикулярный, редко сториформный; опухолевые клетки смешиваются с воспалительными клетками и редко имеют эпителиоидную морфологию. Верукозный подтип рака языка характеризуется широким фронтом инвазии в подлежащий слой в виде

пухлых папиллярных инвагинаций утолщенного эпителия с минимальной атипией. В поверхностном эпителии обнаруживается гиперпаракератоз, особенно сильно выраженный на уровне участков инвагинаций [3].

Канцерогенез вообще и в рассматриваемом случае в частности представляет собой многоэтапный процесс, модулируемый эндогенными и экзогенными факторами. Среди них большую роль играют регулярное употребление табака и алкоголя, а также персистирующая инфекция вируса папилломы человека (ВПЧ) [6]. Эти факторы могут привести к широкому спектру генетических и эпигенетических событий, которые способствуют нестабильности генома, развитию и прогрессированию опухоли. Развитие и прогрессирование предраковых заболеваний языка обусловлены не только необратимыми изменениями в последовательности ДНК, включая делеции, амплификации и мутации генов, приводящими как к активации онкогенов, так и к инактивации генов-супрессоров опухолей, но и изменениями в экспрессии генов [7–10].

Выбор метода лечения обычно зависит от клинико-морфологических параметров опухоли: локализации и объема опухолевого очага, наличия метастазов в лимфатических узлах и степени гистологической дифференцировки ткани. Однако на ранних стадиях опухолевого процесса эти прогностические факторы часто неэффективны. Для выбора оптимальных методов лечения возникает потребность в дополнительных прогностических факторах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и давать объективный прогноз развития заболевания. Ими могут выступать определенные транскриптомные характеристики опухолей, определяющие особенности патогенеза в каждом конкретном случае [11].

Из-за высокой смертности и низкой частоты излечения плоскоклеточный рак языка представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения и имеет большое индивидуальное и социально-экономическое значение [12]. Генетические полиморфизмы и экологические факторы риска, связанные с его развитием, достаточно изучены. А вот исследование транскрипционных нарушений при канцерогенезе все еще остается важной задачей, решение которой даст профилактическое, диагностическое и терапевтическое преимущество [12].

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

Работа выполнена в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (Ростов-на-Дону) в период с 2019 по 2022 г. Проанализированы данные комплексного клинического и молекулярного

обследований 300 пациентов с местно-распространенными злокачественными опухолями языка.

Скрининговый биоинформационный анализ. На этом этапе исследования использовали интерактивный веб-сервер анализа данных по экспрессии матричной РНК (мРНК) 9736 образцов опухолей и 8587 образцов нормальной ткани из проектов Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и Genotype-Tissue Expression (GTEx) с применением стандартного конвейера обработки Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA), включающего ряд функций, таких как дифференциальный анализ экспрессии генов (опухоль/норма), профилирование в соответствии с типами опухолей или патологическими стадиями, анализ выживаемости пациентов, обнаружение сходных генов и корреляционный анализ. Этот инструмент разработан сотрудниками Zhang Lab Пекинского университета Z. Tang, C. Li и B. Kang. Используемые GEPIA наборы данных RNA-Seq основаны на проекте UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu>) [13].

Экстракция РНК из биоптатов. Образец ткани извлекали из криопробирки и немедленно помещали в охлажденную до -20°C ступку, гомогенизировали, добавляя 900 мкл реагента QIAzol (Qiagen, Германия). Дальнейшее выделение и очистку тотальной РНК производили с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Препараты тотальной РНК обрабатывали DNКазой I для устранения следов геномной ДНК согласно протоколу производителя фермента. В полученный препарат тотальной РНК добавляли РНКазин до конечной концентрации в растворе 1 ед. акт./мкл. Качество полученной РНК проверяли электрофоретическим методом в агарозном геле по соотношению интенсивности полос 28S и 18S рРНК [14].

Оценка уровня экспрессии генов. Для наработки комплементарной ДНК готовили реакцию смесь, содержащую 5 мкМ рандомных праймеров, 1x RT буфер, 0,5 мМ dNTP микс, 0,5 ед. акт./мкл RNase Inhibitor, 5 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV. Полученную смесь инкубировали при 44°C в течение 1 ч, далее обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при 92°C в течение 10 мин. Полученные препараты использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [14].

Методом количественной ПЦР в режиме реального времени определяли величины относительной экспрессии генов, выявленных на этапе биоинформационного анализа. При выборе референсного гена использовали алгоритм, описанный в работе J. Vandesompele [15], по нему рассчитывали величину M-value и Stability (Stability = $\ln(1/M\text{-value})$). Гены с M-value $<0,5$ считали идеальными. В качестве референсных были выбраны 2 гена: *GAPDH* (M-value = 0,071, Stability = 2,102) и *ACTB* (M-value = 0,157, Stability = 1,761). В исследовании использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры, представленные в табл. 1.

Таблица 1. Панель праймеров для определения относительной экспрессии генов

Table 1. Primer panel for determination of relative gene expression

| Ген Gene | Последовательность праймера 5'→3' Primer sequence 5'→3' | |
|---------------|--|-------------------------|
| | Прямой Forward | Обратный Reverse |
| <i>GAPDH</i> | GTCAAGGCTGAGAACGGGAA | TCGCCCCACTTGATTTTGGGA |
| <i>ACTB</i> | AACCGCGAGAAGATGACCC | AGCACAGCCTGG TAGCAAC |
| <i>MMP1</i> | TCTCACAGCTTCCCAGCGA | TGGCGTGTAATTTTCAATCCTGT |
| <i>MMP11</i> | ACATTTGGTTCTTCCAAGGTGC | CATGGACCGGGAACCTCAC |
| <i>CA9</i> | AGGGGTCTCTGACTACACCG | AGAGGGTGTGGAGCTGCTTAG |
| <i>PTHLH</i> | ACATTAGGGCTCCTGCATCTT | TCCGAGGCAAACSTTTGAAC |
| <i>MMP9</i> | TCTTCCAGTACCGAGAGAAAGC | CAACTCACTCCGGGAACTCA |
| <i>COL1A1</i> | TGAAGGGACACAGAGGTTTCAG | AGTAGCACCATCATTTCCACGA |
| <i>LAMC2</i> | ATGGATGCAGTACAGATGGTGATTA | AGTAAGACCAGCCCCTCTTCA |
| <i>ISG15</i> | ACAGCCATGGGCTGGGA | CCTTCAGCTCTGACACCGAC |
| <i>MMP3</i> | GACAAAGGATACAACAGGGACCAA | AGCTTCAGTGTGGCTGAGT |
| <i>SPP1</i> | ACCTGACATCCAGTACCCTGA | ACGGCTGTCCCAATCAGAAG |
| <i>KRT13</i> | TTCTCAGCAGGAAGCGT | GCGACCAGAGGCATTAGAGG |
| <i>SPRR3</i> | TTCTCTGCACAGCAGATGATCC | CTGGCTGGGTTGTTTCACCT |
| <i>KRT4</i> | GAGGGCGAGGAGTACAGAATG | AGAGACACTGCCACCAAACC |
| <i>ANXA1</i> | CCAGGGCCTTGATGAAGCA | TTGTGGCGCACTTCACGATA |
| <i>MT-ND6</i> | TTCACCCACAGCACCAATCC | CAGCGATGGCTATTGAGGAGT |
| <i>CNFN</i> | ATCGCGATCCTGCAGCTATG | CACAGAGGAGCAAAAGTGCC |
| <i>SLPI</i> | GTTTCCCCTGTGAAAGCTTGA | GTGGTGGAGCCAAGTCTCAG |
| <i>CRNN</i> | TTGCCGATGTGATTGTGAAACC | TCTTCATCCAGCAGACGCAG |
| <i>MAL</i> | TCCTGTACATAATTGGAGCCC | ATGTAGGAGAACACCACGGC |
| <i>TGM3</i> | CCCCTGGCTGAATGTGGATAG | ACGGCGGAAATTCAGACTCC |
| <i>CD24</i> | CGCTCCCCACCTTGCC | TCACTGGAATAAATCTGCGTGG |
| <i>IL1RN</i> | TCCGCAGTCACCTAATCACTC | AACATCCCAGATTCTGAAGGC |
| <i>CLU</i> | TCTTTCCCAAGTCCCGCATC | GTCATCGTCGCCTTCTCGTAT |

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (в 3 технических повторах для каждого образца) проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ каждого из dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, ПЦР-буфер и 1 ед. ДНК-полимеразы *SynTaq* (с ингибирующими активностью фермента антителами) (ООО «Синтол», Россия), краситель *EVA-Green* и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсных генов или гена-мишени, по следующей программе: первичная денатурация при 95 °С в течение 3 мин; 40 циклов – 10 с

при 95 °С, 30 с при 58 °С (отжиг праймеров – температура подобрана экспериментальным путем с использованием температурного градиента), 30 с при 72 °С. Специфичность ПЦР контролировали с помощью анализа кривых плавления (melting curve analysis). Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле:

$$RE = E^{-\Delta\Delta Ct},$$

где E – эффективность амплификации, равная $10^{-1/k}$, k – коэффициент из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \lg P_0 + b$,

полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных ($E_{cp} = 1.949$).

Нормализацию результатов проводили по 2 референсным генам – *GAPDH* и *B2M* – и уровню экспрессии соответствующих генов-мишеней в образцах нормальной ткани последовательно, по приведенной ниже схеме [16].

1. Нормализация по среднему референсных генов: $\Delta C(t) = C(t)_{target} - C(t)_{reference}$, где $C(t)_{reference}$ – среднее геометрическое $C(t)$ референсных генов, $C(t)_{target}$ – среднее геометрическое $C(t)$ генов-мишеней.
2. Расчет $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для условно нормальной и опухолевой тканей каждого пациента.
3. Расчет медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для условно нормальной и опухолевой тканей пациентов.
4. Нормализация по условно нормальной ткани и окончательный результат как кратность изменения (fold change, FC) [16]: $FC = E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана опухолевой ткани}} / E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана нормальной ткани}}$ (что тождественно $RE = E^{-\Delta C(t)}$, или $RE = E^{-(\Delta C(t)_{\text{медиана опухолевой ткани}} - \Delta C(t)_{\text{медиана нормальной ткани}})$).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для проведения кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) и построения тепловых карт использовали скрипты на языке R. Нормальность распределения показателей оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Оценку различий проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$, для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Для оценки различий между 3 и более независимыми группами для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$ применяли критерий Краскела–Уоллиса [17].

Также проводили анализ обогащения по функциональной принадлежности (gene set enrichment analysis, GSEA). Для выявления общих сигнальных путей исследуемых генов использовали алгоритм сетевой интеграции нескольких ассоциаций, который предсказывает функцию и положение гена в составе сложной сети из множества других генов, а также рассчитывает оценку для каждой точки построенной сети, отражающую силу связи между соседними точками [18]. Алгоритм использует данные Gene Expression Omnibus (GEO) для расчета сети генов и выполняется в 2 этапа: 1) на основе линейной регрессии вычисляется единая сеть функциональных ассоциаций из нескольких источников данных (вычисляется корреляция Пирсона как мера силы взаимодействия между каждой парой генов; каждой паре генов присваивается вес ассоциации (W-value), который либо равен 0, что указывает на отсутствие взаимодействия, либо имеет положительное значение, которое отражает силу взаимодействия генов); 2) предсказывается функция гена с учетом сложной сети функциональных ассоциаций

с использованием метода распределения меток поля Гаусса (предсказание функции рассматривается как проблема бинарной классификации, т. е. каждой сети функциональных ассоциаций, полученной из источников данных, присваивается положительный вес, отражающий полезность источников данных для прогнозирования функции). На выходе алгоритма получается список категорий GO (Gene Ontology) и значения Q из FDR (false discovery rate, ожидаемая доля ложно отвергнутых нулевых гипотез) – скорректированного гипергеометрического теста на обогащение. Значения Q были скорректированы с помощью метода Бенджамини–Хохберга (один из методов контроля ожидаемой доли ложных отклонений гипотез (FDR)) и представлены до порогового значения $Q = 0,076$ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе биоинформационного анализа с использованием GEPIA [13] выделено 1488 генов, увеличивающих экспрессию, и 589 генов, уменьшающих экспрессию, при плоскоклеточном раке языка (рис. 1). Из этих 2077 генов были выбраны 10 генетических локусов, наиболее сильно повышающих экспрессию в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка, и 13 генетических локусов, наиболее сильно снижающих ее (табл. 2).

Выявленные в ходе биоинформационного анализа аномальные показатели транскрипционной активности генетических локусов были валидированы в тканях 300 больных плоскоклеточным раком языка методом ПЦР в режиме реального времени.

Из 23 генетических локусов, выявленных в ходе биоинформационного анализа, только 14 изменяли свой транскрипционный профиль в опухолевой ткани относительно нормальной (рис. 2). Так, были обнаружены статистически значимое ($p < 0,0005$) увеличение экспрессии генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2* и *MMP3* в 4,8; 2,4; 2,1; 4,0; 2,1; 2,0 и 3,5 раза соответственно и статистически значимое ($p < 0,0005$) снижение экспрессии генов *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* в 2,2; 1,3; 5,2; 7,5; 2,2; 2,3 и 2,6 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка (рис. 2).

При анализе результатов ПЦР выявлена значительная гетерогенность данных в ряде исследованных биологических образцов. Был проведен кластерный анализ и построена тепловая карта (рис. 3). Кластерный анализ 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 ($n = 109$).

Так, у пациентов кластера 1 в опухолевой ткани языка экспрессия генов *MMP1*, *CA9*, *PTHLH* и *ISG15* была выше в 2,2 ($p < 0,0005$); 2,1 ($p < 0,0001$); 8,8 ($p < 0,0001$) и 6,9 ($p < 0,005$) раза соответственно, а экспрессия генов *ANXA1*, *MT-ND6* и *MAL* – ниже в 6,5 ($p < 0,0005$); 5,9 ($p < 0,0001$) и 9,8 ($p < 0,0005$) раза соответственно относительно нормальной ткани (рис. 4).



Рис. 1. Дифференциально экспрессирующиеся гены (относительно нормальной ткани) у больных плоскоклеточным раком языка. Данные получены с использованием Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). Позиция генетических локусов на хромосомах установлена на основании данных GRCh38.p2 (NCBI)

Fig. 1. Differentially expressed genes (relative to normal tissue) in patients with squamous-cell carcinoma of the tongue. Data obtained using Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). Position of genetic loci on the chromosomes determined based on GRCh38.p2 data (NCBI)

У больных кластера 2 в опухолевой ткани языка экспрессия генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *MMP3* и *SPP1* оказалась выше в 4,8 ($p < 0,0005$); 2,4 ($p < 0,0001$); 2,4 ($p < 0,0001$); 4,0 ($p < 0,005$);

2,1 ($p < 0,005$); 3,2 ($p < 0,005$); 3,0 ($p < 0,001$), 3,5 ($p < 0,001$) и 2,7 ($p < 0,005$) раза соответственно, а экспрессия генов *KRT13*, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* – ниже в 6,4

Таблица 2. Генетические локусы с наиболее значимыми отклонениями транскрипционной активности в опухолевой ткани языка относительно нормальной ткани

Table 2. Genetic loci with the most significant deviations of transcriptional activity in the tumor tissue of the tongue relative to normal tissue

| Ген Gene | Идентификатор гена в базе данных https://www.ensembl.org/ Gene identification number in https://www.ensembl.org/database | Медиана экспрессии (опухоль) Median expression (tumor) | Медиана экспрессии (норма) Median expression (normal tissue) | Log2 (кратность отличий) Log2 (fold change) | P _{adj} |
|---|---|---|---|--|------------------|
| Гиперэкспрессированные гены <i>Hyperexpressed genes</i> | | | | | |
| <i>MMP1</i> | ENSG00000196611.4 | 183,291 | 1,394 | 6,266 | 1,19e-30 |
| <i>MMP11</i> | ENSG00000099953.9 | 40,740 | 0,880 | 4,473 | 2,56e-31 |
| <i>CA9</i> | ENSG00000107159.12 | 24,920 | 0,255 | 4,368 | 1,18e-29 |
| <i>PTHLH</i> | ENSG00000087494.15 | 137,053 | 6,891 | 4,129 | 7,12e-25 |
| <i>MMP9</i> | ENSG00000100985.7 | 56,261 | 2,529 | 4,020 | 7,10e-36 |
| <i>COL1A1</i> | ENSG00000108821.13 | 508,357 | 30,516 | 4,015 | 1,50e-27 |
| <i>LAMC2</i> | ENSG00000058085.14 | 244,179 | 15,448 | 3,898 | 9,94e-34 |
| <i>ISG15</i> | ENSG00000187608.8 | 333,975 | 21,942 | 3,868 | 9,55e-31 |
| <i>MMP3</i> | ENSG00000149968.11 | 28,779 | 1,064 | 3,851 | 2,18e-15 |
| <i>SPP1</i> | ENSG00000118785.13 | 65,489 | 3,974 | 3,741 | 5,41e-15 |
| Гипоэкспрессированные гены <i>Hypoexpressed genes</i> | | | | | |
| <i>KRT13</i> | ENSG00000171401.14 | 294,290 | 25584,811 | -6,437 | 1,79e-12 |
| <i>SPRR3</i> | ENSG00000163209.14 | 203,487 | 9956,686 | -5,606 | 9,40e-9 |
| <i>KRT4</i> | ENSG00000170477.12 | 12,650 | 7806,446 | -9,160 | 5,63e-23 |
| <i>ANXA1</i> | ENSG00000135046.13 | 1102,604 | 5099,181 | -2,208 | 1,75e-9 |
| <i>MT-ND6</i> | ENSG00000198695.2 | 1436,855 | 3535,993 | -1,299 | 1,91e-10 |
| <i>CNFN</i> | ENSG00000105427.9 | 290,964 | 2108,206 | -2,853 | 6,06e-4 |
| <i>SLPI</i> | ENSG00000124107.5 | 865,565 | 1914,697 | -1,144 | 6,22e-7 |
| <i>CRNN</i> | ENSG00000143536.7 | 2,380 | 1574,578 | -8,865 | 5,34e-24 |
| <i>MAL</i> | ENSG00000172005.10 | 4,410 | 1032,634 | -7,578 | 2,05e-27 |
| <i>TGM3</i> | ENSG00000125780.11 | 6,370 | 820,555 | -6,801 | 4,50e-16 |
| <i>CD24</i> | ENSG00000272398.5 | 281,208 | 801,300 | -1,507 | 5,47e-9 |
| <i>IL1RN</i> | ENSG00000136689.18 | 141,680 | 697,355 | -2,291 | 3,29e-3 |
| <i>CLU</i> | ENSG00000120885.19 | 113,118 | 688,541 | -2,595 | 2,00e-13 |

($p < 0,0005$); 5,6 ($p < 0,0001$); 9,2 ($p < 0,0005$); 2,2 ($p < 0,05$); 1,3 ($p < 0,05$); 2,9 ($p < 0,005$); 8,9 ($p < 0,0005$); 7,6 ($p < 0,0005$); 6,8 ($p < 0,0005$); 2,3 ($p < 0,05$) и 2,6 ($p < 0,001$) раза соответственно по сравнению с нормальной тканью (см. рис. 4).

У пациентов кластера 3 в опухолевой ткани языка обнаружены повышение экспрессии генов *MMP1*, *MMP11*, *MMP9*, *MMP3* и *SLPI* в 14,4 ($p < 0,0005$); 10,4 ($p < 0,0001$); 15,0 ($p < 0,0001$); 9,5 ($p < 0,005$) и 3,9 ($p < 0,005$) раза соответственно и снижение экспрессии

генов *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* в 5,2 ($p < 0,05$); 2,3 ($p < 0,01$); 2,2 ($p < 0,05$); 2,5 ($p < 0,05$) и 3,5 ($p < 0,001$) раза соответственно относительно нормальной ткани (см. рис. 4).

Между кластерами выявлено наличие дифференциальной экспрессии рассматриваемых генетических локусов. Так, в кластерах 1 и 2 статистически значимо ($p < 0,001$) различалась экспрессия *MMP1*, *MMP11*, *PTHLH*, *MMP9* и *COL1A1*: в 2,2; 1,7; 2,2; 1,9 и 2,7 раза

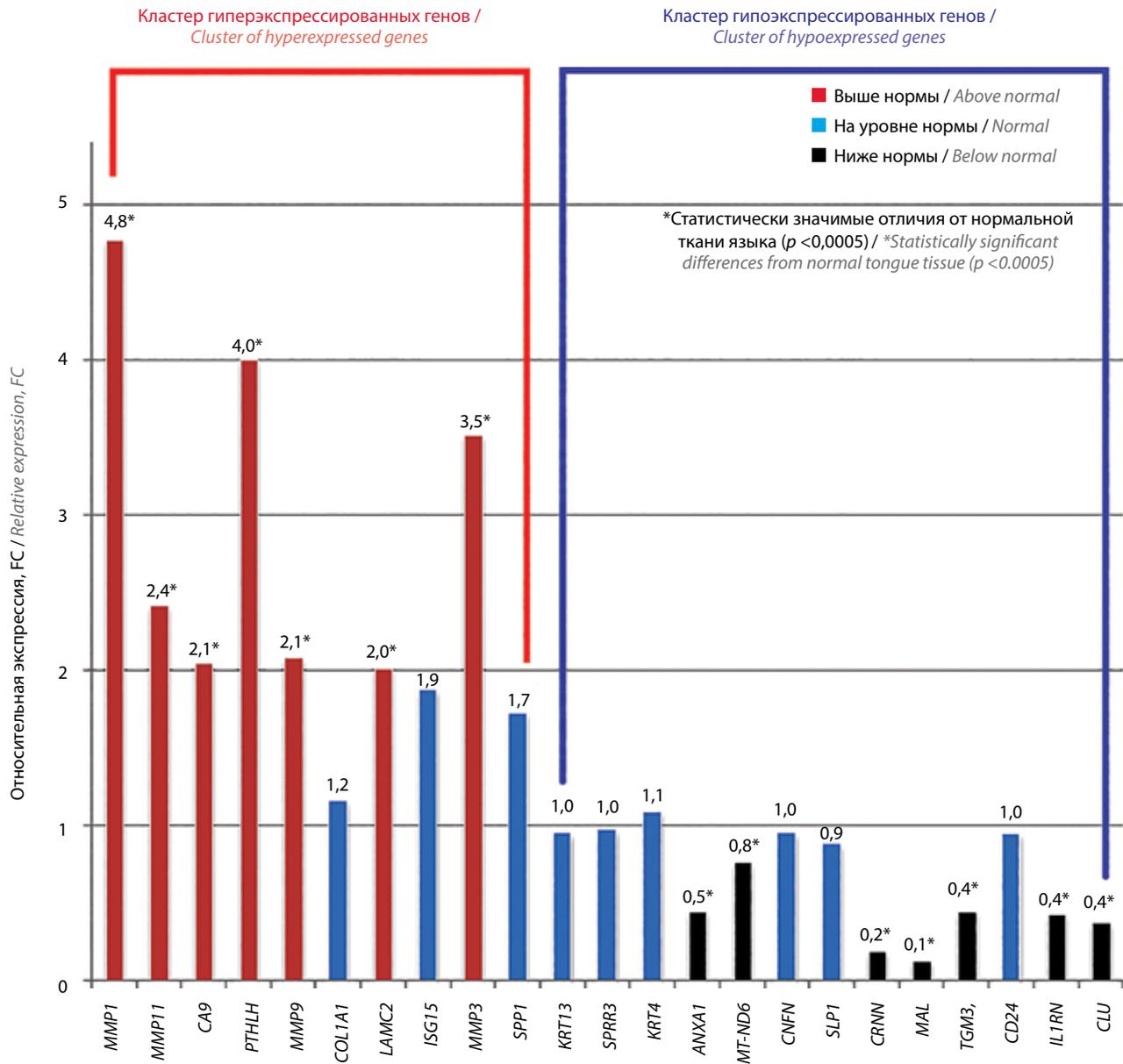


Рис. 2. Уровни относительной экспрессии 23 генов в опухолевой ткани 300 больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 2. Relative expression levels of 23 genes in tumor tissue of 300 patients with squamous cell carcinoma of the tongue

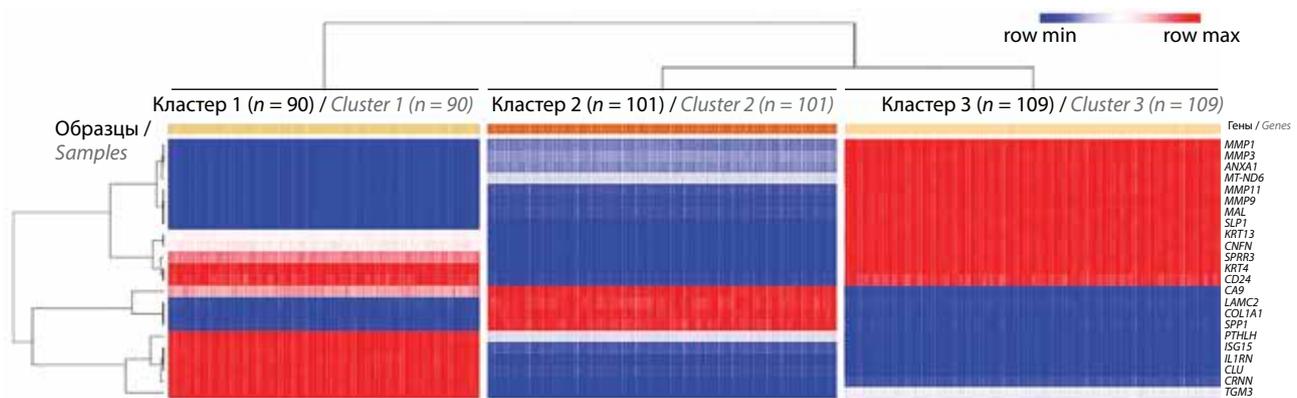


Рис. 3. Кластерный анализ и тепловая карта распределения уровня транскрипционной активности 23 генов в опухолевой ткани 300 больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 3. Cluster analysis and heat map of transcriptional activity distribution of 23 genes in tumor tissue of 300 patients with squamous cell carcinoma of the tongue

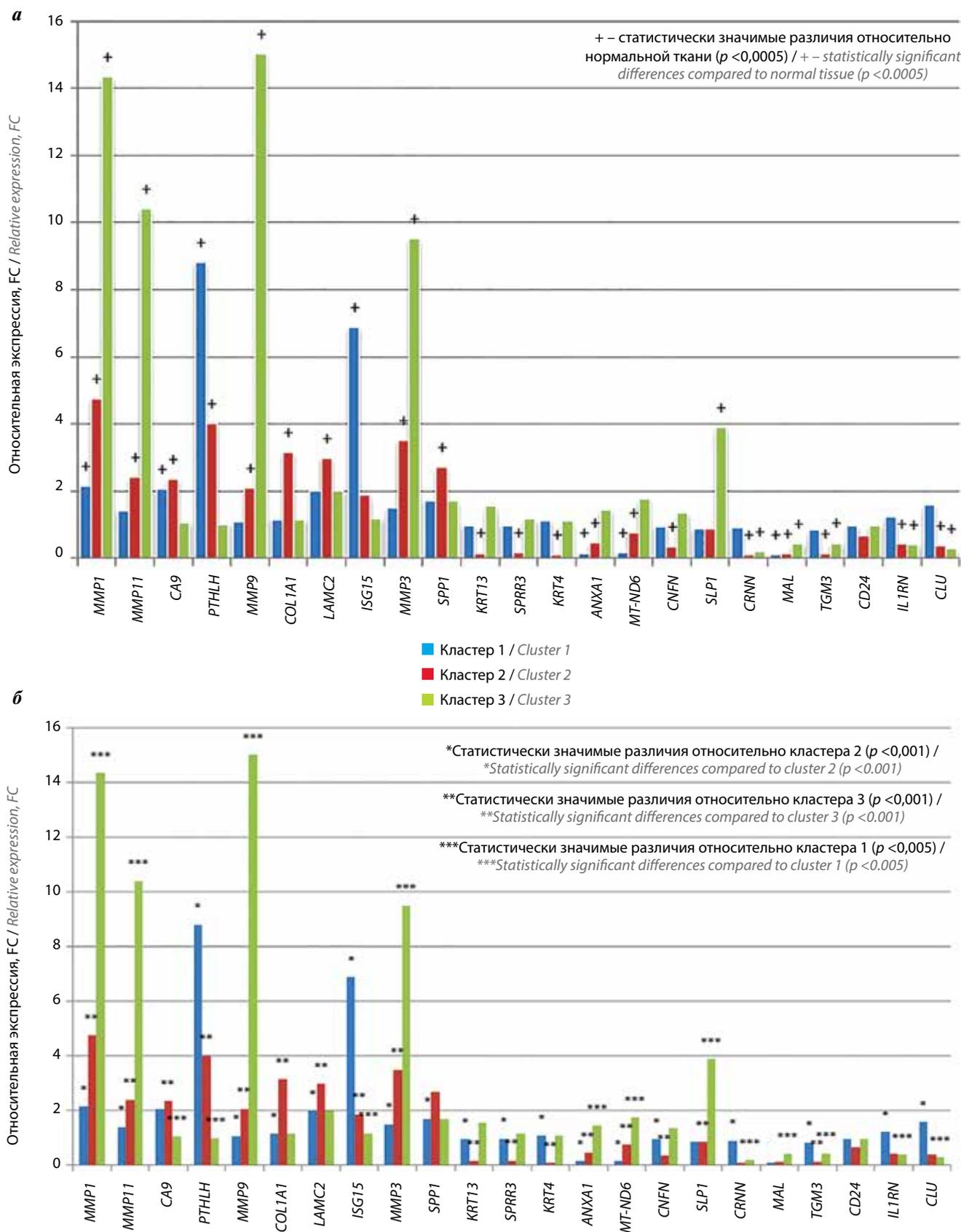


Рис. 4. Особенности экспрессии 23 генетических локусов в операционном материале в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка: а – статистически значимые различия относительно нормальной ткани; б – статистически значимые различия между кластерами
Fig. 4. Characteristics of expression of 23 genetic loci in operative material in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: а – statistically significant differences compared to normal tissue; б – statistically significant differences between the clusters

соответственно (рис. 4, 5), а также экспрессия *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *SPPI1*, *KRT13* и *SPRR3*: в 1,5; 3,7; 2,3; 1,6; 6,1 и 5,5 раза соответственно (рис. 4, 6), и генов *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*: в 10,2; 3,0; 4,5; 2,7; 8,1; 5,8; 2,8 и 4,1 раза соответственно (рис. 4, 7, 8).

Между кластерами 2 и 3 выявлено статистически значимое различие ($p < 0,001$) экспрессии генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *KRT13*, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *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 (рис. 4, 5–8).

Между кластерами 1 и 3 статистически значимо ($p < 0,001$) различалась экспрессия генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *ISG15*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *SLPI*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *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 (см. рис. 4, 5–8).

Также проводили анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA). Целью GSEA является получение списка наиболее важных сигнальных путей. Применение алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями позволило установить взаимодействия между генами *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *SPPI1*,

KRT13, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *SLPI*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *CD24*, *IL1RN* и *CLU* (рис. 9) и вовлеченность этих генов в те или иные сигнальные пути (табл. 3, 4). Данный алгоритм предсказывает функцию гена в составе сложной сети из множества генов, используя один из методов машинного обучения, основанный на распределении меток гауссовых полей, и присваивает оценку каждому узлу-точке построенной сети, отражающую вычисленную силу связи [19].

Согласно данным, полученным с использованием алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями, исследуемые гены связаны друг с другом на уровне со-экспрессии в 74 % случаев, на уровне локализации – в 14 % случаев, остальные случаи приходятся на физические взаимодействия и наличие общих белковых доменов.

Исследуемые гены с разным уровнем значимости вовлечены в различные сигнальные пути. Так, 18 генов включены в процессы развития кожи ($Q_{FDR} = 6.0 \cdot 10^{-18}$), 17 генов – в процессы дифференцировки клеток эпидермиса ($Q_{FDR} = 9.0 \cdot 10^{-17}$), 12 – в процессы ороговения ($Q_{FDR} = 5.0 \cdot 10^{-15}$), 13 – в процессы дифференцировки кератиноцитов ($Q_{FDR} = 9.0 \cdot 10^{-14}$), 6 – в метаболизм коллагена ($Q_{FDR} = 0,00003$), 3 – связаны с чувствительностью к ультрафиолетовому излучению в спектральном диапазоне А (УФ-А) ($Q_{FDR} = 0,004$), а 6 – участвуют

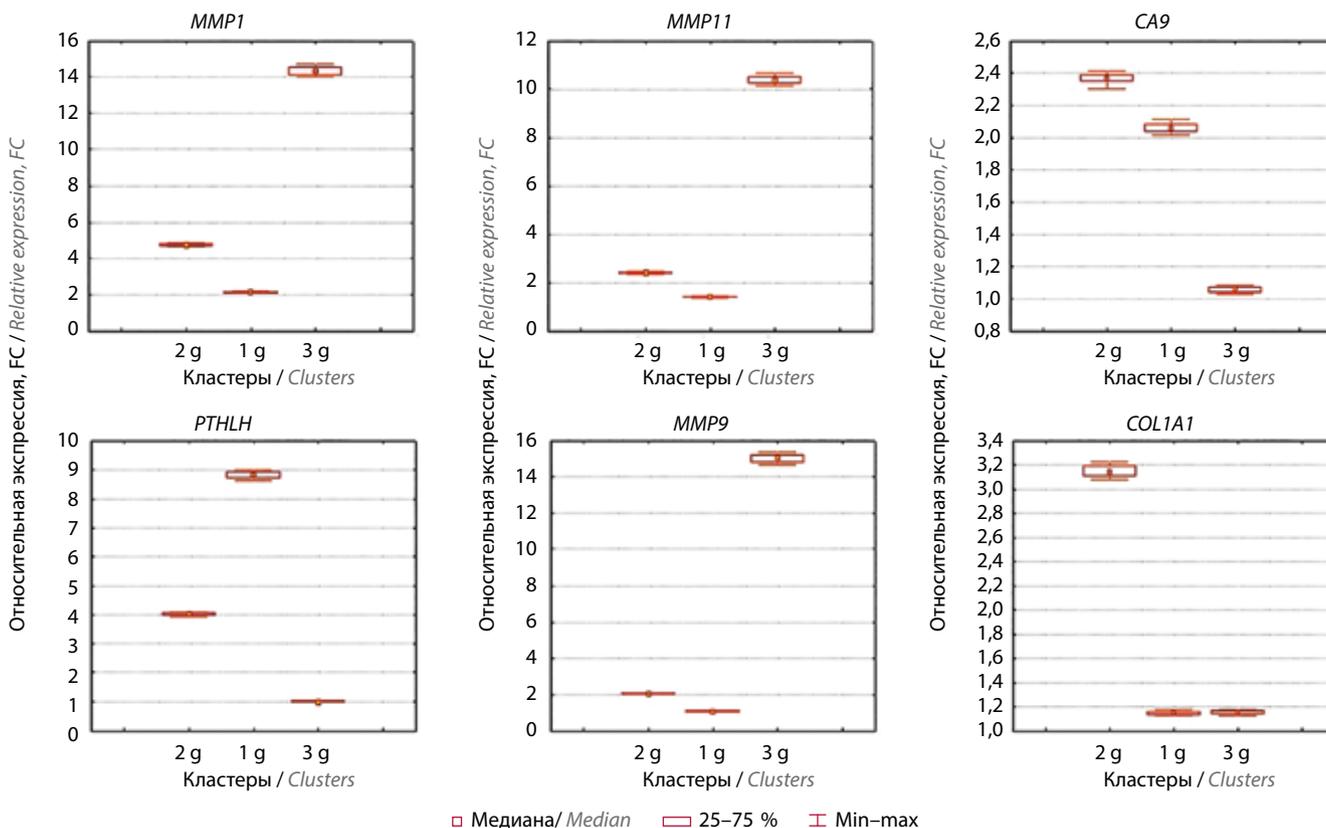


Рис. 5. Дифференциальная экспрессия генетических локусов *MMP1*, *MMP11*, *PTHLH*, *CA9*, *MMP9* и *COL1A1* в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 5. Differential expression of *MMP1*, *MMP11*, *PTHLH*, *CA9*, *MMP9* and *COL1A1* genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

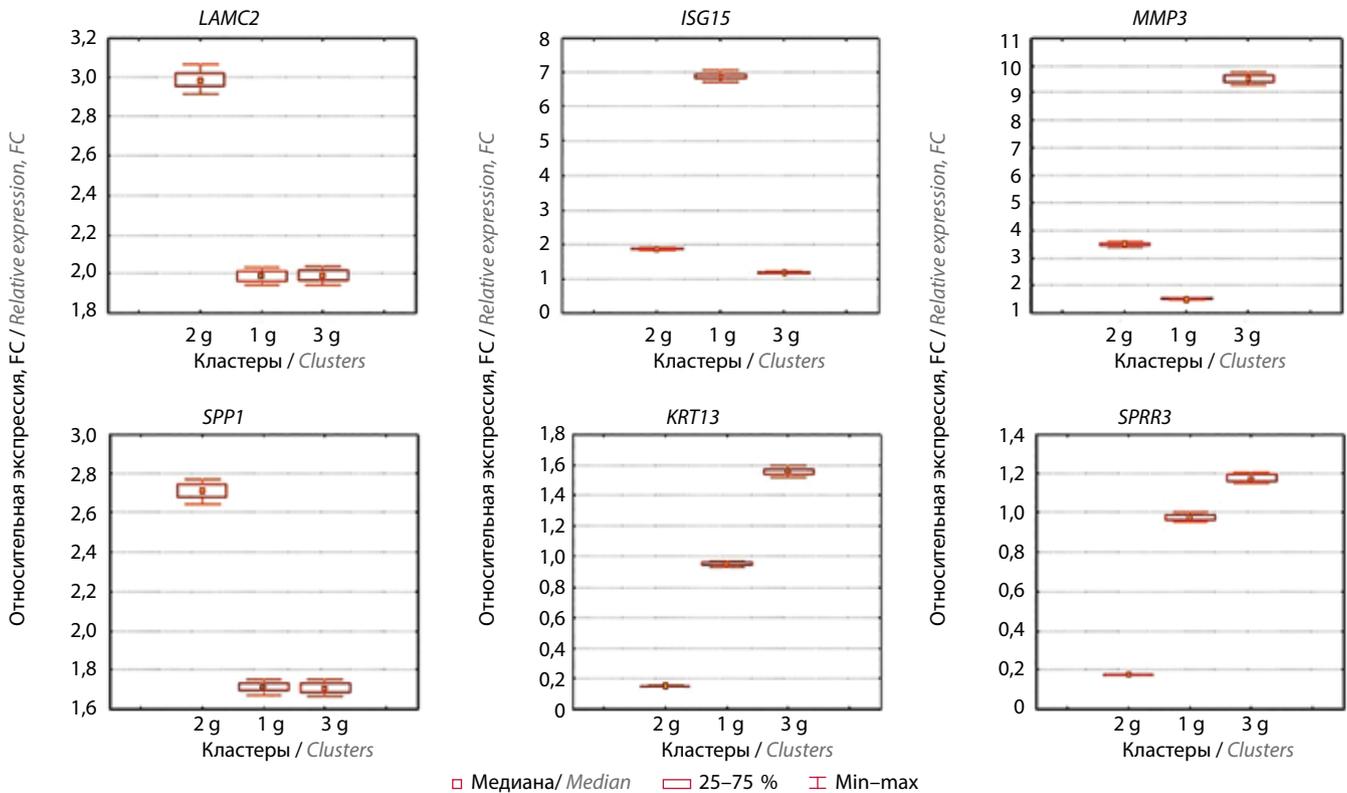


Рис. 6. Дифференциальная экспрессия генетических локусов LAMC2, ISG15, MMP3, SPP1, KRT13 и SPRR3 в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 6. Differential expression of LAMC2, ISG15, MMP3, SPP1, KRT13 and SPRR3 genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

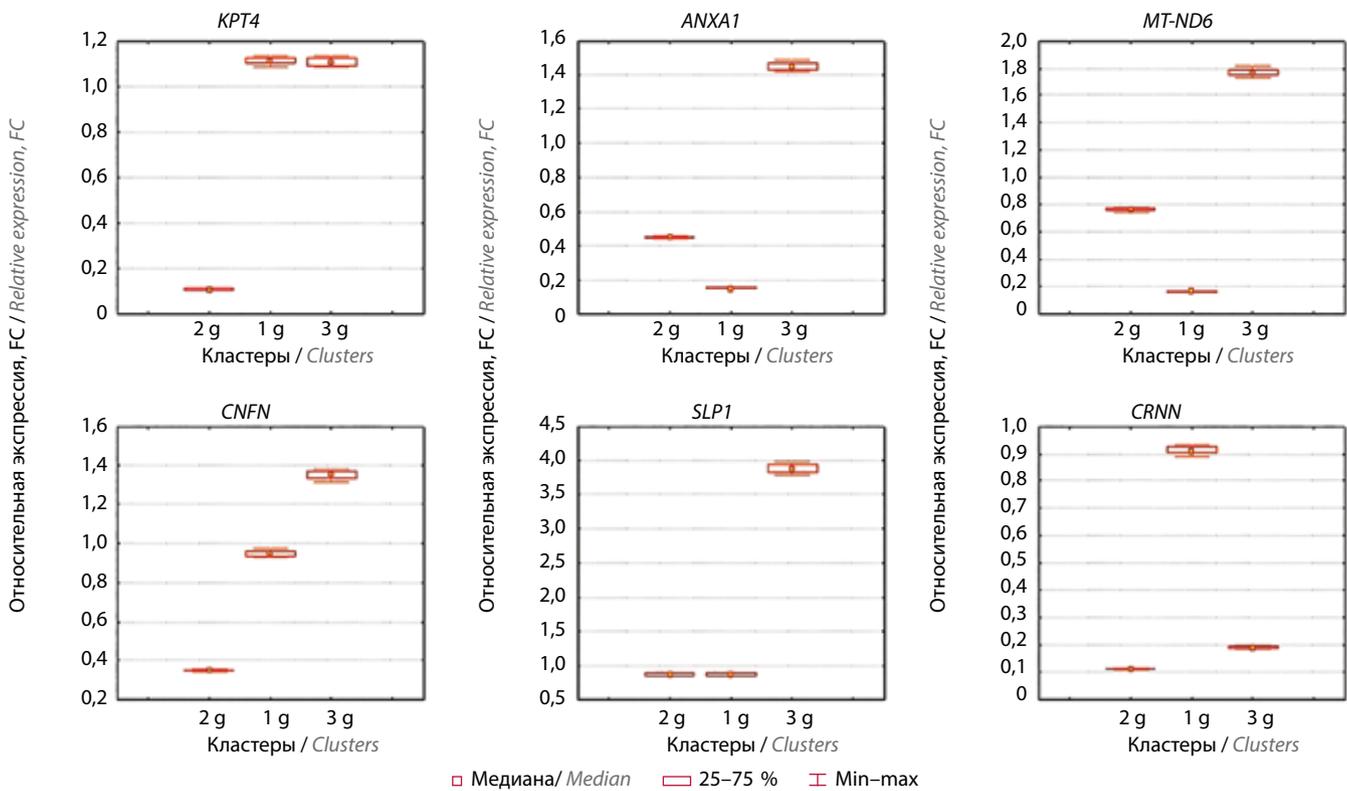


Рис. 7. Дифференциальная экспрессия генетических локусов KPT4, ANXA1, MT-ND6, CNFN, SLP1 и CRNN в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 7. Differential expression of KPT4, ANXA1, MT-ND6, CNFN, SLP1 and CRNN genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

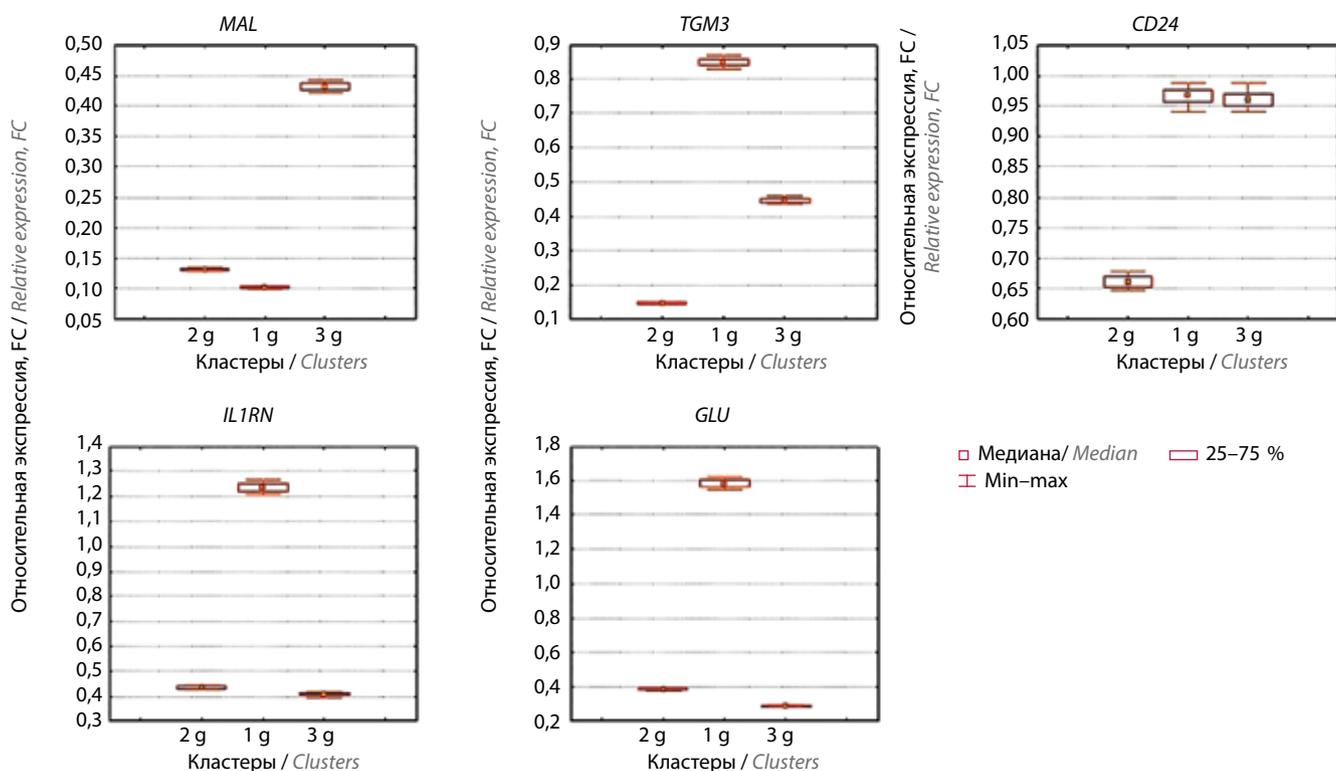


Рис. 8. Дифференциальная экспрессия генетических локусов *MAL*, *TGM3*, *CD24*, *IL1RN* и *GLU* в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 8. Differential expression of *MAL*, *TGM3*, *CD24*, *IL1RN* and *GLU* genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

в формировании внеклеточного матрикса ($Q_{FDR} = 0,004$). Подробная информация о взаимодействии генов и их вовлеченности в те или иные сигнальные пути представлена в табл. 3 и 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленная при валидации данных биоинформационного анализа дифференциальная экспрессия 14 генов в опухолевой и нормальной тканях языка (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*) приводит к изменению ключевых сигнальных каскадов, ответственных за нормальное развитие кожи, дифференцировку клеток эпидермиса, метаболизм коллагена, чувствительность к ультрафиолетовому излучению 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 условиях клеточная биология эпителия языка жестко контролируется различными сигнальными путями, регулируемыми деление, дифференцировку и старение клеток. Сигнальные пути кератиноцитов могут быть разнообразными и одновременно содержать одни и те же ключевые функциональные элементы [20].

Измененные метаболические пути являются движущей силой для раковых клеток, чтобы получить

полезную энергию или уклониться от иммунного надзора. Это позволяет предположить, что такие изменения можно использовать для разработки биомаркеров и терапевтических мишеней [21]. Действительно, нарушение регуляции отдельных или множественных метаболических путей изучалось в качестве диагностических или прогностических биомаркеров при нескольких видах рака человека. Сообщалось, что несколько метаболических сигнатур на уровне транскрипции предсказывают выживаемость пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой и раком яичников [22]. Тем не менее большинство исследований обычно фокусировались на прогностических признаках, основанных на генах, участвующих в одном метаболическом пути, в то время как другие метаболические аномалии при раке могли игнорироваться. Таким образом, интегративная сигнатура, основанная на множественных наборах генов, связанных с метаболизмом, может лучше отражать полные метаболические нарушения регуляции при раке и быть очень результативной в прогнозировании. Всесторонний анализ метаболических путей при плоскоклеточном раке головы и шеи уже позволил создать ряд прогностических моделей и установить прогностические предикторы с высокой эффективностью [23]. Однако поскольку плоскоклеточный рак головы и шеи представляет собой гетерогенную группу эпителиальных злокачественных новообразований с различными этиологическими факторами, онкогенными процессами и методами

Таблица 3. Информация о 42 генах, взаимодействие между которыми выявлено с помощью алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями

Table 3. Information on interactions between 42 genes which were identified using network integration algorithm with several associations

| Ген Gene | Значение оценки гена в сети Value of gene significance in the network | Функция/сигнальный путь Function/signaling pathway |
|---------------|--|---|
| <i>MT-ND6</i> | 0,840 | — |
| <i>KRT4</i> | 0,640 | Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>MMP11</i> | 0,639 | Метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, металлопептидазная активность Collagen metabolism, extracellular matrix organization, metalloproteinase activity |
| <i>CD24</i> | 0,627 | — |
| <i>CNFN</i> | 0,615 | — |
| <i>IL1RN</i> | 0,608 | — |
| <i>CLU</i> | 0,599 | — |
| <i>SPRR3</i> | 0,597 | Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>PTHLH</i> | 0,589 | — |
| <i>MMP1</i> | 0,587 | Ответ клеток на ультрафиолетовое излучение (УФ), метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз и серингидролазы Cell response to ultraviolet (UV) radiation, collagen metabolism, extracellular matrix organization, metalloproteinase and serine hydrolase activity |
| <i>CRNN</i> | 0,580 | — |
| <i>SPP1</i> | 0,579 | — |
| <i>MMP3</i> | 0,573 | Ответ клеток на УФ, метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз и серингидролазы Cell response to UV radiation, collagen metabolism, extracellular matrix organization, metalloproteinase and serine hydrolase activity |
| <i>MAL</i> | 0,565 | Регуляция активности пептидазы Peptidase activity regulation |
| <i>LAMC2</i> | 0,556 | — |
| <i>COL1A1</i> | 0,555 | Метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, развитие кожи Collagen metabolism, extracellular matrix organization, skin development |
| <i>TGM3</i> | 0,540 | Эпидермальная дифференцировка клеток, развитие кожи Epidermal cell differentiation, skin development |
| <i>MMP9</i> | 0,537 | Ответ клеток на УФ, метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза Cell response to UV radiation, collagen metabolism, extracellular matrix organization, metalloproteinase activity, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation |
| <i>ANXA1</i> | 0,535 | Активность ингибиторов ферментов, дифференцировка клеток эпидермиса, негативная регуляция активности гидролаз, развитие кожи Activity of enzyme inhibitors, differentiation of epidermal cells, negative regulation of hydrolase activity, skin development |

Продолжение табл. 3

Continuation of table 3

| Ген Gene | Значение оценки гена в сети Value of gene significance in the network | Функция/сигнальный путь Function/signaling pathway |
|------------------|--|--|
| <i>ISG15</i> | 0,534 | — |
| <i>CA9</i> | 0,529 | — |
| <i>KRT13</i> | 0,527 | Дифференцировка клеток эпидермиса, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>SLPI</i> | 0,519 | Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы Activity of endopeptidase inhibitor/regulator |
| <i>TGM1</i> | 0,020 | Дифференцировка клеток эпидермиса, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>RHCG</i> | 0,017 | — |
| <i>SERPINB13</i> | 0,017 | Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза, развитие кожи Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation, skin development |
| <i>SPINK5</i> | 0,017 | Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза, развитие кожи Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation, skin development |
| <i>CRCT1</i> | 0,016 | — |
| <i>LY6D</i> | 0,016 | — |
| <i>KRT6A</i> | 0,016 | Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>DSG3</i> | 0,015 | Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>SPRR1B</i> | 0,015 | Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development |
| <i>MMP10</i> | 0,015 | Метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз Collagen metabolism, extracellular matrix organization, metallopeptidase activity |
| <i>SCEL</i> | 0,014 | Дифференцировка клеток эпидермиса, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, skin development |
| <i>KRT6B</i> | 0,014 | Дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, skin development |

Окончание табл. 3

The end of table 3

| Ген Gene | Значение оценки гена в сети Value of gene significance in the network | Функция/сигнальный путь Function/signaling pathway |
|------------------|--|--|
| <i>CSTA</i> | 0,014 | Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза, развитие кожи Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation, skin development |
| <i>IVL</i> | 0,014 | Дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, ответ на УФ, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, UV response, skin development |
| <i>LYPD3</i> | 0,014 | — |
| <i>TMPRSS11E</i> | 0,014 | Активность серингидролазы Serin hydrolase activity |
| <i>CSTB</i> | 0,014 | Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation |
| <i>S100A7</i> | 0,014 | Дифференцировка клеток эпидермиса, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, skin development |
| <i>SLURP1</i> | 0,014 | — |
| <i>KLK13</i> | 0,013 | Дифференцировка клеток эпидермиса, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, активность серингидролазы, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, keratinization, keratinocyte differentiation, sein hydrolase activity, skin development |

лечения, то дальнейшие исследования в этом направлении являются актуальными.

Стремительное развитие технологии полногеномного секвенирования и баз данных TCGA и GEO позволило создать богатые ресурсы для разработки биомаркеров для улучшения ранней диагностики, стратификации пациентов, персонализированного лечения и прогнозирования [24]. Так, в работе X. Wu и соавт. [25] была показана большая роль 5 метаболических путей в развитии плоскоклеточного рака полости рта. Вызванная онкогенами активация роста клеток может быть связана с повышенным поглощением и биосинтезом аминокислот. Фолаты способствуют одноуглеродному метаболизму, необходимому для биосинтеза пуринов и тимидилатов, а также усиливают репликацию ДНК в опухолевых клетках. Авторы выделили 5 репрезентативных генов в этих сигнальных путях: *DGKG* (диацилглицеролкиназа гамма), *CA9* (карбоангидраза 9), *EXTL2* (экзостозин-подобная гликозилтрансфераза 2), *PGAM1* (фосфоглицератмутаза 1), *TYMS* (тимидилатсинтаза). Показана их дифференциальная экспрессия в опухолевых и нормальных тканях, а также связь с выживаемостью пациентов.

В работе С. L. Estilo и соавт. [26] проанализированы профили экспрессии генов у 20 пациентов с плоскоклеточным раком полости рта. Среди 12 625 генов (ДНК-микрочипы Affymetrix) 77 имели статистически значимую разницу ($p < 0,05$) между опухолями и их соответствующими нормальными тканями: 60 генов были гиперэкспрессированы, 17 – гипоекспрессированы. Эти гены связаны с регуляцией пролиферации клеток, апоптоза, ангиогенеза, инвазии и метастазирования. Также показано участие этих генов в развитии рака языка. Среди сверхэкспрессированных генов можно выделить *MMP1* (самый высокий уровень повышения экспрессии), *MMP7* и *MMP12*. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство из 23 цинкзависимых внеклеточных эндопептидаз человека, участвующих в деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны во время инвазии опухолевых клеток, – вовлечены в развитие ряда опухолей человека, включая плоскоклеточный рак головы и шеи. Неудивительно, что повышенная экспрессия *MMP1*, *MMP7* и *MMP12* связана со злокачественным прогрессированием, а также с плохим исходом при плоскоклеточном раке языка [27, 28]. В нашем исследовании

Таблица 4. Ключевые сигнальные пути и вовлеченность в них исследованных генов и других генов в геноме человека (использован алгоритм сетевой интеграции с несколькими ассоциациями)

Table 4. Key signaling pathways and involvement of the studied and other genes of the human genome in them (network integration algorithm with several associations)

| Сигнальный путь Signaling pathway | Q_{FDR} | Гены в сети Genes in the network | Гены в геноме Genes in the genome |
|--|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Развитие кожи Skin development | 0,000000000000000006 | 18 | 292 |
| Дифференцировка клеток эпидермиса Epidermis cell differentiation | 0,000000000000000009 | 17 | 283 |
| Ороговение Keratinization | 0,0000000000000005 | 12 | 111 |
| Дифференцировка кератиноцитов Keratinocyte differentiation | 0,000000000000009 | 13 | 234 |
| Метаболизм коллагена Collagen metabolism | 0,00003 | 6 | 67 |
| Чувствительность к ультрафиолетовому излучению Sensitivity to ultraviolet radiation | 0,004 | 3 | 11 |
| Формирование внеклеточного матрикса Extracellular matrix formation | 0,004 | 6 | 164 |
| Регуляция активности пептидаз Peptidase activity regulation | 0,004 | 6 | 170 |
| Активность ингибитора эндопептидазы Endopeptidase inhibitor activity | 0,011 | 5 | 115 |
| Активность ингибитора пептидазы Peptidase inhibitor activity | 0,019 | 5 | 135 |
| Активность металлопептидаз Metallopeptidase activity | 0,019 | 5 | 131 |
| Активность серингидролазы Serin hydrolase activity | 0,019 | 5 | 136 |
| Активность регулятора эндопептидазы Endopeptidase regulator activity | 0,020 | 5 | 141 |
| Подавление гидролазной активности Suppression of hydrolase activity | 0,037 | 6 | 272 |
| Ингибирование активности ферментов Enzyme activity inhibition | 0,041 | 6 | 281 |
| Чувствительность к ультрафиолетовому излучению Sensitivity to ultraviolet radiation | 0,074 | 7 | 96 |
| Подавление протеолиза Proteolysis suppression | 0,076 | 5 | 196 |

также была обнаружена гиперэкспрессия генов, кодирующих белки из семейства металлопротеиназ (*MMPI*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP11*).

В работе С.Л. Estilo и соавт. [26] было показано, что гены, участвующие в развитии и дифференцировке эпителия, такие как цитokerатины *KRT16* и *KRT17*, сверхэкспрессированы. Кроме того, гены, которые играют большую роль в ангиогенезе, такие как *HIF-1 α* , кодирующий индуцируемый гипоксией фактор, и *ECGF1*, кодирующий фактор роста эндотелиальных клеток

тромбоцитов, также были гиперэкспрессированы. При этом было обнаружено, что несколько транскриптов генов значительно снижены или отсутствуют в опухоли по сравнению с соответствующими нормальными тканями (*CO-029*, *ZAK1-4*, *hSBP*).

В работе Н. Zhang и соавт. [29] был проведен биоинформационный анализ базы данных GEO и в 31 образце плоскоклеточного рака языка и 26 соответствующих образцах нормальной слизистой оболочки выявлены 1752 дифференциально экспрессирующихся гена,

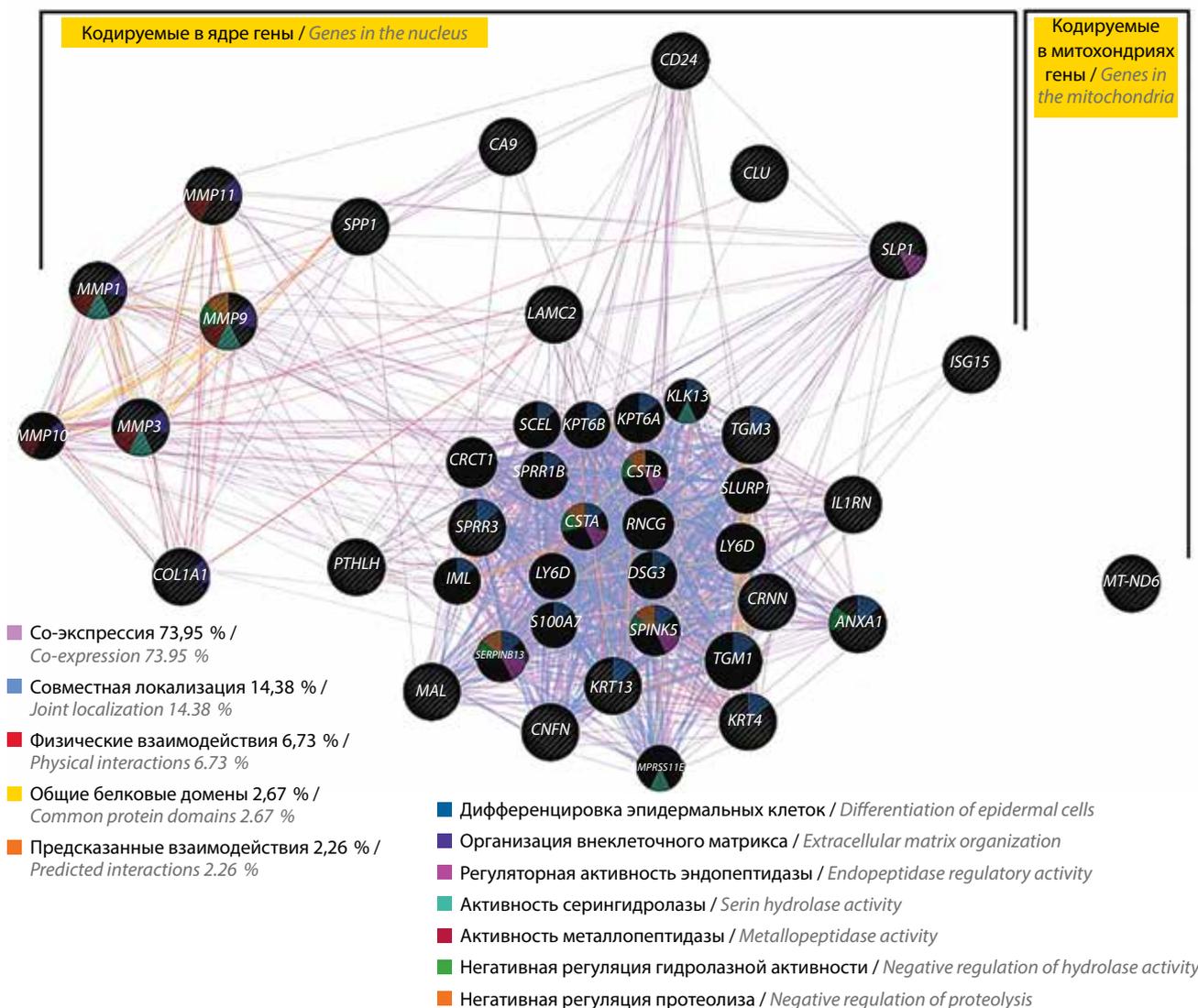


Рис. 9. Взаимодействия между генами и общие сигнальные каскады, выявленные с использованием алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями

Fig. 9. Interactions between the genes and common signaling cascades identified using network integration algorithm with several associations

из которых 1050 гиперэкспрессированных и 702 гипоекспрессированных. Эти гены в основном были задействованы в регуляции клеточной пролиферации, адгезии и апоптоза. Также авторы идентифицировали ключевые гены-концентраторы *RAC1*, *APP*, *EGFR*, *KNG1*, *AGT* и *HRAS*.

Результаты выполненного нами биоинформационного анализа с использованием GEPIA несколько отличаются от данных Н. Zhang и соавт. [29]. Мы выявили 2077 дифференциально экспрессирующихся генов, из которых 1488 генов увеличивали экспрессию и 589 — снижали ее при плоскоклеточном раке языка относительно нормальной ткани.

К тому же в нашем исследовании выявлены 3 молекулярных кластера в образцах рака языка. Проведенный гистологический анализ позволил сопоставить эти кластеры и гистологические подтипы плоскоклеточного рака языка. Так, кластер 1 соответствовал ба-

залоидному подтипу рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP1*, *CA9*, *PTHLH* и *ISG15* и сниженной экспрессией генов *ANXA1*, *MT-ND6* и *MAL* относительно нормальной ткани.

Ген *MMP1* (*CLGN*, *CLG*, matrix metalloproteinase 1) кодирует интерстициальную коллагеназу, также известную как коллагеназа фибробластов, или матриксная металлопротеиназа 1. Этот фермент при нормальных физиологических процессах (эмбриональное развитие, размножение и ремоделирование тканей) участвует в разрушении внеклеточного матрикса, а также играет большую роль в процессах развития артрита и метастазирования [30].

Ген *CA9* кодирует фермент карбоангидразу IX, которая катализируют обратимую гидратацию углекислого газа, участвуя во множестве биологических процессов, включая дыхание, кальцификацию, кислотно-щелочное равновесие, резорбцию костей и образование спинномозговой

Таблица 5. Схожесть паттернов дифференциально экспрессирующихся генетических локусов в различных подтипах рака языка

Table 5. Similarity between the patterns of differentially expressed genetic loci in different subtypes of tongue cancer

| Ген Gene | Количество групп Number of groups | Группа, в которой обнаружена дифференциальная экспрессия Group in which differential expression is found |
|---------------|--------------------------------------|---|
| <i>MAL</i> | 3 | Обычный, акантолитический, базалоидный подтипы Common, acantholytic, basaloid subtypes |
| <i>MMP1</i> | 3 | Обычный, акантолитический, базалоидный подтипы Common, acantholytic, basaloid subtypes |
| <i>ANXA1</i> | 2 | Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes |
| <i>CA9</i> | 2 | Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes |
| <i>CLU</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |
| <i>CRNN</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |
| <i>IL1RN</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |
| <i>MMP11</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |
| <i>MMP3</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |
| <i>MMP9</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |
| <i>MT-ND6</i> | 2 | Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes |
| <i>PTHLH</i> | 2 | Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes |
| <i>TGM3</i> | 2 | Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes |

жидкости, слюны и желудочного сока. *CA9* сверхэкспрессируется при многих типах рака, включая светлоклеточную почечно-клеточную карциному, карциному шейки матки, молочной железы и легких, где она способствует росту опухоли, усиливая опухолевый ацидоз [31, 32].

Экспрессия белка карбоангидразы IX (CA IX) в первую очередь регулируется на уровне транскрипции [33]. Промоторная область гена *CA9* содержит HRE (элемент, реагирующий на гипоксию), где может связываться HIF-1, что позволяет при гипоксических условиях увеличивать количество белка CA IX. Экспрессия этого белка также может посттрансляционно регулироваться металлопротеиназами, которые вызывают потерю эктодомена фермента [34]. Кроме того, исследования, изучающие связь между уровнями карбоангидразы IX и различными клинико-патологическими исходами, предполагают, что экспрессия белка CA IX также может быть ценным прогностическим показателем общей выживаемости [35]. Карбоан-

гидраза IX играет важную роль в подкислении внеклеточного пространства в опухолевой ткани, поскольку обладает очень высокой каталитической активностью с самой высокой скоростью переноса протонов среди известных карбоангидраз [36]. Фермент превращает углекислый газ вне опухоли в бикарбонат и протоны, способствуя внеклеточному ацидозу, стимулируя рост опухоли и регулируя pH цитозоля [37]. Из-за низкой экспрессии в нормальных тканях и сверхэкспрессии во многих опухолевых тканях белок CA IX стал желаемой мишенью для лекарственных средств. Для его ингибирования используется антитело гирентуксимаб, а также ряд небольших молекул (неорганические анионы, сульфаниламиды, фенолы и кумарины) [38].

Ген *PTHLH* кодирует белок, родственные паратиреоидному гормону и секретиремый мезенхимальными стволовыми клетками. Этот белок также секретируется раковыми клетками (рак молочной железы, плоскоклеточный рак легких). *PTHLH* является причиной

большинства случаев гуморальной гиперкальциемии при злокачественных новообразованиях [39].

Ген *ISG15* (интерферон-стимулируемый ген 15) кодирует секретлируемый белок размером 17 кДа. *ISG15* индуцируется интерфероном 1-го типа (IFN-I) и выполняет множество функций, действуя как внеклеточный цитокин и модификатор внутриклеточного белка. Функции *ISG15* разнообразны и различны у разных видов, но обязательно включают активацию продукции γ -интерферона (интерферона 2-го типа, IFN-II) в лимфоцитах, убиквитин-подобную конъюгацию с вновь синтезированными белками и негативную регуляцию ответа IFN-I. Также показано, что *ISG15* является критическим фактором микроокружения для стволовых клеток рака поджелудочной железы [40].

Ген *ANXA1* кодирует белок аннексин A1, также известный как липокортин-1. Аннексин A1 принадлежит к аннексиновому семейству Ca^{2+} -зависимых фосфолипидсвязывающих белков, которые преимущественно расположены на цитозольной поверхности плазматической мембраны. Этот белок обладает ингибирующей активностью в отношении фосфолипазы A2. Поскольку она необходима для биосинтеза мощных медиаторов воспаления, простагландинов и лейкотриенов, аннексин A1 может обладать потенциальной противовоспалительной активностью. Данный белок представляет интерес в качестве потенциального противоракового препарата. При индукции модифицированными нестероидными противовоспалительными препаратами и другими сильнодействующими противовоспалительными препаратами аннексин A1 ингибирует путь передачи сигнала NF- κ B (нуклеарного фактора κ B), который используется опухолевыми клетками для пролиферации и предотвращения апоптоза [41].

Ген *MAL* кодирует высокогидрофобный интегральный мембранный белок, принадлежащий к семейству протеолипидов. Этот белок локализован в эндоплазматическом ретикулуме T-клеток, является кандидатом на роль линкерного белка в передаче сигнала T-клетками и играет большую роль в формировании, стабилизации и поддержании обогащенных гликофинголипидами мембранных микродоменов [42].

Ген *MT-ND6* является частью митохондриального генома и кодирует белок цепи переноса электронов НАДН-убихиноноксидоредуктазу 6 (ND6). Белок ND6 является субъединицей НАДН-дегидрогеназы (убихинона), расположенной во внутренней мембране митохондрий и являющейся самым большим из 5 комплексов электрон-транспортной цепи [43].

Анализ, проведенный N. Li и соавт. (2018), показал, что митохондриальные респираторные гены обычно экспрессируются на более низких уровнях в опухолевых тканях по сравнению с соответствующими нормальными тканями. А экспрессия митохондриально кодируемой НАДН-дегидрогеназы 5 или 6 связана с прогрессированием опухоли при плоскоклеточном раке. Пациенты были разделены на 3 подгруппы

(кластера) на основе профиля экспрессии 13 генов, кодирующих митохондриальные белки, при этом у больных кластера 3 наблюдались более низкие показатели выживаемости по сравнению с больными кластера 1. В ходе дальнейшего анализа экспрессии ядерных генов, проведенного N. Li и соавт. (2018), в 3 кластерах было выявлено обогащение нескольких связанных с раком сигнальных путей в кластере 3, особенно апоптотического сигнального пути, что указывает на потенциальную связь между сниженной экспрессией генов митохондриальной ДНК и повышенной агрессивностью опухоли [44].

Кластер 2 (в нашем исследовании) соответствовал акантолитическому подтипу рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *MMP3* и *SPP1* и сниженной экспрессией генов *KRT13*, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* относительно нормальной ткани. Часть выявленных дифференциально экспрессирующихся генов в кластере 2 совпала с таковыми в кластере 1: *MMP1*, *CA9*, *PTHLH* (гиперэкспрессия) и *ANXA1*, *MT-ND6*, *MAL* (гипоэкспрессия). Различия в перечне дифференциально экспрессирующихся генов (*MMP11*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *SPP1*, *KRT13*, *SPRR3* и др.) в 2 группах пациентов, очевидно, обеспечивают различия в гистологии и течении акантолитического и базалоидного подтипов рака языка.

В частности, в работе Y. Moon и соавт. (2015) с использованием полногеномного транскрипционного анализа была обнаружена значительная активация в метастатических клетках гена *LAMC2* (ламнина γ -2), кодирующего белок базальной мембраны эпителия. Повышенный уровень экспрессии *LAMC2* увеличивал миграцию и инвазию опухолевых клеток, что сопровождалось индукцией эпителиально-мезенхимального перехода [45].

Еще одним интересным геном, гиперэкспрессируемым при акантолитическом подтипе рака языка, является *SPP1*. Данный генетический локус кодирует белок остеопонтин (OPN). Было показано, что OPN стимулирует образование интерлейкина 17 [46]. Остеопонтин сверхэкспрессируется при различных видах рака, включая рак легкого, молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, яичников, меланому и мезотелиому плевры [47]. Этот белок участвует в развитии аденокарциномы поджелудочной железы, связывается с CD44 и интегринами, запуская ингибирование системы комплемента. Остеопонтин также стимулирует метастазирование, вызывая высвобождение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и MMP. Этот процесс стимулируется никотином, который является одним из предполагаемых факторов повышения риска развития рака [48]. В настоящее время разрабатываются антитела против OPN (в том числе hu1A12), которые ингибируют метастазирование в исследованиях *in vivo*, а также при гибридизации

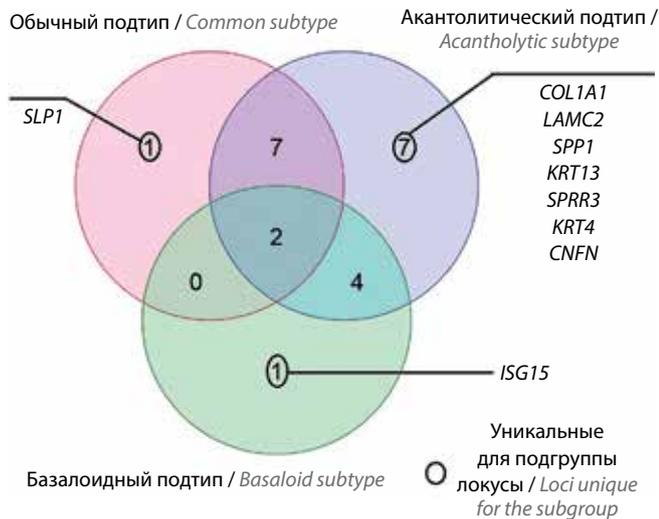


Рис. 10. Сравнение дифференциально экспрессирующихся генетических локусов в различных подтипах рака языка. Диаграмма Венна
Fig. 10. Comparison of differentially expressed genetic loci in different subtypes of tongue cancer. Venn diagram

с антителом против VEGF бевацизумабом [49]. Препарат моноклонального антитела против OPN AOM1 (Anti-Osteopontin Monoclonal antibody), разработанный Pfizer, Inc., демонстрирует перспективность в предотвращении прогрессирования крупных метастатических опухолей [50].

Кластер 3 (в нашем исследовании) соответствовал обычному типу плоскоклеточного рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMPI*, *MMP11*, *MMP9*, *MMP3*, *SLPI* и сниженной экспрессией генов *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *ILIRN* и *CLU*. По количеству дифференциально экспрессирующихся генов этот подтип (10 генов) занимает промежуточное место между базалоидным (7 генов) и акантолитическим (20 генов) подтипами. При этом направления изменения экспрессии 2 генетических локусов (*MMPI* и *MAL*) совпадают во всех 3 группах (рис. 10; табл. 5).

Интересной особенностью обычного гистологического подтипа плоскоклеточного рака языка является повышенная экспрессия гена *SLPI*, кодирующего антилейкопротеиназу (ингибитор секреторной лейкоцитарной протеазы). Этот белок содержится в больших количествах в слизистой оболочке бронхов, шейки матки, носа и слюне [51]. В обычных физиологических условиях *SLPI* ингибирует эластазу лейкоци-

тов человека, которая секретируется во время воспаления и разрушает бактерии и ткани хозяина [52].

Повышенная экспрессия *SLPI* была обнаружена в различных типах опухолей, и было высказано предположение, что она увеличивает их метастатический потенциал. Было продемонстрировано, что экспрессия белка *SLPI* в метастазах колоректального рака в печени и в соответствующих первичных опухолях связана с худшим исходом. Однако роль *SLPI* до образования отдаленных метастазов, возможно, иная. Так, при колоректальном раке III стадии экспрессия *SLPI* может быть неблагоприятной для опухолей [53].

Таким образом, проведенное исследование позволило установить как общие для всех подтипов плоскоклеточного рака языка паттерны экспрессии генов, так и уникальные транскрипционные особенности каждого гистологического подтипа. Эти особенности могут обеспечивать различные клиническое течение и ответ на терапию этих заболеваний.

Канцерогенез представляет собой сложный биологический процесс, в котором некоторые генетические или эпигенетические события изменяют регуляцию сигнальных путей пролиферации, апоптоза, обеспечивая репликативное бессмертие, способствуя нестабильности генома, перепрограммируя энергетический метаболизм, индуцируя ангиогенез, активируя способность к инвазии и избеганию иммунного надзора [54]. Злокачественная трансформация тканей языка также является кумулятивным результатом дисфункции этих критических биологических реакций на стимулы эндогенных или экзогенных канцерогенов. Всестороннее понимание этих молекулярных особенностей плоскоклеточного рака языка не только дает информацию о поведении опухоли, но и позволяет предположить потенциальные мишени для терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить ряд молекулярных маркеров плоскоклеточного рака языка (*MMPI*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *ILIRN* и *CLU*), а также транскрипционные особенности различных гистологических подтипов данной патологии (обычного, базалоидного и акантолитического).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Льянова А.А., Владимирова Л.Ю., Франциянц Е.М. и др. Молекулярные основы современной таргетной терапии плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта моноклональными антителами. Злокачественные опухоли 2017;7(4):77–87. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-4-77-87

Lyanova A.A., Vladimirova L.Yu., Frantsiyants E.M. et al. Molecular basis of modern targeted therapy for squamous cell carcinoma of the tongue and oral mucosa with monoclonal antibodies. Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumours 2017;7(4):77–87. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-4-77-87

2. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2022;400(10352):563–91. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01438-6
3. Ion Ciucă Mărășescu F.I., Marasescu P.C., Matei M. et al. Epidemiological and histopathological aspects of tongue squamous cell carcinomas-retrospective study. *Curr Health Sci J* 2018;44(3): 211–24. DOI: 10.12865/CHSJ.44.03.03
4. Byers R.M., El-Naggar A.K., Lee Y.Y. et al. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 1998;20(2): 138–44. DOI: 10.1002/(sici)1097-0347(199803)20:2<138::aid-hed7>3.0.co;2-3
5. Neville B., Damm D., Allen C., Chi A. *Oral and maxillofacial pathology*. United States: Elsevier, 2015.
6. Ferris R.L., Blumenschein G. Jr., Fayette J. et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016;375:1856–67. DOI: 10.1056/NEJMoa1602252
7. Lingen M.W., Pinto A., Mendes R.A. et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: Current status and future research. *Oral Dis* 2011;17(1):7–22. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2011.01789.x
8. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–28. DOI: 10.1038/nrg816
9. Kyrgidis A., Tzello T.G., Triaridis S. Melanoma: stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. *J Carcinog* 2010;9:3. DOI: 10.4103/1477-3163.62141
10. 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;2:62–5.
11. Владимирова Л.Ю., Лянова А.А., Франциянц Е.М. и др. Молекулярные механизмы резистентности к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта. Злокачественные опухоли 2018;4:13–25. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-4-13-25
Vladimirova L.Yu., Lyanova A.A., Frantsiyants E.M. et al. Molecular mechanisms of resistance to monoclonal antibodies therapy patients with squamous cell carcinoma of the tongue and mucosa of the oral cavity. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant tumours* 2018;8(4): 13–25. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-4-13-25
12. Hema K.N., Smitha T., Sheethal H.S., Mirnalini S.A. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 2017;21(2):252–9. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_150_17
13. Tang Z., Li Ch., Kang B. et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 2017;45(W1):W98–102. DOI: 10.1093/nar/gkx247
14. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Аберрантная транскрипционная активность генов как фактор радиорезистентности клеток линии HT-29. Современные проблемы науки и образования 2020;3. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29831>.
Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Aberrant transcriptional activity of genes as a factor of Ht-29 cells radioresistance. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education* 2020;3. (In Russ.). Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29831>.
15. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):1–12.
16. Kutilin D.S. Regulation of gene expression of cancer/testis antigens in colorectal cancer patients. *Mol Biol* 2020;54:520–34. (In Russ.). DOI: 10.1134/S0026893320040093
17. Krishnan A., Zhang R., Yao V. et al. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nat Neurosci* 2016;19(11):1454–62. DOI: 10.1038/nn.4353
18. 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):30–44. DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61
Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzhenkova E.A., Kutilin D.S. Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020; 7(2):47–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61
19. Warde-Farley D., Donaldson S.L., Comes O. et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 2010;38(2):214–20. DOI: 10.1093/nar/gkq537
20. Shah S., Pathak P., Gulati N. Cell signaling pathways in oral cancer: a review. *J Applied Dental Med Sci* 2015;1(1):69–75.
21. Chiaradonna F., Moresco R.M., Airoidi C. et al. From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets. *Biotechnol Adv* 2012;30(1):30–51. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.006
22. Wang L., Li X. Identification of an energy metabolism-related gene signature in ovarian cancer prognosis. *Oncol Rep* 2020;43(6):1755–70. DOI: 10.3892/or.2020.7548
23. Xing L., Guo M., Zhang X. et al. A transcriptional metabolic gene-set based prognostic signature is associated with clinical and mutational features in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2020;146(3):621–30. DOI: 10.1007/s00432-020-03155-4
24. Liu J., Lichtenberg T., Hoadley K.A. et al. An Integrated TCGA Pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics. *Cell* 2018;173(2):400–16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.052
25. Wu X., Yao Y., Li Z. et al. Identification of a transcriptional prognostic signature from five metabolic pathways in oral squamous cell carcinoma. *Front Oncol* 2020;10:572919. DOI: 10.3389/fonc.2020.572919
26. Estilo C.L., O-charoenrat P., Talbot S. et al. Oral tongue cancer gene expression profiling: identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer* 2009;9:11. DOI: 10.1186/1471-2407-9-11
27. Nagata M., Fujita H., Ida H. et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106:683–9. DOI: 10.1002/ijc.11283
28. Impola U., Uitto V.J., Hietanen J. et al. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004;202(1):14–22. DOI: 10.1002/path.1479
29. 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;23:5924–32. DOI: 10.12659/msm.905035
30. Tallant C., Marrero A., Gomis-Rüth F.X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim. Biophys Acta* 2010;1803(1):20–8. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.04.003
31. Frost S.C., McKenna R. Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. Springer Science & Business Media, 2013.
32. Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):771–94. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
33. Tafreshi N.K., Lloyd M.C., Bui M.M. et al. Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. *Subcell Biochem* 2014;5:221–54. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_12
34. Zatovicova M., Sedlakova O., Svastova E. et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer* 2005;93(11):1267–76. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602861
35. Kirkpatrick J.P., Rabbani Z.N., Bentley R.C. et al. Elevated CAIX expression is associated with an increased risk of distant failure in early-stage cervical cancer. *Biomark Insights* 2008;3:45–55. DOI: 10.4137/bmi.s570

36. Hilvo M., Baranauskiene L., Salzano A.M. et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008;283(41):27799–809. DOI: 10.1074/jbc.M800938200
37. Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):771–94. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
38. De Simone G., Supuran C.T. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804 (2):404–9. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.07.027
39. Rausch V., Sala V., Penna F. et al. Understanding the common mechanisms of heart and skeletal muscle wasting in cancer cachexia. *Oncogenesis* 2021;10(1):1. DOI: 10.1038/s41389-020-00288-6
40. Sainz B., Martín B., Tatari M. et al. ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2014;74(24):7309–20. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1354
41. Zhang Z., Huang L., Zhao W., Rigas B. Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2010;70(6):2379–88. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4204
42. GeneCards: The Human Gene Database. MAL mal, T-cell differentiation protein. Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAL>.
43. Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2013. Pp. 581–620.
44. Li N., Zhao J., Ma Y. et al. Dissecting the expression landscape of mitochondrial genes in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Oncology Letters* 2018;16(3):3992–4000. DOI: 10.3892/ol.2018.9113
45. Moon Y., Rao G., Kim J. et al. LAMC2 enhances the metastatic potential of lung adenocarcinoma. *Cell Death Differ* 2015;22(8):1341–52. DOI: 10.1038/cdd.2014.228
46. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13(2):139–45. DOI: 10.1038/nm1551
47. Wang K.X., Denhardt D.T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(5–6):333–45. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.08.001
48. Sakata M., Tsuruha J.I., Masuko-Hongo K. et al. Autoantibodies to osteopontin in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001;28(7):1492–5.
49. Clay R., Siddiqi S.A. Recent advances in molecular diagnostics and therapeutic targets for pancreatic cancer. *Theranostic Approach Pancreatic Cancer* 2019:325–67.
50. Farrokhi V., Chabot J.R., Neubert H., Yang Z. Assessing the feasibility of neutralizing osteopontin with various therapeutic antibody modalities. *Sci Rep* 2018;8(1):7781.
51. Claus A., Lilja H., Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J* 2002;368(1):233–42. DOI: 10.1042/BJ20020869
52. Belaouaj A., Kim K.S., Shapiro S.D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 2000;89(5482):1185–8. DOI: 10.1126/science.289.5482.1185
53. Nugteren S., den Uil S.H., Delis-van Diemen P.M. et al. High expression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in stage III microsatellite stable colorectal cancer is associated with reduced disease recurrence. *Sci Rep* 2022;12:12174. DOI: 10.1038/s41598-022-16427-5
54. Chen S.H., Hsiao S.Y., Chang K.Y., Chang J.Y. New insights into oral squamous cell carcinoma: from clinical aspects to molecular tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2021;22(5):2252. DOI: 10.3390/ijms22052252

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка концепции исследования, проведение биоинформационного анализа, выполнение экспериментальной части работы, написание текста статьи;

А.Э. Данилова: сбор биологического материала, выполнение экспериментальной части работы, написание текста статьи;

А.Ю. Максимов: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование;

А.В. Снежко: анализ и интерпретация данных, научное редактирование;

М.А. Енгибарян: разработка дизайна исследования, научное редактирование.

Authors' contributions

D.S. Kutilin: development of the research concept, bioinformatics analysis, experimental part of the work, article writing;

A.E. Danilova: collection of biological material, implementation of the experimental part of the work, article writing;

A.Yu. Maksimov: study design development, data analysis and interpretation, scientific editing;

A.V. Snezhko: analysis and interpretation of data, scientific editing;

M.A. Engibaryan: research design development, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

А.Ю. Максимов / A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-9471-3903>

А.В. Снежко / A.V. Snezhko: <https://orcid.org/0000-0003-3998-8004>

М.А. Енгибарян / M.A. Engibaryan: <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 14 от 16.10.2019).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the bioethics committee of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 14 of 10/16/2019).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 16.09.2022. **Принята к публикации:** 16.01.2023.

Article submitted: 16.09.2022. **Accepted for publication:** 16.01.2023.