

# УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ  
ЖУРНАЛ



*Мутации ESR1 и LYN,  
ассоциированные с гормональной  
резистентностью рака яичников*

*Мутация с.470C>T гена CHEK2  
и риск развития рака молочной  
железы в российской популяции*

*Исследование особенностей  
нейрофиброматоза 1-го типа  
в Республике Башкортостан*

*Влияние гипоксии на секретом  
клеток мультиформной  
глиобластомы человека*



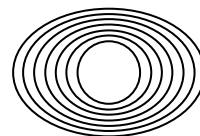
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

 Журнал принят в Scopus

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»  
МИНЗДРАВА РОССИИ

# УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное  
бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский  
исследовательский центр  
онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России

Онлайн-версия журнала  
доступна по адресу:  
<http://umo.abvpress.ru/jour>

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ы Й   Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й   Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й   Ж У Р Н А Л

*Главная задача журнала «Успехи молекулярной онкологии» – публикация современной информации о проведенных фундаментальных и клинико-экспериментальных исследованиях в области молекулярной онкологии.*

*Цель издания – дать читателям представление об актуальных направлениях современной молекулярной онкологии, ознакомить с наиболее значимыми работами отечественных и зарубежных исследователей в этой области, создать общую площадку, на которой специалисты разных областей, включая онкологов, молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, вирусологов, химиотерапевтов, смогут поделиться результатами своих научных исследований.*

О С Н О В А Н   В   2 0 1 4   Г .

**1**   Т О М 8  
'21

**Учредители:**  
ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
ООО «ИД «АБВ-пресс»

**Адрес редакции:**  
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,  
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.  
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)

[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

**Прием статей:**  
онлайн на сайте  
<http://umo.abvpress.ru/jour>

или по адресу  
[adv.mol.onc@ronc.ru](mailto:adv.mol.onc@ronc.ru)

*Выпускающий редактор Л.К. Пряхина  
Корректор Р.В. Журавлева  
Дизайн Е.В. Степанова  
Верстка О.В. Гончарук*

*Служба подписки и распространения  
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,  
[base@abvpress.ru](mailto:base@abvpress.ru)*

*Журнал зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных  
технологий и массовых*

*коммуникаций (ПИ № ФС77-57560  
от 08.04.2014)*

**При полной или частичной  
перепечатке материалов ссылка  
на журнал «Успехи молекулярной  
онкологии» обязательна.**

**Редакция не несет ответственности  
за содержание публикуемых  
рекламных материалов.**

**В статьях представлена точка  
зрения авторов, которая может  
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN: 2313-805X (Print)  
ISSN: 2413-3787 (Online)  
Успехи молекулярной онкологии.  
2021. Том 8. № 1. 1–48.  
Сдано в печать: 29.04.2021.  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2021  
Подписной индекс в каталоге  
«Пресса России» – 93562  
Отпечатано в типографии  
«Мэйл Текнолоджи». 105082,  
Москва, Переведеновский  
переулок, дом 13 строение 16.  
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Красильников Михаил Александрович**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

## ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

**Якубовская Марианна Геннадиевна**, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

## ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

**Гудкова Маргарита Владимировна**, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Берштейн Лев Михайлович**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Боженко Владимир Константинович**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

**Бойчук Сергей Васильевич**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

**Глушанкова Наталия Александровна**, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Гудков Андрей Владимирович**, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

**Животовский Борис Давидович**, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

**Имянитов Евгений Наумович**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Казанский Дмитрий Борисович**, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Карпухин Александр Васильевич**, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

**Кжышковска Юлия Георгиевна**, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейма университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

**Лазаревич Наталья Леонидовна**, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Мазуренко Наталья Николаевна**, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Миркин Сергей Моисеевич**, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

**Сергеева Наталья Сергеевна**, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

**Степанова Евгения Владиславовна**, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)

**Чевкина Елена Максимовна**, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Чердынцева Надежда Викторовна**, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия)

**Юришич Владимир**, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Белицкий Геннадий Альтерович**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Гурцевич Владимир Эдуардович**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Давыдов Михаил Иванович**, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

**Зарилде Давид Георгиевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

**Копнин Борис Павлович**, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Кубасова Ирина Юрьевна**, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Кушлинский Николай Евгеньевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Лихтенштейн Анатолий Владимирович**, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Тюляндин Сергей Алексеевич**, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

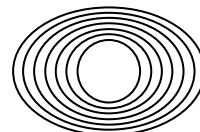
The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

 The journal was accepted into Scopus

The journal's electronic version is available in the DOAJ.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER  
OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

# ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin National Medical  
Research Center of Oncology,  
Ministry of Health of Russia

Online version of the journal  
is available at:  
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

*The main objective of the journal "Advances in Molecular Oncology" is publication of current information on basic, clinical and experimental research in molecular oncology.*

*The publication aim to provide insight into currently important areas of modern molecular oncology; present the most significant studies from Russian and foreign specialists in this field; create a forum for various researchers, including oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, chemotherapists to share the results of their scientific research.*

FOUNDED IN 2014

**1** Vol. 8  
'21

**Founders:**

N.N. Blokhin National Medical  
Research Center of Oncology,  
Ministry of Health of Russia;  
PH "ABV-press"

**Editorial Office:**

Research Institute  
of Carcinogenesis,  
Floor 3, 24 Build. 15  
Kashirskoe Shosse, Moscow  
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

**Article submission:**

on-line at <http://umo.abvpress.ru/jour>  
or by e-mail to [adv.mol.onc@ronc.ru](mailto:adv.mol.onc@ronc.ru)

*Managing editor* L.K. Pryakhina  
*Proofreader* R.V. Zhuravleva  
*Designer* E.V. Stepanova  
*Maker-up* O.V. Goncharuk

*Subscription & Distribution Service*  
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,  
[base@abvpress.ru](mailto:base@abvpress.ru)

*The journal was registered  
at the Federal Service for Surveillance  
of Communications, Information*

*Technologies, and Mass Media  
(III No. ΦC77-57560  
dated 08 April 2014).*

**If materials are reprinted in whole  
or in part, reference must necessarily  
be made to the journal "Uspekhi  
molekulyarnoy onkologii".**

**The editorial board is not responsible  
for advertising content.**

**The authors, point of view given  
in the articles may not coincide  
with the opinion of the editorial board.**

ISSN: 2313-805X (Print)  
ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.  
2021. Vol. 8 No. 1. 1–48.

Submitted: 29.04.2021.

© PH "ABV-Press", 2021  
Pressa Rossii catalogue index: 93562

Printed at the Mail Technology Ltd  
105082, Moscow, Perevedenovsky lane,  
13 building 16.

1000 copies.

Free distribution.

**EDITOR-IN-CHIEF**

**Krasil'nikov Mikhail A.**, DSc, PhD, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)

**DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF**

**Yakubovskaya Marianna G.**, MD, PhD, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**EXECUTIVE EDITOR**

**Gudkova Margarita V.**, PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**EDITORIAL BOARD**

**Berstein Lev M.**, MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

**Bozhenko Vladimir K.**, MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)

**Boychuk Sergey V.**, MD, PhD, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical City of the Ministry of Health of Russia (Kazan, Russia)

**Gloushankova Natalia A.**, DSc, PhD, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Gudkov Andrey V.**, DSc, PhD, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Head of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)

**Zhivotovskiy Boris D.**, DSc, PhD, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)

**Imyanitov Eugeny N.**, MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

**Kazansky Dmitry B.**, DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Karpukhin Aleksander V.**, DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)

**Kzhyskovska Juliya G.**, DSc, PhD, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)

**Lazarevich Natalia L.**, DSc, PhD, Professor, Head of the Department of the Immunochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Mazurenko Natalia N.**, DSc, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Mirkin Sergey M.**, Professor, White Family Department of Biology, Head in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)

**Sergeeva Natalia S.**, DSc, MD, PhD, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Stepanova Evgenia V.**, MD, PhD, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)

**Tchevkina Elena M.**, DSc, PhD, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Tcheryntseva Nadezhda V.**, DSc, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia)

**Jurisc Vladimir**, Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)

**EDITORIAL COUNCIL**

**Belitsky Gennady A.**, MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Gurtsevitch Vladimir E.**, MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Davydov Mikhail I.**, MD, PhD, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

**Zaridze David G.**, MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

**Kopnin Boris P.**, DSc, PhD, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Kubasova Irina Yu.**, PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Kushlinskii Nikolay E.**, MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Lichtenstein Anatoly V.**, DSc, PhD, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

**Tjulandin Sergey A.**, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Scientific Research, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

---

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

## 1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа. **Бланк сопроводительного письма** (заполненный, подписанный всеми авторами, с подписью руководителя и круглой печатью учреждения) отсканировать и загрузить как дополнительный файл при подаче рукописи в редакцию (в формате \*.pdf или \*.jpg). Файл назвать «... (фамилия, инициалы) первого автора. Сопроводительное письмо». Для каждой указанной в рукописи организации необходимо представить отдельное сопроводительное письмо.

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

## 2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
  - фамилия, имя, отчество полностью,
  - занимаемая должность,
  - ученая степень, ученое звание,
  - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
  - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: [http://elibrary.ru/projects/science\\_index/author\\_tutorial.asp](http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp)),
  - контактный телефон,
  - рабочий адрес с указанием индекса,
  - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

## 3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

**4. Объем статей** (без учета иллюстраций и списка литературы)

**Оригинальная статья** – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

**Описание клинических случаев** – не более 8 страниц.

**Обзор литературы** – не более 20 страниц.

**Краткие сообщения и письма в редакцию** – 3 страницы.

## 5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

## 6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- одобрение протокола исследования комитетом по биоэтике (с указанием номера и даты протокола),

- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т.д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

## 7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

**Фотографии** представляются в форматах TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

**Рисунки, графики, схемы, диаграммы** должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисовочными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «А», «Б» и т.д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т.д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисовочной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

**Таблицы** должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

## 8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимеразная цепная реакция (ПЦР)).

## 9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

**Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.**

## Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

**Материалы для публикации принимаются** по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour>.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

*Е.А. Шестакова*

Мутации в генах эстрогенового рецептора  $\alpha$  (*ESR1*) и киназы семейства SRC (*LYN*), ассоциированные с резистентностью к гормонотерапии рака яичников ..... 10

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Р.Н. Мустафин, М.А. Бермишева, Р.Р. Валиев, Э.К. Хуснутдинова*

Нейрофиброматоз 1-го типа: результаты собственного исследования (Республика Башкортостан) ..... 17

*Е.И. Новикова, В.К. Боженко, Е.А. Кудинова, В.А. Солодкий*

Исследование влияния генетического варианта с.470Т>С в гене *CHEK2* на повышение риска развития рака молочной железы у населения Российской Федерации ..... 26

*Т.И. Кушнир, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко*

Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека ..... 32

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

*Г.О. Скрябин, А.В. Комельков, П.Б. Копнин, И.И. Никишин, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина*

Влияние нокдауна кавеолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легких ..... 41

## НЕКРОЛОГ

Памяти профессора Аллы Александровны Ставровской (1932–2020) ..... 47

## REVIEWS

*E.A. Shestakova*

- Estrogen receptor  $\alpha$  (*ESRI*) and SRC family kinase (*LYN*) gene's mutations associated with ovarian cancer endocrine therapy resistance ..... 10

## EXPERIMENTAL REPORTS

*R.N. Mustafin, M.A. Bermisheva, R.R. Valiev, E.K. Khusnutdinova*

- Neurofibromatosis type 1: results of our own study (Republic of Bashkortostan) ..... 17

*E.I. Novikova, V.K. Bozhenko, E.A. Kudinova, V.A. Solodkiy*

- Studying of the effect of the genetic variant c.470T>C in the *CHEK2* gene on increasing the risk of breast cancer in the population of the Russian Federation ..... 26

*T.I. Kushnir, N.E. Arnotskaya, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.K. Bekyashev, V.E. Shevchenko*

- The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells ..... 32

## SHORT REPORT

*G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, P.B. Kopnin, I.I. Nikishin, S.A. Kuzmichev, E.M. Tchevkina*

- Effect of caveolin-1 knockdown on the protein composition of extracellular vesicles secreted by non-small cell lung cancer cells ..... 41

## OBITUARY

- In memory of of Professor Alla Alexandrovna Stavrovskaya (1932–2020) ..... 47



DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-10-16



# Мутации в генах эстрогенового рецептора $\alpha$ (*ESR1*) и киназы семейства SRC (*LYN*), ассоциированные с резистентностью к гормонотерапии рака яичников

**Е.А. Шестакова**

Группа молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Елена Анатольевна Шестакова elenaanshestakova@mail.ru

В последнее время появляются многочисленные данные о мутациях в гене *ESR1* (*mutESR1*), кодирующем эстрогеновый рецептор  $\alpha$  (ЭР $\alpha$ ), и гене, кодирующем белок из семейства SRC нерецепторных тирозинкиназ, *LYN* (*mutLYN*), ассоциированных с резистентностью опухолей к эндокринной терапии. Такие мутации могут рассматриваться в качестве маркеров эффективности эндокринной терапии. В случае гинекологических злокачественных новообразований, включая рак яичников, наиболее часто наблюдаются *mutESR1*, а именно *ESR1*<sup>L536H/P/R/V</sup>, *ESR1*<sup>Y537S/N/C/H</sup>, *ESR1*<sup>D538G</sup>, возникающие при лечении пациенток с использованием гормонотерапии, в особенности ингибиторов ароматазы. Идентифицированы также *mutLYN*: *LYN*<sup>E159K</sup>, *LYN*<sup>D189Y</sup>, *LYN*<sup>K209N</sup>, *LYN*<sup>A370T</sup>, *LYN*<sup>G418R</sup>, *LYN*<sup>A503D</sup>. Мутации в генах *ESR1* и *LYN* ассоциированы с резистентностью к эндокринной терапии рака яичников, так как увеличивают транскрипционную активность ЭР $\alpha$  и каталитическую активность киназы *LYN* соответственно. Кроме того, наблюдается взаимосвязь генов *ESR1* и *LYN* на уровне кодируемых ими белков, так как киназы семейства SRC, к которым относится *LYN*, активируют транскрипцию генов-мишеней ЭР $\alpha$ , фосфорилируя рецептор по аминокислотному остатку Y537. При этом в опухолях с резистентностью к эндокринной терапии наиболее часто выявляются мутации ЭР $\alpha$  по аминокислоте Y537.

Задачей обзорной статьи был анализ клинических корреляций использования *mutESR1* и *mutLYN* и резистентности рака яичников к эндокринной терапии, раскрывающий перспективы использования *mutESR1* и *mutLYN* в качестве новых предиктивных маркеров и поиска более эффективных противоопухолевых средств. Обсуждены данные, представленные в поисковой системе PubMed за последние 20 лет, полученные с использованием следующих ключевых слов: *ESR1*, *LYN*, mutation(s), estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), kinase *LYN*, SRC family kinases, ovarian cancer, gynecologic(al) cancer.

**Ключевые слова:** ген *ESR1*, ген *LYN*, мутация, прогноз, рак яичников, резистентность, эстрогеновый рецептор  $\alpha$ , киназа *LYN*, эндокринная терапия

**Для цитирования:** Шестакова Е.А. Мутации в генах эстрогенового рецептора  $\alpha$  (*ESR1*) и киназы семейства SRC (*LYN*), ассоциированные с резистентностью к гормонотерапии рака яичников. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(1):10–6. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-10-16.

## Estrogen receptor $\alpha$ (*ESR1*) and SRC family kinase (*LYN*) gene's mutations associated with ovarian cancer endocrine therapy resistance

**E.A. Shestakova**

Tumor Molecular Marker Group of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy Laboratory, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow 115478, Russia

**Contacts:** Elena Anatolevna Shestakova elenaanshestakova@mail.ru

Recently multiple data accumulated concerning mutations in the *ESR1* gene coding estrogen receptor  $\alpha$  (*mutESR1*) and in the *LYN* gene coding non receptor tyrosine kinase SRC family member (*mutLYN*) that are associated with endocrine therapy resistance and that could be considered as markers of endocrine therapy efficiency. In case of gynecologic cancers including ovarian cancer the most frequent *mutESR1* are *ESR1*<sup>L536H/P/R/V</sup>, *ESR1*<sup>Y537S/N/C/H</sup>, *ESR1*<sup>D538G</sup> that emerge in the course of hormone therapy especially using aromatase inhibitors. *mutLYN* including *LYN*<sup>E159K</sup>, *LYN*<sup>D189Y</sup>,

*LYN<sup>K209N</sup>, LYN<sup>A370T</sup>, LYN<sup>G418R</sup>, LYN<sup>A503D</sup>* are also identified. *mutESR1* and *mutLYN* increase transcriptional activity of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) coded with *ESR1* gene and catalytic activity of LYN kinase inducing endocrine therapy resistance. Interdependence of *ESR1* and *LYN* genes is revealed at the level of proteins that they code as the kinases of the SRC family including LYN activate ER $\alpha$ -dependent transcription due to the phosphorylation of ER $\alpha$  at Y537 amino-acid residue that is the most frequently mutated in tumors with endocrine therapy resistance.

The aim of the review is revealing the clinical correlations of *mutESR1* and *mutLYN* with the ovarian cancer endocrine therapy resistance that opens perspectives of *mutESR1* and *mutLYN* use as new predictive markers of ovarian cancer and development of more efficient anti-tumor medicaments. In the review the information obtained from PubMed database for the last 20 years using the following key words: *ESR1*, *LYN*, mutation(s), estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), LYN kinase, SRC family kinases, ovarian cancer, gynecologic(al) cancer is discussed.

**Keywords:** *ESR1* gene, *LYN* gene, mutation, prognosis, ovarian cancer, resistance, estrogen receptor  $\alpha$ , LYN kinase, endocrine therapy

**For citation:** Shestakova E.A. Estrogen receptor  $\alpha$  (*ESR1*) and SRC family kinase (*LYN*) gene's mutations associated with ovarian cancer endocrine therapy resistance. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(1):10-6. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-10-16.

## ВВЕДЕНИЕ

Резистентность к эндокринной терапии представляет собой одну из основных проблем лечения гинекологических злокачественных новообразований. Несмотря на всестороннее изучение резистентности к гормонотерапии [1, 2], в последние годы появляются новые данные о еще недостаточно изученном механизме возникновения резистентности к эндокринной терапии, связанном с появлением мутаций в самом гене *ESR1* (*mutESR1*) [3–9], а также в гене нерецепторной тирозинкиназы семейства SRC *LYN* (*mutLYN*) [10, 11]. В связи с этим в ряде лабораторий стали изучать *mutESR1* и *mutLYN* в качестве потенциальных мишеней противоопухолевой терапии, а также прогностических и предиктивных биомаркеров, предсказывающих ее эффективность.

В опухолях яичников наиболее часто выявляются *mutESR1*: *ESR1<sup>L536H/P/R/V</sup>*, *ESR1<sup>Y537S/N/C/H</sup>*, *ESR1<sup>D538G</sup>*, несколько реже — *ESR1<sup>E380Q</sup>*, *ESR1<sup>V422del</sup>*, *ESR1<sup>S463P</sup>*, *ESR1<sup>L469V</sup>* (см. рисунок). Эти мутации во многих случаях появляются в ходе проведения гормонотерапии и особенно с использованием ингибиторов ароматазы [7–9]. В гене *LYN* идентифицированы мутации *LYN<sup>E159K</sup>*, *LYN<sup>D189Y</sup>*, *LYN<sup>K209N</sup>*, *LYN<sup>A370T</sup>*, *LYN<sup>G418R</sup>*, *LYN<sup>A503D</sup>* (см. рисунок) [10, 11]. Как правило, *mutESR1* и *mutLYN* увеличивают транскрипционную активность эстрогенового рецептора  $\alpha$  (ЭР $\alpha$ ), кодируемого геном *ESR1*, и каталитическую активность киназы LYN, соответственно, переводя как ЭР $\alpha$ , так и LYN в активное состояние и вызывая таким образом резистентность гормонозависимых видов рака к эндокринной терапии [4–7, 9, 10]. Кроме того, гены *ESR1* и *LYN* взаимосвязаны также на уровне кодируемых ими белков, так как киназы семейства SRC, к которым относится LYN, фосфорилируют ЭР $\alpha$  по аминокислотному остатку Y537, активируя ЭР $\alpha$ -зависимую транскрипцию [12–14]. Следует отметить, что мутация ЭР $\alpha$  по аминокислоте Y537, которая приводит к его активации, является наиболее частой в опухолях с резистентностью к эндокринной терапии [3–9].

В связи с изложенным целью данной обзорной статьи является анализ корреляций *mutESR1* и *mutLYN*

с резистентностью к эндокринной терапии рака яичников. Перспективы использования *mutESR1* и *mutLYN* в качестве новых предиктивных маркеров особенно актуальны в наши дни в связи с увеличением проведения эндокринной терапии рака яичников и поиском более эффективных противоопухолевых средств.

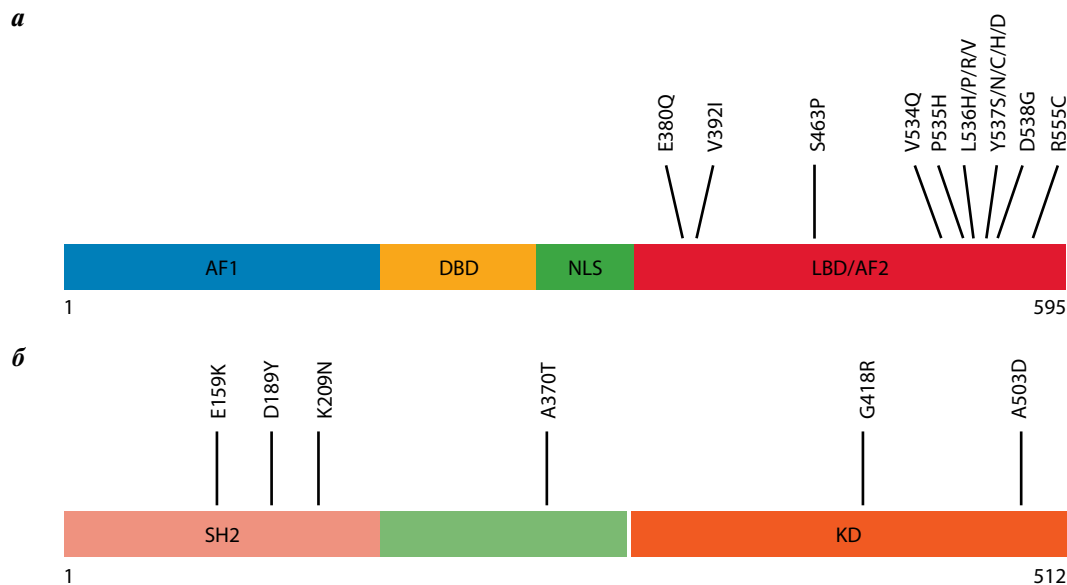
В данном обзоре представлены сведения, полученные в поисковой системе PubMed за последние 20 лет с использованием следующих ключевых слов: *ESR1*, estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), *LYN*, mutation(s), LYN, SRC family kinases, ovarian cancer, gynecologic(al) malignancies, gynecologic(al) cancer.

## РОЛЬ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА $\alpha$ (*ESR1*) В ПРОГНОЗЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ГОРМОНОТЕРАПИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

Активирующие мутации в гене *ESR1* (*mutESR1*) наиболее часто возникают в гормонозависимых опухолях в результате эндокринной терапии с использованием в основном ингибиторов ароматазы [7–9]. В последнее время эндокринная терапия применяется не только в лечении рака молочной железы, для которого она является стандартом в течение многих десятилетий, но и рака яичников.

В соответствии с рекомендациями RUSSCO в лечении злокачественных эпителиальных опухолей яичников, кроме химиотерапевтических средств, применяется также и гормонотерапия с использованием антиэстрогенов и ингибиторов ароматазы [15]. По рекомендациям ESMO–ESGO [16], показанием к применению эндокринной терапии в случае эпителиальных опухолей яичников является увеличение экспрессии ЭР в ткани опухоли, являющееся предиктивным маркером ответа на эндокринную терапию [17–19].

При проведении эндокринной терапии рака яичников часто наблюдается появление активирующих мутаций *mutESR1*, расположенных в лиганд-связывающем домене ЭР и приводящих к изменению аминокислот в позициях 536–538 (*ESR1<sup>L536H/P/R/V</sup>*, *ESR1<sup>Y537S/N/C/H/D</sup>*, *ESR1<sup>D538G</sup>*) и в меньшей степени в других сайтах, таких



Структура мутированных ЭРа (а) и LYN (б) с расположением аминокислотных остатков, измененных в результате мутаций в генах *ESR1* и *LYN* соответственно: а – все аминокислоты в ЭРа, появившиеся в результате мутаций в гене *ESR1*, расположены в лиганд-связывающем домене (LBD), являющемся также доменом активации 2 (AF2); домены ЭРа: AF1 – домен активации 1; DBD – ДНК-связывающий домен; NLS – сигнал локализации в ядре; б – аминокислоты в LYN, возникшие в результате мутаций в гене *LYN*, находятся в основном в домене гомологии с SRC (SH2) и киназном домене KD

The structure of mutated *ERα* (a) and *LYN* (б) with the indication of amino acid residues changed as a result of *ESR1* and *LYN* gene mutations, respectively: а – all amino acids appeared in *ERα* as a result of *ESR1* gene mutations are located in the ligand-binding domain (LBD), being also the activation function domain 2 (AF2); *ERα* domains: AF1 – activation function 1; DBD – DNA binding domain; NLS – nuclear localization signal; б – *LYN* amino acids emerged as the result of *LYN* gene mutations are situated mainly in the SH2 domain (SRC homology 2 domain) and in the Kinase Domain (KD)

как *ESR1*<sup>E380Q</sup>, *ESR1*<sup>V422del</sup>, *ESR1*<sup>S463P</sup>, *ESR1*<sup>L469V</sup> (см. рисунок и таблицу) [8, 9]. Кроме того, *mutESR1* чаще появляются в опухолях пациенток, получающих ингибиторы ароматазы для лечения метастатической болезни, в то время как адъювантная терапия после первичной циторедуктивной операции при раке яичников реже приводит к появлению *mutESR1* [20]. В целом у пациенток, получающих эндокринную терапию, *mutESR1* в опухолях выявляют относительно часто, в то время как у пациенток, которые еще не прошли курс лечения, в первичных опухолях *mutESR1* выявляют существенно реже (3 %) [4].

Следует подчеркнуть, что *mutESR1* возникают преимущественно при раке яичников низкой степени злокачественности [8, 9, 21], при которой показано проведение эндокринной терапии [8, 9, 20, 21]. Серозный рак яичников низкой степени злокачественности, составляющий 5 % от всех случаев рака яичников, на поздних стадиях характеризуется высокой резистентностью к химиотерапии. С учетом высокого уровня экспрессии рецепторов гормонов-мишеней таргетной терапии при данном подтипе рака яичников пациентки проходят лечение, состоящее из первичной циторедуктивной операции, за которой следует адъювантная гормонотерапия, часто с применением ингибиторов ароматазы (летрозол, анастрозол) [8, 9, 20].

К настоящему времени в системе PubMed опубликованы данные трех исследований, в которых изучали ассоциацию *mutESR1* при раке яичников с резистентностью к гормонотерапии [8, 9, 21].

S.L. Gaillard и соавт. в 2019 г. [9] провели анализ клинических характеристик заболевания у 6 пациенток с раком яичников, у которых были выявлены различные *mutESR1*. Данные клинические случаи были отобраны из 9645 пациенток с гинекологическими опухолями на основании геномного профилирования с использованием секвенирования нового поколения. В данном исследовании *mutESR1* встречались в основном при эндометриоидном раке яичников как низкой, так и высокой степени злокачественности и рецидиве серозного рака яичников также высокой степени злокачественности. При этом *mutESR1* чаще выявляли в опухолях с эндометриоидной гистологией, чем с серозной [9].

Еще в двух исследованиях были идентифицированы соматические *mutESR1* при серозном раке яичников низкой степени злокачественности [8, 21]. При этом в каждом из этих исследований *mutESR1* были выявлены в одном клиническом случае. Авторы рассматривают этот параметр как потенциальный прогностический маркер серозного рака яичников низкой степени злокачественности и маркер резистентности к эндокринной терапии данного подтипа рака яичников.

При наиболее распространенном серозном подтипе рака яичников высокой степени злокачественности были выявлены следующие мутации, представленные в порядке уменьшения встречаемости: *TP53*, *BRCA1*, *CSMD3*, *NF1*, *CDK12*, *FAT3*, *GABRA6*, *BRCA2*, *RB1*. При этом частота *mutESR1*, характерных для серозного рака яичников низкой степени злокачественности,

Роль мутаций в гене эстрогенового рецептора  $\alpha$  ( $ESR1$ ) в прогнозе резистентности к гормонотерапии рака яичников

Role of estrogen receptor  $\alpha$  ( $ESR1$ ) gene mutations in the prognosis of ovarian cancer hormone therapy resistance

Мутация в гене $ESR1$ <i>ESR1</i> gene mutation	Клиническая значимость Clinical significance	Источник Source
$ESR1^{Y537S/N/C/H}$	Резистентность к гормонотерапии*, эффективность SERDs/SERMs после возникновения резистентности к ингибиторам ароматазы** Hormonal therapy resistance*, SERDs/SERMs efficiency after acquired aromatase inhibitor resistance**	[8, 9]
$ESR1^{D538G}$	Резистентность к гормонотерапии*, эффективность SERDs/SERMs после возникновения резистентности к ингибиторам ароматазы*** Hormonal therapy resistance*, SERDs/SERMs efficiency after acquired aromatase inhibitor resistance***	[9]
$ESR1^{L536H/P/R/V}$ , $ESR1^{E380}$ , $ESR1^{V422}$ , $ESR1^{S463}$ , $ESR1^{L469}$	Резистентность к гормонотерапии*, эффективность SERDs/SERMs после возникновения резистентности к ингибиторам ароматазы Hormonal therapy resistance*, SERDs/SERMs efficiency after acquired aromatase inhibitor resistance	[9]

\*В большинстве случаев после лечения с использованием ингибиторов ароматазы (анастрозол и др.). \*\*Клинический ответ на фулвестрант, фулвестрант с последующим ингибитором ароматазы (летрозолом), тамоксифен, тамоксифен + мегестрол, тамоксифен с последующим ингибитором рапамицина (эверолимусом). \*\*\*Клинический ответ на фулвестрант.

\*In most cases after the therapy with the aromatase inhibitors (anastrozole and others). \*\*Clinical response to fulvestrant followed by the aromatase inhibitor (letrozole), tamoxifen, tamoxifen + megestrol, tamoxifen followed by the rapamycin inhibitor (everolimus). \*\*\*Clinical response to fulvestrant.

была исключительно низкой [22]. Это еще раз подтверждает необходимость применения различных терапевтических подходов в лечении этих подтипов рака яичников. В случае серозного рака яичников высокой степени злокачественности более широко применяется химиотерапия. Для этого подтипа также необходим поиск новых таргетных препаратов, отличных от гормональных, используемых в лечении серозного рака яичников низкой степени злокачественности.

Несмотря на то что *mutESR1* ассоциированы с резистентностью к эндокринной терапии и главным образом к ингибиторам ароматазы (см. таблицу) [8, 9, 21], соединения, селективно деградирующие ЭР (selective ER degraders, SERDs), а также модулирующие/ингибирующие активность ЭР (selective ER modulators, SERMs), демонстрируют противоопухолевый эффект, в особенности в комбинации с другими химиопрепаратами [8]. У пациенток, имеющих  $ESR1^{Y537S/N/C/H}$  в опухоли, наблюдался клинический ответ на фулвестрант, фулвестрант с последующим применением ингибитора ароматазы летрозолола, тамоксифен, комбинацию тамоксифена и мегестрола, а также на тамоксифен с последующим применением ингибитора рапамицина (эверолимуса) [8, 9]. При наличии  $ESR1^{D538G}$  в опухоли наблюдался эффект фулвестранта [9]. Особенно эффективным оказался SERD AZD9496, находящийся в первой фазе клинических исследований, спонсируемых компанией AstraZeneca (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03236974>) [23]. При этом комбинации фулвестранта с ингибиторами CDK4/6 (палбоциклиб, абемациклиб) и рапамицина (эверолимус), а также тамоксифена с мегестролом и эверолимусом оказались менее эффективным [7, 9, 24]. Было отмечено, что эффективность SERDs/SERMs зависела от

специфической *mutESR1*. Опухоли с  $ESR1^{Y537S}$  оказались наиболее резистентны к SERDs/SERMs, далее по уменьшению резистентности следовали опухоли с  $ESR1^{D538G}$ , а опухоли с  $ESR1^{Y537N/C}$  проявляли наименьшую резистентность к SERDs/SERMs [9]. Таким образом, *mutESR1* представляют собой новые потенциальные предиктивные маркеры ответа опухоли на SERDs/SERMs в комбинации с ингибиторами CDK4/6 и рапамицина.

### РОЛЬ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ КИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА SRC ( $LYN$ ) В ПРОГНОЗЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ГОРМОНОТЕРАПИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

С мутациями *mutLYN* также ассоциирована резистентность к эндокринной терапии гормонозависимых опухолей, что заслуживает специального рассмотрения. Как уже говорилось во введении, киназа  $LYN$  относится к нерецепторным тирозинкиназам семейства SRC. Киназы семейства SRC — это протоонкогены, играющие важную роль в клеточном росте, делении, миграции, регуляции эпителиально-мезенхимального перехода и внутриклеточных сигнальных путей [25, 26], они ассоциированы со злокачественными новообразованиями различных нозологий [12].

Несмотря на то что мутации в генах, кодирующих киназы этого семейства, встречаются редко в опухолях человека, среди тирозинкиназ семейства SRC киназа  $LYN$  характеризуется наличием наибольшего числа мутаций в кодирующем ее гене [10]. *mutLYN* идентифицированы в ряде злокачественных новообразований, включая рак молочной железы (см. рисунок) [10], а также некоторые лейкозы и лимфомы [27, 28]. В клетках рака молочной железы были выявлены следующие мутации  $LYN$ :  $LYN^{E159K}$ ,  $LYN^{D189Y}$ ,  $LYN^{K209N}$ ,

*LYN<sup>A370T</sup>*, *LYN<sup>G418R</sup>*, *LYN<sup>A503D</sup>*. При лейкозах встречалась другая мутация этого гена — *mutLYN<sup>L379P</sup>*.

Следует отметить, что киназы семейства SRC могут непосредственно взаимодействовать с ЭР $\alpha$ , фосфорилируя рецептор по аминокислотному остатку Y537 и таким образом увеличивая его транскрипционную активность [13, 14], при этом дефосфорилирование Y537 в ЭР $\alpha$  приводит к уменьшению резистентности опухолевых клеток к антиэстрогенам [29]. Особый интерес к этим киназам вызван тем, что наблюдается взаимосвязь киназ семейства SRC и ЭР $\alpha$  на уровне белок-белковых взаимодействий, ведущая к изменению резистентности к гормонотерапии.

Полученные данные о наличии *mutLYN* в солидных опухолях пациенток вызвали интерес к дальнейшему изучению нерецепторных тирозинкиназ семейства SRC и особенно *LYN* в доклинических исследованиях и на различных фазах клинических исследований. В данных работах использовали ингибиторы киназ, часто мультикиназный ингибитор дазатиниб, специфичный для нерецепторных тирозинкиназ семейства SRC, ABL, а также ряда рецепторных тирозинкиназ. Дазатиниб препятствует делению и метастазированию клеток, а также вызывает апоптоз опухолевых клеток [30]. Резистентность к эндокринной терапии солидных гормонозависимых опухолей ассоциирована как с *mutLYN*, так и с гиперэкспрессией и активацией киназ семейства SRC, в частности киназы *LYN* [31, 32]. В связи с этим мультикиназный ингибитор дазатиниб применяли в случае опухолей со сверхэкспрессией киназ семейства SRC [30] и далее в исследованиях с *mutLYN* в опухолевых клетках [10].

L.J. Schwarz и соавт. в своей работе определили мутации в гене *LYN* в образцах ткани рака молочной железы с резистентностью к эндокринной терапии, приобретенной в результате лечения ингибитором ароматазы летрозолом [10]. Резистентность определяли по высокому уровню Ki-67, маркера клеточной пролиферации, который также рассматривается и как маркер резистентности к гормонотерапии. В данном исследовании секвенирование всех генов известных киназ (киномное секвенирование) позволило идентифицировать еще одну мутацию в гене *LYN* (*LYN<sup>D189Y</sup>*) при раке молочной железы в дополнение к уже известным мутациям в гене *LYN* в опухолях данной нозологии (*LYN<sup>E159K</sup>*, *LYN<sup>K209N</sup>*, *LYN<sup>A370T</sup>*, *LYN<sup>G418R</sup>*, *LYN<sup>A503D</sup>*), информация о которых содержится в базе данных The Cancer Genome Atlas (см. рисунок). Мутация *LYN<sup>D189Y</sup>* увеличивает каталитическую активность киназы, по-видимому, постоянно поддерживая киназу в активной конформации. При этом мутантный *LYN* стабилизирует ЭР $\alpha$  или влияет на его транскрипцию. Следует также отметить, что мутация *LYN<sup>D189Y</sup>*, в свою очередь, вызывает резистентность к дазатинибу по сравнению с *LYN* дикого типа [10]. Более детальное изучение мутации *LYN<sup>D189Y</sup>* в гене киназы *LYN* показало, что гиперэкспрессия *LYN* дикого типа или наличие *LYN<sup>D189Y</sup>* приво-

дит к резистентности к эндокринной терапии [10]. В связи с этим использование ингибиторов киназ семейства SRC, таких как дазатиниб, может повысить эффективность гормональной терапии или отсрочить появление приобретенной резистентности к такой терапии. Действительно, дазатиниб значительно усиливал эффект фулвестранта в доклинических исследованиях с использованием клеточных линий и перевиваемых опухолей [10]. Несмотря на то что в доклинических экспериментах на культуре клеток проверяется цитотоксичность противоопухолевых средств, такие эксперименты позволяют предположить их потенциальную эффективность, а также возможность использования данных мутаций в качестве маркеров эффективности эндокринной терапии.

Мутация *LYN<sup>A370T</sup>* заслуживает особого внимания, так как была идентифицирована в ходе массового параллельного полногеномного секвенирования ДНК опухолей пациенток с раком молочной железы, получавших лечение ингибиторами ароматазы [11]. Авторы этого исследования рассматривают мутацию *LYN<sup>A370T</sup>* в качестве одной из основных мутаций, связанных с приобретением резистентности к эндокринной терапии.

Доклинические исследования с использованием клеток рака яичников различных линий показали, что клеточные линии с высокой экспрессией гена *LYN* и ряда других генов обладали повышенной чувствительностью к дазатинибу [33]. Результаты, полученные в доклинических исследованиях, открыли перспективы изучения клинической значимости дазатиниба в монотерапии или в комбинации с химиотерапевтическими лекарствами для лечения гормонозависимых опухолей, в частности рака яичников.

В клинических исследованиях I и II фаз мультикиназный ингибитор дазатиниб использовали в монотерапии и в комбинации с другими препаратами для преодоления резистентности к эндокринной терапии, предупреждения возникновения такой резистентности, предотвращения появления метастазов в костях и подавления метастазирования. Такое изучение дазатиниба было проведено в рамках клинического исследования CA180–088 [34]. В исследованиях NCT00696072 и NCT00903006 оценивали эффективность дазатиниба в сочетании с эндокринной терапией с использованием ингибиторов ароматазы (летрозол) или антиэстрогенов (фулвестрант) соответственно в лечении гормонозависимых опухолей [30]. В целом комбинированное ингибирование киназ семейства SRC и ЭР приводило к снижению пролиферативной активности клеток рака молочной железы, резистентных к эндокринной терапии в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* [31, 35–38].

Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований по идентификации новых мутаций в гене *LYN* в ЭР-зависимых опухолях, резистентных к гормонотерапии, и в особенности при раке яичников. Также заслуживает внимания поиск

более эффективных ингибиторов киназы LYN, которые могут быть также использованы в комбинации с ингибиторами ЭР и PI3K. Следует отметить, что глубокое и обширное изучение роли мутаций в гене *LYN* в приобретении резистентности к гормонотерапии рака яичников наблюдается не в такой степени, как при раке молочной железы. В значительной мере это может быть связано с тем, что эндокринную терапию рака яичников стали использовать в клинической практике позже, чем гормонотерапию рака молочной железы.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Мутации в гене *ESR1* (*mutESR1*) возникают при проведении эндокринной терапии рака яичников и в основном с использованием ингибиторов ароматазы. Мутации *mutESR1* появляются преимущественно в опухолях яичников низкой степени злокачественности, в особенности в серозной карциноме яичников низкой степени злокачественности и, по-видимому, в большей степени в опухолях пациенток, получающих эндокринную терапию для лечения метастатической болезни.

В то время как показанием для применения гормональной терапии рака яичников могут являться высокие уровни экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, *mutESR1* могут быть потенциальными предиктивными маркерами для применения препара-

тов, деградирующих и модулирующих эстрогеновые рецепторы (SERDs/SERMs), таких как фулвестрант, тамоксифен, AZD9496 в комбинации с ингибиторами CDK4/6 и рапамицина. При этом эффективность SERDs/SERMs может зависеть от специфичности *mutESR1*: опухоли с *ESR1*<sup>Y537S</sup> проявляют наибольшую резистентность к SERDs/SERMs, опухоли с *ESR1*<sup>D538G</sup> менее резистентны, и опухоли с *ESR1*<sup>Y537N/C</sup> показывают наименьшую резистентность к SERDs/SERMs.

В последнее время появляется все больше данных о роли мутаций в гене киназы семейства SRC *LYN* (*mutLYN*) в приобретении резистентности к гормонотерапии ЭР-положительных опухолей. В настоящее время проводятся клинические исследования ингибиторов киназ, в частности мультифункционального киназного ингибитора дазатиниба, с целью преодоления резистентности гормонозависимых видов рака.

Таким образом, результаты исследований, проанализированных в обзоре, свидетельствуют о перспективности, с одной стороны, идентификации новых мутаций в генах *ESR1* и *LYN* в ЭР-положительных опухолях яичников, резистентных к эндокринной терапии, и, с другой стороны, поиска более эффективных ингибиторов ЭР $\alpha$  и киназы LYN, которые могли бы также быть использованы в комбинации с другими противоопухолевыми лекарствами в лечении рака яичников.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Osborne C.K., Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Ann Rev Med* 2011;62:233–47. PMID: 20887199. DOI: 10.1146/annurev-med-070909-182917.
- Haque M.M., Desai K.V. Pathways to endocrine therapy resistance in breast cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:573. PMID: 31496995. DOI: 10.3389/fendo.2019.00573.
- Tebbit C.L., Bentley R.C., Olson J.A. Jr. et al. Estrogen receptor alpha (*ESR1*) mutant A908G is not a common feature in benign and malignant proliferations of the breast. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40(1):51–4. PMID: 15034868. DOI: 10.1002/gcc.20017.
- Toy W., Shen Y., Won H. et al. *ESR1* ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 2013;45(12):1439–45. PMID: 24185512. DOI: 10.1038/ng.2822.
- Martin L.A., Ribas R., Simigdala N. et al. Discovery of naturally occurring *ESR1* mutations in breast cancer cell lines modelling endocrine resistance. *Nat Commun* 2017;8(1):1865. PMID: 29192207. DOI: 10.1038/s41467-017-01864-y.
- Harrod A., Fulton J., Nguyen V.T.M. et al. Genomic modelling of the *ESR1* Y537S mutation for evaluating function and new therapeutic approaches for metastatic breast cancer. *Oncogene* 2017;36(16):2286–96. PMID: 27748765. DOI: 10.1038/ncr.2016.382.
- Toy W., Weir H., Razavi P. et al. Activating *ESR1* mutations differentially affect the efficacy of ER antagonists. *Cancer Discov* 2017;7(3):277–87. PMID: 27986707. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1523.
- Stover E.H., Feltmate C., Berkowitz R.S. et al. Targeted next-generation sequencing reveals clinically actionable *BRAF* and *ESR1* mutations in low-grade serous ovarian carcinoma. *JCO Precis Oncol* 2018;2:1–12. PMID: 30828692. DOI: 10.1200/PO.18.00135.
- Gaillard S.L., Andreano K.J., Gay L.M. et al. Constitutively active *ESR1* mutations in gynecologic malignancies and clinical response to estrogen-receptor directed therapies. *Gynecol Oncol* 2019;154(1):199–206. PMID: 30987772. DOI: 10.1016/j.ygyno.2019.04.010.
- Schwarz L.J., Fox E.M., Balko J.M. et al. LYN-activating mutations mediate antiestrogen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Invest* 2014;124(12):5490–502. PMID: 25401474. DOI: 10.1172/JCI12573.
- Ellis M.J., Ding L., Shen D. et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012;486(7403):353–60. PMID: 22722193. DOI: 10.1038/nature11143.
- Ishizawa R., Parsons S.J. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004;6(3):209–14. PMID: 15380511. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.09.001.
- Fox E.M., Andrade J., Shupnik M.A. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009;74(7):622–7. PMID: 18996136. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.10.014.
- Sun J., Zhou W., Kaliappan K. et al. ER $\alpha$  phosphorylation at Y537 by Src triggers E6-AP-ER $\alpha$  binding, ER $\alpha$  ubiquitylation, promoter occupancy, and target gene expression. *Mol Endocrinol* 2012;26(9):1567–77. PMID: 22865929. DOI: 10.1210/me.2012-1140.
- Тюляндин С.А., Коломиец Л.А., Морхов К.Ю. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO

- 2019;9(3s2):164–76. [Tjuljandin S.A., Kolomiets L.A., Morkhov K.Yu. et al. Practical recommendations for ovarian cancer, primary peritoneal cancer and uterine duct cancer medicinal therapy. Malignant tumours, Russian Society of Clinical Oncology (RUSSCO) practical recommendations 2019; 9(3s2):164–76. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s2-164-176.
16. Colombo N., Sessa C., du Bois A. et al. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Ann Oncol* 2019;30(5):672–705. PMID: 31046081. DOI: 10.1093/annonc/mdz062.
17. Bowman A., Gabra H., Langdon S.P. et al. CA125 response is associated with estrogen receptor expression in a phase II trial of letrozole in ovarian cancer: identification of an endocrine-sensitive subgroup. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2233–9. PMID: 12114425.
18. Smyth J.F., Gourley C., Walker G. et al. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clin Cancer Res* 2007;13(12): 3617–22. PMID: 17575226. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2878.
19. Gershenson D.M., Sun C.C., Iyer R.B. et al. Hormonal therapy for recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Gynecol Oncol* 2012;125(3):661–6. PMID: 22406638. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.02.037.
20. Fader A.N., Bergstrom J., Jernigan A. et al. Primary cytoreductive surgery and adjuvant hormonal monotherapy in women with advanced low-grade serous ovarian carcinoma: reducing overtreatment without compromising survival? *Gynecol Oncol* 2017;147(1):85–91. PMID: 28768570. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.07.127.
21. McIntyre J.B., Rambau P.F., Chan A. et al. Molecular alterations in indolent, aggressive and recurrent ovarian low-grade serous carcinoma. *Histopathology* 2017;70(3):347–58. PMID: 27575406. DOI: 10.1111/his.13071.
22. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353):609–15. PMID: 21720365. DOI: 10.1038/nature10166.
23. Robertson J.F., Evans A., Henschen S. et al. A randomized, open-label, presurgical, window of opportunity study comparing the pharmacodynamic effects of the novel oral SERD AZD9496 with fulvestrant in patients with ER<sup>+</sup> HER2<sup>-</sup> primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26(16):4242–9. PMID: 32234755. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3387.
24. Weir H.M., Bradbury R.H., Lawson M. et al. AZD9496: an oral estrogen receptor inhibitor that blocks the growth of ER-positive and ESR1-mutant breast tumors in preclinical models. *Cancer Res* 2016;76(11):3307–18. PMID: 27020862. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2357.
25. Choi Y.L., Bocanegra M., Kwon M.J. et al. LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res* 2010;70(6):2296–306. PMID: 20215510. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3141.
26. Roskoski R. Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 2015;94:9–25. PMID: 25662515. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.01.003.
27. Greif P.A., Yaghmaie M., Konstantin N.P. et al. Somatic mutations in acute promyelocytic leukemia (APL) identified by exome sequencing. *Leukemia* 2011;25(9):1519–22. PMID: 21606962. DOI: 10.1038/leu.2011.114.
28. Xu P.P., Zhong H.J., Huang Y.H. et al. B-cell function gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective cohort study. *EBioMedicine* 2017;16:106–14. PMID: 28153771. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.01.027.
29. Suresh P.S., Ma S., Migliaccio A., Chen G. Protein-tyrosine phosphatase H1 increases breast cancer sensitivity to antiestrogens by dephosphorylating estrogen receptor at Tyr537. *Mol Cancer Ther* 2014;13(1):230–8. PMID: 24227889. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0610.
30. Montero J.C., Seoane S., Ocana A. et al. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2011;17(17):5546–52. PMID: 21670084. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2616.
31. Hiscox S., Morgan L., Green T., Nicholson R.I. Src as a therapeutic target in anti-hormone/anti-growth factor-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(Suppl. 1):53–9. PMID: 17259559. DOI: 10.1677/erc.1.01297.
32. Riggins R.B., Thomas K.S., Ta H.Q. et al. Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer Res* 2006;66(14):7007–15. PMID: 16849545. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3952.
33. Konecny G.E., Glas R., Dering J. et al. Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2009;101(10):1699–708. PMID: 19861960. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605381.
34. Mayer E.L., Baurain J.F., Sparano J. et al. A phase 2 trial of dasatinib in patients with advanced HER2-positive and/or hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(21):6897–904. PMID: 21903773. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0070.
35. Hiscox S., Morgan L., Green T.P. et al. Elevated Src activity promotes cellular invasion and motility in tamoxifen resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2006;97(3):263–74. PMID: 16333527. DOI: 10.1007/s10549-005-9120-9.
36. Chen Y., Guggisberg N., Jorda M. et al. Combined Src and aromatase inhibition impairs human breast cancer growth in vivo and bypass pathways are activated in AZD0530-resistant tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15(10):3396–405. PMID: 19451593. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3127.
37. Chen Y., Alvarez E.A., Azzam D. et al. Combined Src and ER blockade impairs human breast cancer proliferation in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128(1):69–78. PMID: 20669046. DOI: 10.1007/s10549-010-1024-7.
38. Hiscox S., Jordan N.J., Smith C. et al. Dual targeting of Src and ER prevents acquired anti-hormone resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(1):57–67. PMID: 18493848. DOI: 10.1007/s10549-008-0058-6.

**Благодарность.** Автор выражает благодарность Анне Александровне Башариной за критическое чтение рукописи.  
**Acknowledgment.** The author expresses gratitude to Anna Alexandrovna Basharina for the critical reading of the manuscript.

#### ORCID автора/ ORCID of author

Е.А. Шестакова / E.A. Shestakova: <https://orcid.org/0000-0002-0158-4605>

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The work was performed without external funding.

**Статья поступила:** 23.11.2020. **Принята к публикации:** 09.03.2021.  
**Article submitted:** 23.11.2020. **Accepted for publication:** 09.03.2021

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-17-25



# Нейрофиброматоз 1-го типа: результаты собственного исследования (Республика Башкортостан)

Р.Н. Мустафин<sup>1</sup>, М.А. Бермишева<sup>2</sup>, Р.Р. Валиев<sup>3</sup>, Э.К. Хуснутдинова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3;

<sup>2</sup>Институт биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» РАН; Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»; Россия, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32

**Контакты:** Рустам Наилевич Мустафин ruji79@mail.ru

**Введение.** Нейрофиброматоз 1-го типа (НФ1) – самый распространенный наследственный опухолевый синдром (частота встречаемости в мире – 1 : 3000 населения). Основными клиническими проявлениями болезни являются множественные пигментные пятна на коже и нейрофибромы, скелетные аномалии и когнитивный дефицит. В основе болезни лежат мутации в онкосупрессорном гене *NF1*. Характерен выраженный клинический полиморфизм НФ1 даже среди членов одной семьи, гено-фенотипических корреляций не выявлено. В связи с этим предполагается, что гены-модификаторы влияют на патогенез варьирующей экспрессивности болезни. **Материалы и методы.** Проведено клинко-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое исследование больных НФ1 в Республике Башкортостан (РБ). Поиск внутригенных мутаций осуществлялся методом секвенирования 57 экзонов гена *NF1*, делеции всего гена – с использованием микросателлитного анализа.

**Результаты.** Частота встречаемости НФ1 в РБ составила 1 : 10 153 населения. Анализ клинических проявлений НФ1 у больных из РБ показал меньшую частоту встречаемости кист головного мозга у больных, рожденных в смешанном браке, что свидетельствует о протективной роли метисации. При наследовании НФ1 от матери определено более частое развитие скелетных аномалий и дизморфизма лица. Выявлены 1 делеция всего гена *NF1* у 1 пациента и 14 внутригенных мутаций у 20 больных НФ1 (с.205-1G>C, с.1278G>A, с.1369\_1370insGGGTC, с.1570G>A, с.1973\_1974delTC, с.2806A>T, с.2991-1G>C, с.3158C>G, с.3526\_3528delAGA, с.3826delC, с.4514+5G>A, с.4537C>T, с.5758\_5761delTTGA, с.6792C>A). Показано случайное распределение типов мутаций, не выявлено специфических особенностей клиники НФ1 в зависимости от типа мутаций.

**Выводы.** Протективная роль метисации в отношении кист головного мозга, а также преобладание скелетных аномалий при наследовании НФ1 от матери свидетельствуют о роли генов-модификаторов в патогенезе болезни. Идентификация мутаций в гене *NF1* позволит проводить пренатальную профилактику НФ1 у населения РБ.

**Ключевые слова:** ген *NF1*, гено-фенотипические корреляции, канцерогенез, мутации, нейрофибромин, нейрофиброматоз 1-го типа

**Для цитирования:** Мустафин Р.Н., Бермишева М.А., Валиев Р.Р., Хуснутдинова Э.К. Нейрофиброматоз 1-го типа: результаты собственного исследования (Республика Башкортостан). Успехи молекулярной онкологии 2021;8(1):17–25. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-17-25.

## Neurofibromatosis type 1: results of our own study (Republic of Bashkortostan)

R. N. Mustafin<sup>1</sup>, M. A. Bermisheva<sup>2</sup>, R. R. Valiev<sup>3</sup>, E. K. Khusnutdinova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University; 3 Lenin St., Ufa 450008, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics Russian academy of sciences, Ufa Research Center, 71 October prospect, Ufa 450054, Russia;

<sup>3</sup>Bashkir State University, 32 Zaki Validi St., Ufa 450076, Russia

**Contacts:** Rustam Nailevich Mustafin ruji79@mail.ru

**Introduction.** Neurofibromatosis type 1 (NF1) is the most common hereditary tumor syndrome (frequency of its occurrence in the world is 1 : 3000 of the population). The main clinical manifestations of the disease are multiple café-au-lait macules on the skin and neurofibromas, skeletal abnormalities and cognitive deficits. The disease is based on mutations in the oncosuppressor gene *NF1*. This disease is characterized by significant clinical polymorphism



of manifestations, even among members of the same family. No geno-phenotypic correlations were found for NF1. Therefore, it is assumed that modifier genes are the cause of the varying expressiveness of the disease.

**Materials and methods.** Clinical-epidemiological and molecular-genetic research of patients with NF1 in the Republic of Bashkortostan (RB) was carried out. Sequencing was used to search for intragenic mutations in 57 exons of the *NF1* gene. Microsatellite analysis was used to detect the deletion of the entire gene.

**Results.** The frequency of occurrence of NF1 in RB was 1 : 10 153 of the population. Analysis of the clinical manifestations of NF1 in RB patients showed a lower incidence of brain cysts in patients born in mixed marriages, which indicates the protective role of mestization. In patients with NF1 who inherited the disease from the mother, a more frequent development of skeletal anomalies and facial dysmorphism was determined. We identified 1 deletion of the entire *NF1* gene in 1 patient and 14 intragenic mutations (c.205-1G>C, c.1278G>A, c.1369\_1370insGGGTC, c.1570G>A, c.1973\_1974delTC, c.2806A>T, c.2991-1G>C, c.3158C>G, c.3526\_3528delAGA, c.3826delC, c.4514+5G>A, c.4537C>T, c.5758\_5761delTTGA, c.6792C>A) in 20 patients with NF1. We determined the random distribution of the types of mutations and did not reveal the specific features of the NF1 clinic depending on the type of mutations.

**Conclusions.** The protective role of crossbreeding in relation to brain cysts, as well as the predominance of skeletal anomalies in patients with NF1 inheritance from the mother, indicate the role of modifier genes in the pathogenesis of the disease. The identified mutations in the *NF1* gene will allow us to perform prenatal prevention of NF1 in RB patients.

**Key words:** *NF1* gene, geno-phenotypic correlations, carcinogenesis, mutations, neurofibromin, type 1 neurofibromatosis

**For citation:** Mustafin R.N., Bermisheva M.A., Valiev R.R., Khusnutdinova E.K. Neurofibromatosis type 1: results of our own study (Republic of Bashkortostan). *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021; 8(1):17–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-17-25.

## ВВЕДЕНИЕ

Нейрофиброматоз 1-го типа (НФ1) — наследственный опухолевый синдром с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в мире со средней частотой 1 : 3000 населения [1]. Болезнь вызвана мутациями в гене *NF1*, локализованном на 17q11.2. Ген кодирует активирующий ГТФазу (GTPase) белок нейрофибромин — негативный регулятор Ras/митоген-активируемых сигнальных путей, которые контролируют клеточный рост и пролиферацию [2]. В базе данных HGMD (Human Gene Mutation Database) описано более 3 тыс. различных герминативных мутаций в гене *NF1* как причина возникновения НФ1. Описаны также мутации *NF1* при спорадических неоплазмах в базах данных COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), что говорит об их роли в канцерогенезе [3]. Соматические мутации *NF1* выявляются в образцах десмопластических меланом (45–90 % случаев), карцином яичника (12–34,4 %), кожных меланом (12–30 %), феохромоцитом (21–26 %), глиобластом (14–23 %), переходно-клеточных карцином мочевого пузыря (6–14 %), плоскоклеточного рака легкого (11 %) [4]. В гене *NF1* отсутствуют горячие точки мутагенеза. Около 5 % всех случаев НФ1 обусловлены крупными делециями, охватывающими весь ген *NF1* и фланкирующие области [4]. До 50 % случаев НФ1 — спорадические, вызванные мутациями *de novo* [1]. Продолжительность жизни при НФ1 на 8–20 лет короче общей популяции главным образом из-за злокачественных новообразований. Диагноз «НФ1» устанавливается при наличии у пациента двух и более признаков из перечисленных ниже:

1) шесть или более пятен цвета кофе с молоком (CALM — café-au-lait macules) диаметром более 5 мм в допубертате и более 15 мм в постпубертате,

- 2) веснушчатость в подмышечной или паховой областях,
- 3) две и более кожных нейрофибромы или одна плексиформная нейрофиброма,
- 4) две и более гамартомы радужки глаза (узелки Лиша),
- 5) глиома зрительного нерва,
- 6) специфические костные дисплазии,
- 7) наличие НФ1 у родственников первой степени родства [1].

CALM определяются у 99 % больных НФ1 старше года, веснушчатость — у 90 % старше 7 лет. Около 81 % детей с НФ1 имеют проблемы с поведением. Сколиоз диагностируется у 21–49 %, псевдоартроз — у 5 % [5], низкий рост — у 18–30 % взрослых больных НФ1 [6]. Более чем у половины детей с НФ1 выявляются изменения в T2-взвешенных сигналах при магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга. Нарушения интеллекта определяются в 30–65 % случаев НФ1, среднее значение IQ составляет 85. Нейрофибромы обнаруживаются у 40–60 % больных НФ1, узелки Лиша — у 70 %, плексиформные нейрофибромы — у 30–50 %, злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов определяются у 8–13 %, глиомы зрительных нервов — у 15–20 % [7], опухоли ствола головного мозга — у 10 % [8], гидроцефалия — у 7,7 % [9]. Распространенность эпилепсии при НФ1 для всех возрастных категорий составляет 5,4 %, для детей — 3,7 % [10]. Мальформация Арнольда–Киари при НФ1 встречается с частотой 2 % [11].

**Цель исследования** — анализ эпидемиологических и клинических особенностей НФ1 в Республике Башкортостан (РБ), выявление мутаций в гене *NF1* у части пациентов с НФ1 для определения молекулярно-генетических причин развития болезни в РБ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы больные НФ1 из числа жителей РБ, состоящие на учете у врача-генетика в ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр» (РМГЦ). Диагноз «НФ1» был установлен согласно принятым критериям [1]. Для выявления внутригенных мутаций *NF1* проведено секвенирование 57 экзонов гена, для определения делеции всего гена – микросателлитный анализ локусов GXAlu, TCCAint1, IVS27AC28.4, IVS38TG53.0. Использовано оборудование Института биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» РАН: автоматический секвенатор ABI PRISM, модель 310 (Applied Biosystems, США), с набором флюоресцентного мечения SYEnamic™ ET по протоколу “Amersham Pharmacia Biotech” DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit. Для прочтения последовательностей нуклеотидов использовано приложение BioEdit v. 5.0.9. Для определения патогенетической значимости миссенс-мутации использованы пакеты программ: SIFT, Polyphen-2.0, PROVEAN, I-Mutant-3.0, PhD-SNP, SNAP, Meta-STR, mutation t@sting. Все исследования велись с соблюдением норм биомедицинской этики и соответствуют стандартам GCP (Good Clinical Practice). Для полученных качественных бинарных данных проводили статистическую обработку с использованием интерактивной таблицы сопряженности 2 × 2 с вычислением статистики связи (критерий  $\chi^2$ ) с поправкой Йейтса на непрерывность, разработанной В.П. Леоновым (<http://www.biometrica.tomsk.ru/freq2.htm>), анализа четырехпольных таблиц сопряженности на сайте <http://med-statistic.ru/calculator>, а также с помощью точного критерия Фишера ( $\varphi_{\text{эмп}}^*$ ) для проверки нулевой гипотезы о том, что различия между двумя группами статистически значимы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В РБ с населением 4 051 333 человека на учете у врача-генетика в РМГЦ в 2020 г. состояли 399 больных НФ1 из 320 семей. Частота встречаемости составила 1 : 10 153, что значительно ниже, чем в среднем по миру (1 : 3000) [1], но превышает показатели по РБ за 2009 г. (1 : 21 277) [12]. Пациенты с НФ1 выявлены во всех городах и в 43 из 54 районов сельской местности РБ. По национальной принадлежности среди больных НФ1 36 % были рождены в смешанном браке, остальные 64 % – в семьях одной нации: у татар (26 %), русских (19 %), башкир (12 %), чувашей (3 %), марийцев (2 %), мордвы (1 %), казахов (0,5 %), таджиков (0,5 %). Соотношение мужчин (187) и женщин (212) составило приблизительно 1 : 1. Спорадические случаи НФ1 определены в 53 % случаев, наследование от матери – у 27 % и от отца – у 20 % пациентов. Анализ клинических проявлений НФ1 у больных в РБ по большинству симптомов показал результаты, сравнимые с данными по миру (табл. 1). Однако плексиформные нейрофибромы и глиомы зрительных нервов выявлены лишь

у 5 % больных НФ1. Нарушение интеллекта описано у 17,7 % больных, что несколько ниже данных мировой статистики [7].

**Таблица 1.** Сравнительная характеристика клинических проявлений нейрофиброматоза 1-го типа у больных в Республике Башкортостан (РБ) и мире

**Table 1.** Comparative characteristics of clinical manifestations of neurofibromatosis type 1 in patients from the Republic of Bashkortostan (RB) and in the world

Клиническое проявление Clinical manifestation	РБ, % (абс.) RB, % (abs.)	В мире, % In the world, %
CALM*	98,7 (394)	99,0
Нейрофибромы Neurofibromas	59,0 (235)	40,0–60,0
Сколиоз Scoliosis	19,0 (76)	21,0–49,0
Нарушения интеллекта Cognitive ipairments	17,7 (71)	30,0–65,0
Низкий рост Short stature	14,0 (56)	18,0–30,0
Плексиформные нейрофибромы Plexiform neurofibromas	5,0 (20)	30,0–50,0
Глиомы зрительных нервов Optic nerve gliomas	5,0 (20)	15,0–20,0
Опухоль головного мозга вне зрительных нервов Brain tumor outside optic nerves	4,3 (17)	10,0
Киста головного мозга Brain cyst	4,0 (16)	—
Гидроцефалия Hydrocephalus	4,0 (16)	7,7
Псевдоартроз Pseudoarthrosis	4,0 (16)	5,0
Эпилепсия Epilepsy	2,7 (11)	5,4
Мальформация Арнольда—Киари Arnold—Chiari malformation	1,3 (5)	2,0

\**Café au lait macules* — пятна цвета кофе с молоком.

\**Café au lait macules* — spots the color of coffee and milk.

Молекулярно-генетическое исследование ДНК 21 больного НФ1 из РБ, давшего письменное согласие на исследование, позволило выявить 14 внутригенных мутаций *NF1* у 20 больных из 16 семей и 1 протяженную делецию *NF1* у 1 пациента. Был проведен анализ особенностей клинических проявлений НФ1 у данных больных, гено-фенотипических корреляций обнаружено не было (табл. 2), что соответствует данным мировой литературы [13–16]. Девять из 14 выявленных нами мутаций в гене *NF1* описаны впервые в мире (с.205-1G>C, с.1278G>A, с.1369\_1370insGGGTC, с.1570G>A, с.1973\_1974delTC, с.3526\_3528delAGA, с.3826delC,

с.4514+5G>A, с.5758\_5761delTTGA). Сплайсинговая мутация с.2991-1G>C ранее описана у больных НФ1 из Германии [14]. Нонсенс-мутация с. 4537C>T оказалась наиболее известной в мире и встречалась у 7 больных в Германии [14], 2 – в Бельгии [16], 2 – в Корее [15] и 1 больного – в Испании [13]. Нонсенс-мутация с.6792C>A ранее выявлена у 3 пациентов с НФ1 в Германии [14], 2 – в Испании [13] и по 1 – в Бельгии [16] и Корее [15]. Две другие нонсенс-мутации были обнаружены в образцах спорадических злокачественных неоплазм у пациентов без НФ1: с.3158C>G – в тканях рака молочной железы, резистентного к гормональной терапии [3]; с.2806A>T – в феохромоцитоме [17].

Отсутствие гено-фенотипических корреляций даже у членов одной и той же семьи, соответствующее данным научной литературы [2, 4], позволяет сделать вывод о роли генов-модификаторов в развитии болезни. Анализ мировой литературы показал наличие работ в пользу данного предположения. Прежде всего об этом говорят данные о более тяжелых проявлениях НФ1 (ранняя манифестация и большее количество

нейрофибром, выраженные умственная отсталость и пороки сердца) при протяженных делециях *NF1*, что связано с вовлечением в делецию соседних генов [18], таких как *HSA66*, продукт экспрессии которого регулирует апоптоз за счет взаимодействия с опухолевым супрессором *Araf-1* (apoptotic protease activating factor-1) [19]. Экспериментальные исследования на мышах позволили предсказать роль мутаций в гене-онкосупрессоре *ATM* как инициаторов возникновения новых нейрофибром при НФ1 [20]. Анализ имеющихся данных о влиянии других генов на развитие клинических особенностей НФ1 позволил определить такие гены-модификаторы, как *AKT1*, *BRAF*, *EGFR*, *LIMK1*, *PAK1*, *PTEN*, *RAF1*, *SDC2*, *SMARCA4*, *VCP* [21]. В образцах нейрофибром выявлены повышенные уровни хемокинов *CXCL12* (в 512 раз) и *CXCR4* (в 120 раз), что свидетельствует о роли кодирующих их генов в патогенезе НФ1 [22]. Показано влияние микроРНК на развитие злокачественных опухолей при НФ1. К ним относятся *miR-34a*, *miR-10b* [23], *miR-204* [24], *miR-21* [25], *miR-24* [26].

**Таблица 2.** Мутации в гене *NF1* и клинические проявления нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1) у больных в Республике Башкортостан

**Table 2.** Mutations in the *NF1* gene and clinical manifestations of neurofibromatosis type 1 (*NF1*) patients from the Republic of Bashkortostan

Экзон Exon	Мутация Mutation	№ семьи* (пол) Family number (gender)	Клиническое проявление Clinical manifestation
3	с.205-1G>C (сайт сплайсинга) с.205-1G>C (splicing site)	1 (женский) 1 (female)	CALM**, веснушчатость, сколиоз CALM*, freckles, scoliosis
12	с.1278G>A (р.W426X)	2-I (мужской) 2-I (male)	CALM, множественные нейрофибромы CALM, multiple neurofibromas
		2-II (женский) 2-II (female)	CALM, локальные нейрофибромы, сколиоз CALM, local neurofibromas, scoliosis
12	с.1369_1370insGGGTC (р.H457fs)	3 (мужской) 3 (male)	CALM, множественные нейрофибромы, глиома зрительного нерва CALM, multiple neurofibromas, optic nerve glioma
14	с.1570G>A (р.E524K)	4-I (женский) 4-I (female)	CALM, локальные нейрофибромы CALM, local neurofibromas
		4-II (мужской) 4-II (male)	CALM, выраженные нарушения физического и когнитивного развития CALM, significant impairment of physical and cognitive development
17	с.1973_1974delTC (р.L658Pfs)	5 (мужской) 5 (male)	CALM, множественные нейрофибромы, плексиформная нейрофиброма CALM, multiple neurofibromas, plexiform neurofibroma
21	с.2806A>T (р.K936X)	6 (женский) 6 (female)	CALM, множественные очаги гиперинтенсивности в подкорковых структурах на КТ головного мозга CALM, multiple foci of hyperintensity in the subcortical structures of the brain on CT
23	с.2991-1G>C (сайт сплайсинга) с.2991-1G>C (splicing site)	7-I (женский) 7-I (female)	CALM, множественные нейрофибромы CALM, multiple neurofibromas
		7-II (мужской) 7-II (male)	CALM, локальные нейрофибромы, дизморфизм лица, сколиоз, острый лимфолейкоз CALM, local neurofibromas, facial dysmorphism, scoliosis, acute lymphocytic leukemia
		8 (мужской) 8 (male)	CALM, локальные нейрофибромы CALM, local neurofibromas

Окончание табл. 2

End of table 2

Экзон Exon	Мутация Mutation	№ семьи* (пол) Family number (gender)	Клиническое проявление Clinical manifestation
24	c.3158C>G (p.S1053X)	9 (мужской) 9 (male)	CALM**
27	c.3526_3528delAGA (p.R1176del)	10 (мужской) 10 (male)	CALM, локальные нейрофибромы, нарушение физического и когнитивного развития, гидроцефалия CALM, local neurofibromas, impaired physical and cognitive development, hydrocephalus
		11–I (мужской) 11-I (male)	CALM, множественные нейрофибромы CALM, multiple neurofibromas
		11–II (мужской) 11-II (male)	CALM, эпилепсия, гидроцефалия CALM, epilepsy, hydrocephalus
28	c.3826delC (p.R1276EfsX8)	12 (мужской) 12 (male)	CALM, множественные нейрофибромы, деформация грудной клетки, опухоль головного мозга (мозжечка) CALM, multiple neurofibromas, chest deformity, brain (cerebellum) tumor
33	c.4514+5G>A (сайт сплайсинга) c.4514+5G>A (splicing site)	13 (женский) 13 (female)	CALM, множественные очаги гиперинтенсивности в подкорковых структурах на МРТ головного мозга CALM, multiple foci of hyperintensity in subcortical structures on MRI of the brain
34	c.4537C>T (p.R1513X)	14 (женский) 14 (female)	CALM, множественные нейрофибромы CALM, multiple neurofibromas
39	c.5758_5761delTTGA (p.L1920NfsX7)	15 (женский) 15 (female)	CALM, локальные нейрофибромы, сколиоз CALM, local neurofibromas, scoliosis
45	c.6792C>A (p.Y2264X)	16 (женский) 16 (female)	CALM, деформация грудной клетки, псевдоартроз голени, гидроцефалия CALM, chest deformity, pseudoarthrosis of the tibia, hydrocephalus
1–57	Протяженная делеция всего гена Extended deletion of entire gene	17 (мужской) 17 (male)	CALM, деформация грудной клетки CALM, chest deformity

\*Арабской цифрой обозначен номер семьи; если число ее членов с выявленной мутацией больше одного, то каждый член семьи дополнительно обозначен римской цифрой. \*\*Café-au-lait macules — пятна цвета кофе с молоком.

Сокращения: КТ — компьютерная томография, МРТ — магнитно-резонансная томография.

\*The arabic numeral indicates the family number; if the number of family members who have a mutation is more than one, then each family member is additionally designated with a Roman numeral. \*\*Café-au-lait macules — spots the color of coffee and milk.

Abbreviations: CT — computed tomography; MRI — magnetic resonance imaging.

Для оценки возможного влияния генов-модификаторов на развитие особенностей НФ1 нами проведен анализ клинических проявлений болезни в зависимости от этнической принадлежности и наследования от матери или отца. У больных НФ1 от смешанных браков отмечены статистически значимо большая частота развития скелетных аномалий и мальформации Арнольда–Киари и меньшая распространенность кист головного мозга (табл. 3). Отмечена также тенденция к различиям в отношении плексиформных нейрофибром и опухолей головного мозга. Клинических особенностей НФ1 в зависимости от этнической принадлежности не выявлено, что совпадает с данными научной литературы [27].

При анализе проявлений НФ1 в зависимости от характера наследования мутации *NFI* (от матери, отца и спорадические случаи) было выявлено статистиче-

ски значимое преобладание частоты встречаемости сколиоза, низкого роста, дизморфизма лица, изолированных деформаций грудной клетки и псевдоартроза голени при наследовании от матери (табл. 4) в сравнении со спорадическими случаями НФ1.

Определена также статистически значимая разница в распространенности низкого роста (выше) и гидроцефалии (ниже) у пациентов, наследовавших мутацию *NFI* от отца, по сравнению со спорадическими случаями (табл. 5).

Кроме того, показано преобладание частоты встречаемости дизморфизма лица и гидроцефалии у пациентов, наследовавших НФ1 от матери, в сравнении с наследовавшими болезнь от отца (табл. 6). Полученные результаты могут свидетельствовать о вероятной роли импринтинга генов-модификаторов в развитии скелетных аномалий у больных НФ1.

**Таблица 3.** Анализ проявлений нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1) у больных, рожденных в смешанном браке, в Республике Башкортостан  
**Table 3.** Analysis of the manifestations of type 1 neurofibromatosis (NF1) in patients born in mixed marriage in the Republic of Bashkortostan

Клиническое проявление НФ1 Clinical manifestation of NF1	Число больных НФ1, % (абс.) Number of patients with NF1, % (abs.)		Показатели: критерий $\chi^2$ ; значение $p$ при степени свободы, равной 1; критерий Фишера $\varphi^*_{эмп}$ Indicators: $\chi^2$ criterion, $p$ value at degree of freedom equal to 1; Fisher's criterion $\varphi^*_{эмп}$
	от смешанных браков, $n = 144$ from mixed marriages, $n = 144$	одной национальности, $n = 255$ one nationality, $n = 255$	
Нейрофибромы Neurofibromas	56 (80)	56 (143)	$\chi^2 = 0,05$ ; $p = 0,8$ ; $\varphi^*_{эмп} = 0,096$
Плексиформные нейрофибромы Plexiform neurofibromas	4,17 (6)	6,7 (17)	$\chi^2 = 1,49$ ; $p = 0,2$ ; $\varphi^*_{эмп} = 1,065$
Скелетные аномалии Skeletal abnormalities	50,6 (73)	35 (89)	$\chi^2 = 10,47$ ; $p = 0,002$ ; $\varphi^*_{эмп} = 3,079$
Киста головного мозга Brain cyst	2 (3)	6,3 (16)	$\chi^2 = 4,2$ ; $p = 0,04$ ; $\varphi^*_{эмп} = 2,072$
Опухоль головного мозга Brain tumor	2,9 (4)	5,9 (15)	$\chi^2 = 3,67$ ; $p = 0,056$ ; $\varphi^*_{эмп} = 1,487$
Гидроцефалия Hydrocephalus	3,5 (5)	4,3 (11)	$\chi^2 = 0,02$ ; $p = 0,88$ ; $\varphi^*_{эмп} = 0,403$
Опухоль спинного мозга Spinal cord tumor	1,4 (2)	2 (5)	$\chi^2 = 0,38$ ; $p = 0,54$ ; $\varphi^*_{эмп} = 0,451$
Эпилепсия Epilepsy	4,17 (6)	1,57 (4)	$\chi^2 = 1,59$ ; $p = 0,2$ ; $\varphi^*_{эмп} = 1,525$
Мальформация Арнольда—Киари Arnold—Chiari malformation	5,6 (8)	0,78 (2)	$\chi^2 = 6,73$ ; $p = 0,01$ ; $\varphi^*_{эмп} = 2,868$

**Примечание.** Здесь и в табл. 4–6 полужирным начертанием выделены статистически значимые различия.  
**Note.** Here and in Tables 4–6, statistically significant differences are highlighted in bold.

**Таблица 4.** Сравнительный анализ частот проявлений нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1) при наследовании мутации от матери и спорадических случаях, % (абс.)  
**Table 4.** Comparative analysis of the frequency of manifestations of type 1 neurofibromatosis (NF1) with inheritance of the mutation from the mother and sporadic cases, % (abs.)

Клиническое проявление Clinical manifestation	Наследование НФ1 от матери, $n = 108$ Inheritance from the mother, $n = 108$	Спорадические случаи, $n = 211$ Sporadic cases, $n = 211$	Показатели: критерий $\chi^2$ ; значение $p$ при степени свободы, равной 1; критерий Фишера $\varphi^*_{эмп}$ Indicators: $\chi^2$ criterion, $p$ value at degree of freedom equal to 1; Fisher's criterion $\varphi^*_{эмп}$
Нейрофибромы Neurofibromas	51,0 (55)	61,6 (130)	$\chi^2 = 3,35$ ; $p = 0,068$ ; $\varphi^*_{эмп} = 1,826$
Сколиоз Scoliosis	27,0 (29)	16,0 (34)	$\chi^2 = 5,2$ ; $p = 0,023$ ; $\varphi^*_{эмп} = 2,24$
Низкий рост Short stature	26,0 (28)	8,0 (17)	$\chi^2 = 20,86$ ; $p = 0,0005$ ; $\varphi^*_{эмп} = 4,15$
Дизморфизм лица Facial dysmorphism	21,0 (23)	11,0 (23)	$\chi^2 = 7,48$ ; $p = 0,0071$ ; $\varphi^*_{эмп} = 2,417$
Деформация грудной клетки Chest deformity	11,0 (12)	5,0 (11)	$\chi^2 = 5,3$ ; $p = 0,0217$ ; $\varphi^*_{эмп} = 1,851$
Псевдоартроз голени Pseudoarthrosis of the tibia	6,5 (7)	3,0 (6)	$\chi^2 = 4,4$ ; $p = 0,036$ ; $\varphi^*_{эмп} = 1,521$
Гидроцефалия Hydrocephalus	5,5 (6)	6,6 (14)	$\chi^2 = 0,14$ ; $p = 0,7$ ; $\varphi^*_{эмп} = 0,355$
Киста головного мозга Brain cyst	4,6 (5)	3,8 (8)	$\chi^2 = 0,13$ ; $p = 0,7$ ; $\varphi^*_{эмп} = 0,338$

**Таблица 5.** Сравнительный анализ частот проявлений нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1) при наследовании мутации от отца и спорадических случаях, % (абс.)

**Table 5.** Comparative analysis of the frequency of manifestations of type 1 neurofibromatosis (NF1) with inheritance of a mutation from the father and sporadic cases, % (abs.)

Клинические проявления Clinical manifestations	Наследование НФ1 от отца, n = 80 Inheritance of NF1 from the father, n = 80		Спорадические случаи, n = 211 Sporadic cases, n = 211	Показатели: критерий $\chi^2$ ; значение p при степени свободы, равной 1; критерий Фишера $\varphi^*_{эмп}$ Indicators: $\chi^2$ criterion, p value at degree of freedom equal to 1; Fisher's criterion $\varphi^*_{эмп}$
Нейрофибромы Neurofibromas	63,8 (51)		61,6 (130)	$\chi^2 = 0,113; p = 0,7; \varphi^*_{эмп} = 0,343$
Сколиоз Scoliosis	20,0 (16)		16,0 % (34)	$\chi^2 = 0,7; p = 0,4; \varphi^*_{эмп} = 0,769$
Низкий рост Short stature	20,0 (16)		8,0 % (17)	$\chi^2 = 10,36; p = 0,002; \varphi^*_{эмп} = 2,666$
Дизморфизм лица Facial dysmorphism	6,0 (5)		11,0 (23)	$\chi^2 = 0,96; p = 0,329; \varphi^*_{эмп} = 1,337$
Деформация грудной клетки Chest deformity	5,0 % (4)		5,0 (11)	$\chi^2 = 0,64; p = 0,4245; \varphi^*_{эмп} = 0,069$
Псевдоартроз голени Pseudoarthrosis of the tibia	5,0 (4)		3,0 (6)	$\chi^2 = 29; p = 0,5884; \varphi^*_{эмп} = 0,876$
Гидроцефалия Hydrocephalus	0 (0)		6,6 (14)	$\chi^2 = 5,6; p = 0,019$
Киста головного мозга Brain cyst	2,6 (2)		3,8 (8)	$\chi^2 = 0,3; p = 0,6; \varphi^*_{эмп} = 0,564$

**Таблица 6.** Сравнительный анализ частот проявлений нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1) в зависимости от наследования мутации от матери или отца

**Table 6.** Comparative analysis of the frequency of manifestations of type 1 neurofibromatosis (NF1) depending on the inheritance of the mutation from the mother or father, % (abs.)

Клинические проявления Clinical manifestations	Наследование НФ1, % (абс.) NF1 inheritance, % (abs.)		Показатели: критерий $\chi^2$ ; значение p при степени свободы, равной 1; критерий Фишера $\varphi^*_{эмп}$ Indicators: $\chi^2$ criterion, p value at degree of freedom equal to 1; Fisher's criterion $\varphi^*_{эмп}$
	по матери, n = 108 maternal, n = 108	по отцу, n = 80 paternal, n = 80	
Нейрофибромы Neurofibromas	51 (55)	63,8 (51)	$\chi^2 = 3; p = 0,08; \varphi^*_{эмп} = 1,769$
Сколиоз Scoliosis	27 (29)	20 (16)	$\chi^2 = 1,4; p = 0,23; \varphi^*_{эмп} = 0,463$
Низкий рост Short stature	26 (28)	20 (16)	$\chi^2 = 1,3; p = 0,19; \varphi^*_{эмп} = 1,112$
Дизморфизм лица Facial dysmorphism	21 (23)	6 (5)	$\chi^2 = 8,9; p = 0,0037; \varphi^*_{эмп} = 3,064$
Деформация грудной клетки Chest deformity	11 (12)	5 (4)	$\chi^2 = 2,9; p = 0,087; \varphi^*_{эмп} = 1,546$
Псевдоартроз голени Pseudoarthrosis of the tibia	6,5 (7)	5 (4)	$\chi^2 = 0,013; p = 0,91; \varphi^*_{эмп} = 0,441$
Гидроцефалия Hydrocephalus	5,5 (6)	0 (0)	$\chi^2 = 4,6; p = 0,03$
Киста головного мозга Brain cyst	4,6 (5)	2,6 (2)	$\chi^2 = 0,6; p = 0,44; \varphi^*_{эмп} = 0,773$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным РМГЦ, частота встречаемости НФ1 в РБ на 2020 г. составила 1 : 10 153, что на 68 % превышает аналогичные показатели за 2009 г. [12], но в 3,4 раза реже в сравнении с данными по миру [1]. Это свидетельствует как об эффективности работы центра, так и о возможных эпидемиологических особенностях НФ1 в РБ. Анализ клинических проявлений НФ1 у больных в РБ показал, что частота развития большинства из них соответствует данным научной литературы [5–11]. Однако более низкая частота регистрации глиом зрительных нервов (5 %) и плексиформных нейрофибром (5 %) в сравнении с их встречаемостью в мире (15–20 % [7–9] и 30–50 % [7–9] соответственно) говорит о необходимости внедрения комплексного обследования всех больных НФ1 с обязательным проведением МРТ головного мозга и проблемных областей (для выявления глиом, плексиформных нейрофибром). Так, магнитно-резонансная и компьютерная томография головного мозга была проведена 97 больным НФ1 из 399 (24,3 %), при этом у 92 из них (95 %) обнаружена патология, что свидетельствует об эф-

фективности этого метода диагностики. Нами выявлены эпидемиологические данные о развитии кист головного мозга при НФ1 (4 %), которые ранее не были представлены в научной литературе. Проведенный нами молекулярно-генетический анализ образцов ДНК 21 больного из 17 семей позволил выявить 14 внутригенных мутаций, из которых 9 ранее не были описаны в научной литературе. Распределение выявленных мутаций носит случайный характер: 1 протяженная делеция (6,7 % больных), 5 нонсенс-мутаций (33,2 %), 4 делеции (26,7 %), 3 мутации сайтов сплайсинга (20 %), 1 инсерция (6,7 %) и 1 миссенс-мутация (6,7 %). Не обнаружено мажорных мутаций, что соответствует данным научной литературы [4], не выявлено гено-фенотипических корреляций, что также согласуется с большинством исследований в мире [2, 4, 13–16]. Полученные нами данные о протективной роли метисации в отношении развития кист головного мозга при НФ1, а также о большей частоте развития скелетных аномалий и дизморфизма лица при наследовании НФ1 от матери свидетельствуют о роли генов-модификаторов в патогенезе НФ1.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gutmann D.H., Ferner R.E., Listernick R.H. et al. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17004. DOI: 10.1038/eye.2010.227.
- Kang E., Kim Y., Seo G.H. et al. Phenotype categorization of neurofibromatosis type I and correlation to *NF1* mutation types. *J Hum Genet* 2020;65(2):79–89. DOI: 10.1038/s10038-019-0695-0.
- Razavi P., Chang M.T., Xu G. et al. The genomic landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers. *Cancer Cell* 2018;34(3):427–38. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.08.008.
- Philpott C., Tovell H., Frayling I.M. et al. The *NF1* somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Hum Genomics* 2017;11(1):13. DOI: 10.1186/s40246-017-0109-3.
- Ly K.L., Blakeley J.O. The diagnosis and management of neurofibromatosis type 1. *Med Clin North Am* 2019;103:1035–54. DOI: 10.1016/j.mcna.2019.07.004.
- Virdis R., Street M.E., Bandello M.A. et al. Growth and pubertal disorders in neurofibromatosis type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003;16(2):289–92.
- Anderson J.L., Gutmann D.H. Neurofibromatosis type 1. *Handb Clin Neurol* 2015;132:75–86. DOI: 10.1016/B978-0-444-62702-5.00004-4.
- Costa A.D.A., Gutmann D.H. Brain tumors in neurofibromatosis type 1. *Neurooncol Adv* 2020;2:i85–7. DOI: 10.1093/oaajnl/vdz040.
- Glombova M., Petrak B., Lisy J. et al. Brain gliomas, hydrocephalus and idiopathic aqueduct stenosis in children with neurofibromatosis type 1. *Brain Dev* 2019;41(8):678–90. DOI: 10.1016/j.braindev.2019.04.003.
- Bernardo P., Cinalli G., Santoro C. Epilepsy in NF1: a systematic review of the literature. *Childs Nerv Syst* 2020;36(10):2333–50. DOI: 10.1007/s00381-020-04710-7.
- Miraglia E., Fabbri G., Di Biasi C. et al. Chiari type I malformation in Neurofibromatosis type 1: experience of a center and review of the literature. *Clin Ter* 2016;167: e6–10. DOI: 10.7417/T.2016.1912.
- Мустафин Р.Н., Бермишева М.А., Хуснутдинова Э.К. Клинико-эпидемиологическое исследование нейрофиброматоза 1-го типа в Республике Башкортостан. *Якутский медицинский журнал* 2009;2(26):23–5 [Mustafin R.N., Bermisheva M.A., Khusnutdinova E.K. Clinical and epidemiological study of neurofibromatosis type 1 in the Republic of Bashkortostan. *Yakutskij medicinskij zhurnal = Yakut Medical Journal* 2009;2(26):23–5. (In Russ.)].
- Ars E., Serra E., Garcia J. et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 2000;9(2):237–47. DOI: 10.1093/hmg/9.2.237.
- Fahsold R., Hoffmeyer S., Mischung C. et al. Minor Lesion Mutational Spectrum of the Entire NF1 Gene Does Not Explain Its High Mutability but Points to a Functional Domain Upstream of the GAP-Related Domain. *Am J Hum Genet* 2000;66:790–818. DOI: 10.1086/302809.
- Jeong S., Park S., Kim H. The Spectrum of NF1 Mutations in Korean Patients with Neurofibromatosis Type 1. *J Korean Med Sci* 2006;21(1):107–11. DOI: 10.1038/jhg.2016.33.
- Messiaen L.M., Callens T., Mortier G. et al. Exhaustive Mutation Analysis of NF1 Gene Allows Identification of 95 % of Mutations and Reveals a High Frequency of Unusual Splicing Defects. *Hum Mutat* 2000;15:541–55. DOI: 10.1002/1098-1004(200006)15:6.
- Welander J., Andreasson A., Juhlin C.C. et al. Rare germline mutations identified by targeted next-generation sequencing of susceptibility genes in pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(7):E1352–60. DOI: 10.1210/jc.2013-4375.
- Bartelt-Kirbach B., Wuepping M., Dodrimont-Lattke M., Kaufmann D. Expression analysis of genes lying in the NF1 microdeletion interval points to four candidate modifiers for neurofibroma formation. *Neurogenetics* 2009;10:79–85. DOI: 10.1007/s10048-008-0154-0.

19. Sharafi P., Ayter S. Possible modifier genes in the variation of neurofibromatosis type 1 clinical phenotypes. *J Neurogenet* 2018;32(2):65–77.
20. Yu Y., Choi K., Wu J. et al. NF1 patient missense variants predict a role for ATM in modifying neurofibroma initiation. *Acta Neuropathol* 2020;139(1):157–74. DOI: 10.1007/s00401-019-02086-w.
21. Kowalski T.W., Reis L.B., Andreis T.F. et al. Systems Biology Approaches Reveal Potential Phenotype-Modifier Genes in Neurofibromatosis Type 1. *Cancers (Basel)* 2020;12(9):E2416. DOI: 10.3390/cancers12092416.
22. Karaosmanoglu B., Kocaefe C.Y., Soylemezoglu F. et al. Heightened CXCR4 and CXCL12 expression in NF1-associated neurofibromas. *Childs Nerv Syst* 2018;34(5):877–82. DOI: 10.1007/s00381-018-3745-6.
23. Subramanian S., Thayaniy V., West R.B. et al. Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of miR-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol* 2010;220:58–70. DOI: 10.1002/path.2633.
24. Gong M., Ma J., Li M. et al. MicroRNA-204 critically regulates carcinogenesis in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol* 2012;14:1007–17. DOI: 10.1093/neuonc/nos124.
25. Itani S., Kunisada T., Morimoto Y. et al. MicroRNA-21 correlates with tumorogenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1501–9. DOI: 10.1007/s00432-012-1223-1.
26. Weng Y., Chen Y., Chen J. et al. Identification of serum microRNAs in genome-wide serum microRNA expression profiles as novel noninvasive biomarkers for malignant peripheral nerve sheath tumor diagnosis. *Med Oncol* 2013;30:531. DOI: 10.1007/s12032-013-0531-x.
27. Abadin S.S., Zoellner N.L., Schaeffer M. et al. Racial/Ethnic Differences in Pediatric Brain Tumor Diagnoses in Patients with Neurofibromatosis Type 1. *J Pediatr* 2015;167(3):613–20. DOI: 10.1016/j.jpeds.2015.04.076.

#### Вклад авторов

Р.Н. Мустафин: проведение экспериментальных исследований, обработка полученных результатов, анализ научной литературы по теме статьи, написание текста рукописи;

М.А. Бермишева: проведение экспериментальных исследований, обработка полученных результатов;

Р.Р. Валиев: обработка полученных результатов, разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи;

Э.К. Хуснутдинова: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

#### Authors' contributions

R.N. Mustafin: experimental research, processing the results, analysis of scientific literature on the topic, article writing;

M.A. Bermisheva: experimental research, processing the results;

R.R. Valiev: processing the results, developing the research design, article editing;

E.K. Khusnutdinova: developing the research design, article editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Р.Н. Мустафин / R.N. Mustafin: <https://orcid.org/0000-0002-4091-382X>

М.А. Бермишева / M.A. Bermisheva: <https://orcid.org/0000-0002-0584-3969>

Р.Р. Валиев / R.R. Valiev: <https://orcid.org/0000-0002-7117-2315>

Э.К. Хуснутдинова / E.K. Khusnutdinova: <https://orcid.org/0000-0003-2987-3334>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Родители пациентов детского возраста подписали информированное согласие на участие детей в исследовании.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study. Parents of children's patients gave written informed consent to the participate of children in the study.



DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-26-31



# Исследование влияния генетического варианта с.470Т>С в гене *CHEK2* на повышение риска развития рака молочной железы у населения Российской Федерации

Е.И. Новикова, В.К. Боженко, Е.А. Кудинова, В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

**Контакты:** Екатерина Ивановна Новикова e.novikova.ncrr@mail.ru

**Введение.** В настоящее время имеются противоречивые данные относительно влияния герминальной мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* на повышение риска возникновения рака молочной железы (РМЖ), поэтому необходимы исследования на больших выборках больных, в том числе в российской популяции, в целях анализа вклада данной мутации в риск развития онкологического заболевания.

**Цель исследования** – определение частоты встречаемости генетического варианта с.470Т>С в гене *CHEK2* в российской популяции у больных РМЖ и пациенток с доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗМЖ) для оценки возможного влияния данного повреждения дезоксирибонуклеиновой кислоты на вероятность возникновения онкологического заболевания.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 2787 больных РМЖ и 1004 пациентки с ДЗМЖ, прошедшие обследование и лечение в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России с 2010 по 2018 г. Молекулярно-генетическое исследование для определения характерного для российской популяции наследственного генетического варианта с.470Т>С в гене *CHEK2* было проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием диагностической панели, позволяющей определять три герминальные мутации: с.1100delC, с.444+1G>A и с.470Т>С в гене *CHEK2*.

**Результаты.** У больных с диагнозом РМЖ частота мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* составила 3,8 %, у пациенток с ДЗМЖ данная мутация выявлена в 4,7 % случаев. Частота генетического варианта с.470Т>С в группах повышенного риска составила 5,1 % для больных РМЖ с клиническими признаками наследственного заболевания и 4,9 % для пациенток с ДЗМЖ, имеющих онкологически отягощенный семейный анамнез. Статистически значимых различий между частотой мутации с.470Т>С в общих группах больных РМЖ и пациенток с ДЗМЖ и соответствующей частотой в группах повышенного риска, а также в группах больных РМЖ и пациенток с ДЗМЖ не установлено ( $p > 0,05$ ).

**Заключение.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют о вероятном отсутствии связи между наличием мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* и повышением риска развития РМЖ.

**Ключевые слова:** наследственный рак молочной железы, мутации в гене *CHEK2*, генетический вариант с.470Т>С

**Для цитирования:** Новикова Е.И., Боженко В.К., Кудинова Е.А., Солодкий В.А. Исследование влияния генетического варианта с.470Т>С в гене *CHEK2* на повышение риска развития рака молочной железы у населения Российской Федерации. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(1):26–31. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-26-31.

## Studying of the effect of the genetic variant c.470T>C in the *CHEK2* gene on increasing the risk of breast cancer in the population of the Russian Federation

E.I. Novikova, V.K. Bozhenko, E.A. Kudinova, V.A. Solodkiy

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia

**Contacts:** Ekaterina Ivanovna Novikova e.novikova.ncrr@mail.ru

**Introduction.** Currently, there are conflicting data regarding the effect of the c.470T>C germline mutation in the *CHEK2* gene on increasing the risk of breast cancer (BC), so it is necessary to conduct research on large samples of patients, including in the Russian population, in order to analyze the contribution of this mutation to the risk of cancer developing.

**The aim of the study** was to determine the frequency of occurrence of the genetic variant c.470T>C in the *CHEK2* gene in the Russian population in patients with BC and patients with benign breast diseases (BBD) to assess the possible effect of this deoxyribonucleic acid damage on the likelihood of cancer occurrence.

**Materials and methods.** The study included 2,787 patients with BC and 1,004 patients with BBD who underwent examination and treatment at the Russian Scientific Center of Roentgenradiology of the Ministry of the Russian Federation from 2010 to 2018. Molecular genetic study was carried out by real-time polymerase chain reaction to determine the characteristic of the Russian population hereditary genetic variant c.470T>C in the *CHEK2* gene using a diagnostic panel that allows to determine three germline mutations: c.1100delC, c.444+1G>A and c.470T>C in the *CHEK2* gene.

**Results.** In patients with BC the frequency of the mutation c.470T>C in the *CHEK2* gene was 3.8 %, in patients with BBD this mutation was detected in 4.7 % of cases. The frequency of the genetic variant c.470T>C in high-risk groups was: 5.1 % – for BC patients with clinical signs of hereditary disease and 4.9 % – for patients with BBD with a family history of cancer. There were no statistically significant differences between the frequency of the mutation c.470T>C in the general groups of BC patients and patients with BBD and the corresponding frequency in the high-risk groups, as well as in the groups of BC patients and patients with BBD ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion.** The results of this study indicate the probable absence of a relationship between the presence of the mutation c.470T>C in the *CHEK2* gene and an increased risk of BC.

**Key words:** hereditary breast cancer, mutations in the *CHEK2* gene, genetic variant c.470T>C

**For citation:** Novikova E.I., Bozhenko V.K., Kudinova E.A., Solodkiy V.A. Studying of the effect of the genetic variant c.470T>C in the *CHEK2* gene on increasing the risk of breast cancer in the population of the Russian Federation. *Uspexhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(1):26–31. (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-26-31.

## ВВЕДЕНИЕ

Ген *CHEK2* находится на втором месте по частоте встречаемости в нем наследственных мутаций при раке молочной железы (РМЖ) после генов *BRCA1* и *BRCA2* в российской популяции. *CHEK2* кодирует треонин киназу (threonine kinase) – белок, который активируется при повреждении дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и участвует в процессах репарации, клеточной пролиферации, а также контролирует процессы апоптоза [1]. Поэтому риск развития онкологического заболевания у носителей повреждений в данном гене повышен по сравнению с общепопуляционным. Для российской популяции наиболее характерны герминальные мутации c.1100delC, c.444+1G>A и c.470T>C в гене *CHEK2*, которые были внесены в стандартные диагностические панели, используемые в ежедневной практике молекулярно-генетических лабораторий [2]. Но эти генетические повреждения имеют разную пенетрантность, т. е. вероятность развития заболевания у носителей мутаций различается. Если связь между наличием мутаций c.1100delC и c.444+1G>A в гене *CHEK2* и повышением риска развития РМЖ у их носителей в 3–5 раз доказана [3–5], то относительно связи генетического варианта c.470T>C с повышением риска развития РМЖ имеются противоречивые данные. Часть проведенных зарубежных исследований описывает достоверное, хоть и небольшое повышение риска (отношение шансов (ОШ) = 1,4–1,58) у носителей данной мутации [5–8]. В других научных работах, в том числе российских, связь с повышенным риском развития (ППР) РМЖ опровергается [2, 9–12]. В настоящее время даже для носителей среднепенетрантных мутаций c.1100delC и c.444+1G>A в гене *CHEK2*, а уж тем более для пациентов, имеющих низкопенетрантный генетический вариант c.470T>C, от-

сутствуют конкретные рекомендации по профилактике и лечению, кроме проведения диагностических мероприятий (маммография в сочетании с магнитно-резонансной томографией по достижению 30–40 лет) [13]. Однако ведущие российские онкологи учитывают наличие данной мутации (c.470T>C) при выборе тактики лечения и проведении профилактических операций [14]. В связи с этим исследования на больших выборках больных РМЖ в российской популяции для изучения вклада данного варианта в риск развития онкологического заболевания являются актуальными и клинически важными.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В молекулярно-генетическое исследование были включены 2787 пациенток с диагнозом «РМЖ», которым он был впервые поставлен в возрасте от 20 до 90 лет (средний возраст манифестации заболевания – 58 лет), и 1004 пациентки с доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗМЖ), у которых болезнь развилась в возрасте от 20 до 78 лет (средний возраст ее манифестации – 45 лет).

Пациентки проходили обследование и лечение в ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиологии» Минздрава России с 2010 по 2018 г. (табл. 1).

Среди пациенток были выделены группы ППР заболевания, согласно рекомендациям Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology, ESMO) [15] и Национальной онкологической сети США (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) [13]. В данные группы вошли 486 пациенток с ДЗМЖ, имеющих онкологически отягощенный семейный анамнез, и 1072 больные РМЖ, имеющих хотя бы один из следующих клинических признаков наследственного заболевания (КПНЗ):

**Таблица 1.** Клиническая характеристика пациентов, включенных в молекулярно-генетическое исследование

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the molecular genetic examination

Характеристика Characteristic	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)	
	РМЖ, n = 2787 BC, n = 2787	ДЗМЖ, n = 1004 BBD, n = 1004
<b>1. Возраст</b> 1. Age		
Средний возраст манифестации заболевания Average age of disease manifestation	58 (20–90) лет 58 (20–90) years	42 (20–78) года 42 (20–78) years
До 50 лет Under 50 y.o.	975 (35)	823 (82)
51 год и старше 51 y.o. and older	1812 (65)	181 (18)
<b>2. Семейный онкологический анамнез</b> 2. Family cancer history		
Отягощен Burden	362 (13)	486 (48)
Не отягощен Not burden	2425 (87)	518 (52)
<b>3. Диагноз</b> 3. Diagnosis		
ПМЗН (РМЖ/РМЖ или РМЖ/РЯ) PMMN (BC/BC or BC/OC)	157 (6)	—
РМЖ BC	2630 (94)	—
Фиброаденома молочной железы Breast fibroadenoma	—	361 (36)
Солитарная киста молочной железы Breast solitary cyst	—	20 (2)
Диффузная кистозная мастопатия Diffuse cystic mastopathy	—	242 (24)
Фиброаденоз молочной железы Breast fibroadenosis	—	231 (23)
Фибросклероз молочной железы Breast fibrosclerosis	—	110 (11)
Другие доброкачественные дисплазии молочной железы Other benign breast dysplasias	—	40 (4)

Окончание табл. 2

End of table 2

<b>4. Молекулярный подтип опухоли</b> 4. Molecular subtype of tumor		
ER <sup>+</sup> и/или PR <sup>+</sup> , Her2 <sup>-</sup>	1784 (64)	—
ER <sup>+</sup> и/или PR <sup>+</sup> , Her2 <sup>+</sup>	613 (22)	—
ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , Her2 <sup>+</sup>	139 (5)	—
ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , Her2 <sup>-</sup>	251 (9)	—
<b>5. Гистологический тип опухоли</b> 5. Histological type of tumor		
Инвазивный протоковый РМЖ Infiltrating ductal carcinoma	1951 (70)	—
Инвазивный дольковый РМЖ Invasive lobular carcinoma	446 (16)	—
Другие Other	390 (14)	—
<b>6. Признак повышенного риска развития РМЖ</b> 6. Sign of an increased risk of breast cancer developing		
Наличие Presence	1072 (38)	486 (48)
Отсутствие Absence	1715 (62)	518 (52)

**Примечание.** ДЗМЖ — доброкачественные заболевания молочной железы; ПМЗН — первично-множественные злокачественные новообразования; РМЖ — рак молочной железы; РЯ — рак яичников.

**Note.** BBD — benign breast diseases; PMMN — multiple primary malignant neoplasms; BC — breast cancer; OC — ovarian cancer.

молодой возраст манифестации заболевания (до 50 лет), онкологически отягощенный семейный анамнез (наличие родственников первой и/или второй степени родства с диагнозом РМЖ и/или рака яичников (РЯ)), наличие первично-множественных опухолей (РМЖ/РМЖ или РМЖ/РЯ) (см. табл. 1).

ДНК была выделена из 100 мкл периферической крови с помощью наборов «М-Сорб» (компания «Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени проводили с использованием наборов реагентов «ОнкоГенетика СНЕК2» (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия) на детектирующем амплификаторе «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции, предоставленной фирмой-производителем.

Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения StatSoft Statistica 10.0. Для сравнения частот мутации в различных группах пациенток применялся анализ таблиц сопряженности

**Таблица 2.** Частота мутации *c.470T>C* в гене *CHEK2* у больных раком молочной железы (РМЖ) и пациенток с доброкачественными заболеваниями молочной железы (ДЗМЖ)

**Table 2.** Frequency of the *c.470T>C* mutation in the *CHEK2* gene in patients with breast cancer (BC) and patients with benign breast diseases (BBD)

Диагноз Diagnosis	Число пациентов с мутацией, <i>n</i> Number of mutation carriers, <i>n</i>		Частота мутации, % Mutation frequency, %	
	Общая группа General group	Группа ПРР РМЖ Group of IRD of BC	Общая группа General group	Группа ПРР РМЖ Group of IRD of BC
РМЖ BC	106	55	3,8 ± 0,4	5,1 ± 0,7
ДЗМЖ BBD	47	24	4,7 ± 0,7	4,9 ± 1,0

**Примечание.** ПРР — повышенный риск развития.

*Note.* IRD — increased risk of developing.

с использованием критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса. Различие частот считалось статистически значимым при  $p < 0,05$ .

Стандартная ошибка частоты мутации *sp* вычислялась по формуле

$$sp = \sqrt{p(1 - p)/n},$$

где *p* — частота мутации, *n* — число пациентов в группе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного молекулярно-генетического обследования у 106 больных РМЖ (3,8 %) и 47 пациенток с ДЗМЖ (4,7 %) выявлена мутация *c.470T>C* в гене *CHEK2* (табл. 2).

У больных РМЖ с данным генетическим вариантом средний возраст манифестации заболевания составил 52 года (табл. 3). Более половины из них (53 %) к моменту обнаружения заболевания были старше 50 лет. Только 9 % пациенток имели онкологически отягощенный семейный анамнез, 7 % имели первично-множественные опухоли (РМЖ/РМЖ или РМЖ/РЯ). Средний возраст манифестации заболевания у носителей мутации с ДЗМЖ был ниже и составил 41 год. Только у половины из них (51 %) наблюдался онкологически отягощенный семейный анамнез. В группах пациенток с мутацией признаки ПРР РМЖ отмечены примерно у половины обследованных (у 52 % больных РМЖ и 51 % пациенток с ДЗМЖ), что говорит об отсутствии связи между наличием данного генетического варианта у пациенток и присутствием характерных признаков ПРР заболевания.

Частота данного генетического варианта в группах повышенного риска составила 5,1 % и 4,9 % соответственно (см. табл. 2). Различий, имеющих статистическую значимость, между частотой мутации *c.470T>C* в общих группах больных РМЖ и пациенток с ДЗМЖ и соответствующей частотой в группах повышенного риска, а также в группах больных РМЖ и пациенток с ДЗМЖ не установлено ( $p > 0,05$ ). Данный факт можно объяснить как низкой вероятностью развития заболевания при наличии данного генотипа (низкой

**Таблица 3.** Клиническая характеристика пациентов с мутацией *c.470T>C* в гене *CHEK2*

**Table 3.** Clinical characteristics of patients with the *c.470T>C* mutation in the *CHEK2* gene

Характеристика Characteristic	Число пациентов, <i>n</i> (%) Number of patients, <i>n</i> (%)	
	РМЖ, <i>n</i> = 106 BC, <i>n</i> = 106	ДЗМЖ, <i>n</i> = 47 BBD, <i>n</i> = 47
<b>1. Возраст</b> 1. Age		
Средний возраст манифестации заболевания Average age of disease manifestation	52 (24–85) года 52 (24–85) years	41 (26–61) год 41 (26–61) years
До 50 лет Under 50 y.o.	50 (47)	42 (89)
51 год и старше 51 y.o. and older	56 (53)	5 (11)
<b>2. Семейный онкологический анамнез</b> 2. Family cancer history		
Отягощен Burden	10 (9)	24 (51)
Не отягощен Not burden	96 (91)	23 (49)
<b>3. Диагноз</b> 3. Diagnosis		
ПМЗН (РМЖ/РМЖ или РМЖ/РЯ) PMMN (BC/BC or BC/OC)	7 (7)	—
РМЖ BC	99 (93)	—
<b>4. Признак повышенного риска развития РМЖ</b> 4. Sign of an increased risk of breast cancer developing		
Наличие Presence	55 (52)	24 (51)
Отсутствие Absence	51 (48)	23 (49)

**Примечание.** ДЗМЖ — доброкачественные заболевания молочной железы; ПМЗН — первично-множественные злокачественные новообразования; РМЖ — рак молочной железы; РЯ — рак яичников.

*Note.* BBD — benign breast diseases; PMMN — multiple primary malignant neoplasms; BC — breast cancer; OC — ovarian cancer.

пенетрантностью мутации), так и отсутствием связи между наличием данного генетического варианта и повышением риска развития онкологического заболевания.

В исследовании, проведенном в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, частота мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* в группе больных РМЖ ( $n = 963$ ) составила 5,7 % [2], что в 1,5 раза превышает частоту генетического варианта, полученную в нашем исследовании (95 % доверительный интервал (ДИ): 1,08–2,16;  $p = 0,01$ ). Этот факт может объясняться гетерогенностью выборки по этнической принадлежности. Частота данной мутации, которая была установлена в российском исследовании у больных РМЖ из Республики Башкортостан ( $n = 977$ ) [9], составила 5,12 % и не имеет статистически значимых различий с соответствующей частотой, полученной в нашем исследовании ( $p > 0,05$ ). Оба исследования, ранее проведенные в российской популяции [2, 9], показали отсутствие статистически значимых различий между частотой мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* в группе больных РМЖ и контрольной группе, что подтверждает предположение о вероятном отсутствии связи между наличием этого генетического варианта и повышением риска развития РМЖ.

Данные исследований зарубежных ученых носят противоречивый характер. С. Cybulski и О. Kilpivaara и соавт. показали, что в польской и финской популяциях наблюдается относительно небольшое повышение риска развития РМЖ у носителей мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* (ОШ равно 1,4 и 1,43 соответственно) [5, 6].

Риск развития РМЖ оказался значительно повышен у носителей данного генетического варианта при обследовании немецкой и белорусской популяций (ОШ

равно 3,6 и 4,5 соответственно) [4]. Метаанализ результатов обследований 19621 больного РМЖ и 27001 здорового донора, проведенных в ряде стран Европы и Америки (Польша, Финляндия, Чехия, Белоруссия, Нидерланды, Великобритания, США, Канада и Германия), показал, что наличие мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* сопряжено с ПРР РМЖ (ОШ = 1,48; 95 % ДИ: 1,31–1,66;  $p < 0,0001$ ) [7]. Другой метаанализ результатов обследований 15985 больных РМЖ и 18609 здоровых доноров из Германии, Польши, Латвии, Чехии и Белоруссии выявил более высокий риск развития заболевания, ассоциированный с данным генетическим вариантом (ОШ = 1,58; 95 % ДИ: 1,42–1,75,  $p < 0,00001$ ) [8]. Зарубежные исследования опровергают связь между наличием мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* и повышением риска развития РМЖ у жителей Северной Америки и Чехии [10–12]. В некоторых популяциях данный генетический вариант вовсе не был обнаружен. Мутация с.470Т>С в гене *CHEK2* отсутствовала у жителей Великобритании, Якутии (Россия), Китая и Ирана [10, 16–18].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенного исследования, а также других российских исследований свидетельствуют о вероятном отсутствии связи между наличием мутации с.470Т>С в гене *CHEK2* и повышением риска развития РМЖ. Однако в связи с наличием зарубежных исследований, подтверждающих связь данного генетического варианта с развитием РМЖ, проведение масштабных исследований для изучения вклада мутации с.470Т>С в риск развития онкологического заболевания является клинически важной и актуальной задачей.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stracker T.H., Usui T., Petrini J.H. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair* 2009;8(9):1047–54. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.04.012.
2. Батенева Е.И. Новая диагностическая панель для выявления наследственной предрасположенности к развитию рака молочной железы и рака яичников. Дис. ... канд. мед. наук. ФГБНУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина» Минздрава России. М., 2015. 125 с. [Bateneva E.I. A new diagnostic panel for detecting hereditary predisposition to breast cancer and ovarian cancer. Diss. ... candidate of medical sciences. N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Russian. Moscow, 2015. 125 p. (In Russ.)].
3. Weischer M., Bojesen S.E., Ellervik C. et al. *CHEK2*\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008;26(4):542–8. DOI: 10.1200/JCO.2007.12.5922.
4. Bogdanova N., Enssen-Dubrowskaja N., Feshchenko S. et al. Association of two mutations in the *CHEK2* gene with breast cancer. *Int J Cancer* 2005;116:263–6. DOI: 10.1002/ijc.21022.
5. Cybulski C. Selected aspects of inherited susceptibility to prostate cancer and tumours of different site of origin. *Hered Cancer Clin Pract* 2007;5(3):164–79. DOI: 10.1186/1897-4287-5-3-164.
6. Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. et al. *CHEK2* variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2004;111:543–7. DOI: 10.1002/ijc.20299.
7. Liu C., Wang Y., Wang Q.S. et al. The *CHEK2* I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(4):1355–60. DOI: 10.7314/apjcp.2012.13.4.1355.
8. Han F.F., Guo C.L., Liu L.H. The effect of *CHEK2* variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA Cell Biol* 2013;32(6):329–35. DOI: 10.1089/dna.2013.1970.
9. Бермишева М.А., Тахирова З.Р., Богданова Н. и др. Частота мутаций в гене *CHEK2* у больных раком молочной железы из Республики Башкортостан. *Молекулярная биология*. 2014;48(1):55–61. [Bermisheva M.A., Tahirova Z.R., Bogdanova N. et al. Frequency of *CHEK2* gene mutations in patients with breast cancer from the republic of bashkortostan.

- Molekuljarnaja biologija = Molecular biology 2014;48(1):55–61. (In Russ.]. DOI: 10.7868/S0026898414010029.
10. Schutte M., Seal S., Barfoot R. et al. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet* 2003;72(4):1023–8. DOI: 10.1086/373965.
  11. Kleibl Z., Havranek O., Novotny J. et al. Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112(1):159–64. DOI: 10.1007/s10549-007-9838-7.
  12. Friedrichsen D.M., Malone K.E., Doody D.R. et al. Frequency of *CHEK2* mutations in a population based, case–control study of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res* 2004;6(6):629–35. DOI: 10.1186/bcr933.
  13. Daly M.B., Pilarski R., Berry M. et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15(1):9–20. DOI: 10.6004/jncn.2017.0003.
  14. Каприн А.Д., Костин А.А., Зикиряходжаев А.Д. и др. Рак молочной железы, ассоциированный с носительством мутации *CHEK2*. *Акушерство и гинекология* 2018;(5):102–7. [Kaprin A.D., Kostin A.A., Zikyrahodzhaev A.D. et al. Breast cancer associated with carriage of a mutation *CHEK2*. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and gynecology* 2018;(5):102–7. (In Russ.)]. DOI: 10.18565/aig.2018.5.102-7.
  15. Paluch-Shimon S., Cardoso F., Sessa C. et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol* 2016;27(5):103–10. DOI: 10.1093/annonc/mdw327.
  16. Фарахтдинова А., Федорова С., Николаева Т. и соавт. Анализ мутаций в генах *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1* у больных раком молочной железы из Республики Саха (Якутия). *Якутский медицинский журнал* 2009;2(26):91–3. [Farahtdinova A., Fedorova S., Nikolaeva T. et al. Analiz mutacij v genah *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1* u bol'nyh rakom molochnoj zhelezy iz Respubliki Saha(Yakutia). *Jakutskij medicinskij zhurnal = Yakut Medical Journal* 2009;2(26):91–3. (In Russ.)].
  17. Liu Y., Liao J., Xu Y. et al. A recurrent *CHEK2* p.H371Y mutation is associated with breast cancer risk in chinese women. *Hum Mutation* 2011;32(9):1000–3. DOI: 10.1002/humu.21538.
  18. Jalilvand M., Oloomi M., Najafipour R. et al. An association study between *CHEK2* gene mutations and susceptibility to breast cancer. *Comp Clin Pathol* 2017;26(4): 837–45. DOI: 10.1007/s00580-017-2455-x.

**Вклад авторов:**

Е.И. Новикова: сбор клинического материала, проведение молекулярно-генетических исследований, анализ и статистическая обработка результатов, подготовка и написание текста статьи;

В.К. Боженко: анализ результатов, редактирование текста статьи;

Е.А. Кудинова: анализ литературы, анализ результатов исследования;

В.А. Солодкий: планирование и анализ результатов исследования, редактирование текста статьи.

**Authors' contributions**

E.I. Novikova: the collection of clinical material, carrying out molecular genetic studies, analysis and statistical processing of the results, preparation and writing of article;

V.K. Bozhenko: analysis of the results, edit the text of the article;

E.A. Kudinova: analysis of the literature, analysis of the research results;

V.A. Solodkiy: planning and analysis of the research results, edit the text of the article.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Е.И. Новикова / E.I. Novikova: <https://orcid.org/0000-0003-4437-3661>

В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>

Е.А. Кудинова / E.A. Kudinova: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

В.А. Солодкий / V.A. Solodkiy: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики:**

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России (протокол № 3 от 27.03.2020 г.).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Russian Scientific Center of Roentgenradiology, Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 11.12.2020. **Принята к публикации:** 09.03.2021.

**Article submitted:** 11.12.2020. **Accepted for publication:** 09.03.2021.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40



# Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека

Т.И. Кушнир, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

**Введение.** Мультиформная глиобластома (МГБ) развивается на фоне гипоксической микросреды, играющей важную роль в патогенезе заболевания и тесно связанной с ростом и развитием опухоли и плохим прогнозом. Гипоксия (ГС) повышает резистентность опухолевых клеток (ОК) к лучевой терапии и химиотерапии, способствует появлению агрессивного фенотипа ОК, приводящего к рецидиву заболевания. Молекулярные механизмы действия ГС на секретом клеток МГБ, участвующий в формировании микроокружения опухоли, остается не изученным. В настоящее время также не установлены маркеры агрессивного гипоксического фенотипа опухолевых клеток.

**Цель исследования** – изучение молекулярных механизмов действия гипоксии на секретом клеток U251 МГБ. **Материалы и методы:** протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения, клеточные технологии.

**Результаты.** В секретоме двух типов клеток МГБ (контроля и опыта) в целом идентифицированы 1432 белка. После действия гипоксии зарегистрированы статистически значимые изменения в экспрессии 390 белков. Повышение экспрессии более чем на два порядка наблюдали у 11 протеинов. Идентифицированы внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за действие гипоксии на клетки U251 МГБ.

**Заключение.** Гипоксия оказывала заметное влияние на протеомный состав секретоме клеток МГБ. В качестве потенциальных маркеров гипоксического фенотипа МГБ предложены 5 гиперэкспрессированных белков секретоме: S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, для которых ранее доказано участие в патогенезе мультиформной глиобластомы.

**Ключевые слова:** мультиформная глиобластома, гипоксия, протеом, секретом, прогностические маркеры, масс-спектрометрия

**Для цитирования:** Кушнир Т.И., Арноцкая Н.Е., Кудрявцев И.А., Митрофанов А.А., Бекашев А.Х., Шевченко В.Е. Влияние гипоксии на секретом клеток мультиформной глиобластомы человека. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(1):32–40. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40.

## The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells

T.I. Kushnir, N.E. Arnotskaya, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.K. Bekyashev, V.E. Shevchenko

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Contacts:** Valeriy Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

**Background.** Glioblastoma multiforme (GBM) develops in the hypoxic microenvironment, which plays an important role in the pathogenesis of the disease and is closely associated with tumor growth, development and poor prognosis. Hypoxia increases the resistance of tumor cells (TC) to radiation therapy and chemotherapy, promotes the appearance of an aggressive TC phenotype, leading to the disease recurrence. The molecular mechanism of hypoxic action on the secretome of GBM cells, which is involved in the formation of the tumor microenvironment, remains unclear. Also, markers of the aggressive hypoxia-associated phenotype of tumor cells have not been established.

**The purpose of research** – to study the molecular mechanisms of the hypoxia-associated effect on the secretome of the U251 GBM cells.

**Materials and method.** High resolution proteomic mass spectrometry, cell technologies.

**Results.** A total of 1432 proteins were identified in the secretomes of two types of GBM cells (control and experiment). After the action of hypoxia, statistically significant changes in the expression of 390 proteins were registered. 11 proteins showed increase in expression over two orders of magnitude. The intracellular signaling pathways which are responsible for the hypoxia-associated effects on the U251 GMB cells have been identified.

**Conclusions.** Hypoxia significantly affected the proteomic composition of the GBM cells secretome. Five overexpressed secretome proteins, S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, have been proposed as potential markers of the hypoxia-associated phenotype of GBM, for which participation in the pathogenesis of glioblastoma multiforme has been previously showed.

**Key words:** glioblastoma multiforme, hypoxia, proteome, secretome, prognostic markers, mass spectrometry

**For citation:** Kushnir T.I., Arnotskaya N.E., Kudryavtsev I.A., Mitrofanov A.A., Bekyashev A.K., Shevchenko V.E. The effect of hypoxia on the secretome of human glioblastoma multiforme cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(1):32–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-32-40.

## ВВЕДЕНИЕ

Мультиформная глиобластома (МГБ), или астроцитомы IV степени злокачественности, – наиболее распространенная, инвазивная, первичная, глиальная опухоль головного мозга человека. МГБ развивается на фоне сильной гипоксии (ГС) ( $pO_2 = 0,5–2,5\%$ ), играющей важную роль в патогенезе заболевания [1, 2]. ГС – результат высокой пролиферативной и метаболической активности злокачественных клеток [3]. Ранее показано, что прогрессирование опухоли обусловлено гипоксической передачей сигналов [4]. Инвазия опухоли одна из основных причин смерти больных МГБ. Низкая оксигенация опухоли модулирует взаимодействие стромальных клеток в микроокружении опухоли, способствует выживанию и распространению ОК в здоровую паренхиму головного мозга. ГС приводит к снижению чувствительности клеток МГБ к облучению и цитотоксической активности многих видов химиотерапии [1, 5].

Поскольку в глиомах часто присутствуют участки с различными степенями злокачественности в опухоли, важное значение приобретает изучение особенностей, закономерностей и механизмов образования агрессивного фенотипа клеток МГБ в условиях ГС. Актуальной становится идентификация молекулярных детерминант фенотипической трансформации линий клеток МГБ человека при действии ГС.

В настоящее время считается, что не только протеом ОК, но и их секретом имеет важное значение, представляя собой микросреду опухоли, играющую ключевую роль в формировании злокачественного фенотипа, а также в процессах ангиогенеза и инвазии. Изучение в опытах *in vitro* секретомы линий клеток МГБ даст возможность оценить глубину изменений их фенотипа под влиянием фактора клональной селекции – ГС, чтобы использовать эти данные в клинической онкологии.

В данной работе мы исследовали эффект ГС на секретомы линий клеток U251 МГБ человека, культивируемых в условиях нормоксии (НС) и низкой оксигенации (1 %  $O_2$ ). ГС существенно влияла на секретомы опухолевых клеток. В частности, ее действие повышало более чем на два порядка уровни 11 белков секретомы, для которых участие в канцерогенезе отмечено во многих исследованиях. Эти гиперэкспрессированные белки могут являться потенциальными маркерами ги-

поксического фенотипа (ГФ) клеток МГБ и использоваться для его обнаружения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение секретомы клеток U-251 МГБ.** Клетки линии U-251 культивировали при температуре +37 °С в увлажненной атмосфере с 5 %  $CO_2$  в среде DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, Россия) с низким содержанием глюкозы, глутамином, добавлением 10 % бычьего сывороточного альбумина, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) в общем объеме 15 мл в пластиковых флаконах для культур клеток (75 см<sup>2</sup>) (Corning Costar, США).

При достижении 70 % монослоя (после 48 ч роста) клетки двукратно осторожно отмывали бессывороточной средой, затем культивировали в бессывороточной среде в течение 24 ч при температуре +37 °С в различных условиях:

- 1) контрольный образец клеток инкубировали при 20 % содержании  $O_2$  (в нормоксических условиях);
- 2) опытный образец клеток инкубировали при 1 % содержании  $O_2$  (в гипоксических условиях).

Контрольные и опытные клетки выращивали в трех экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали. После инкубации отбирали кондиционированную среду (КС) (по 45 мл), центрифугировали на оборудовании Biosan LMC-3000 (Biosan, Латвия) при 1500 об/мин 10 мин для удаления интактных клеток и клеточного дебриса. Супернатант пропускали через 0,22 мкм фильтр и хранили при –80 °С для дальнейшего использования. Число мертвых клеток оценивали окрашиванием культуры клеток трипановым синим, а их относительное количество – по соотношению уровней лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (показателя гибели клеток): КС(ГС)/КС(НС).

**Подготовка образцов для масс-спектрометрии.** Секретомы опухолевых клеток подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений описанным методом [6]. После ферментативного расщепления (трипсинолиза) образцы концентрировали при +30 °С в центрифужном концентраторе Labconco CentriVar (Labconco, США) для полного удаления бикарбоната аммония.

Продукты трипсинолиза секретомы ОК (100 мкг) растворяли в 50 мкл фазы А (20 мМ  $NH_4OH$ , pH 10) и фракционировали на колонке Zorbax 300 Extend-C18



(2,1 × 500 мм; 3,5 мкм) (Agilent, США) на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ) Agilent 1100 (Agilent, США), оборудованном коллектором фракций и УФ-детектором. Объем введенной пробы составлял 20 мкл, температура колонки – 25 °С, детектирование по УФ-поглощению при длине волны 214, 254, 280 нм. Подвижная фаза состояла из двух фаз: А (20 мМ NH<sub>4</sub>OH, pH 10) и Б (20 % фазы А плюс 80 % ацетонитрила). Колонку уравнивали фазой А в течение 30 мин перед вводом образца. Для фазы Б градиент подвижной фазы был установлен следующим образом (при скорости потока 300 мкл/мин): а) от 0 до 5 мин: 0 %; б) от 5 до 35 мин – 0–35 %; в) от 35 до 45 мин – 35–100 %; г) от 45 до 60 мин – 100 %; д) от 60 до 70 мин – 100–0 %. Всего были собраны 24 фракции от 0 до 50 мин с интервалами 1,5 и 3 мин. Фракции упаривали досуха при 30 °С в центрифужном испарителе CentriVap (Labconco, США) и повторно разбавляли 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты для масс-спектрометрического анализа.

**Масс-спектрометрический анализ.** Анализ пептидов, образованных после трипсинолиза белков секрета ОК, проводили с использованием нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Dionex, США) и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) с источником ионизации NanoSpray (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) [6]. Для обработки масс-спектрометрических данных использовали программное обеспечение MaxQuant (v1.6.1.0; Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия). Таблицу полученных белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости различий в уровнях белков, полученных методом label-free (без метки). Значимыми считали различия при уровне достоверности  $p < 0,05$  для парного t-критерия Стьюдента.

Аннотирование биологических, молекулярных функций и сигнальных путей проводили с помощью открытых баз данных PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), PANTHER ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)), GeneOntology ([www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/)), Swiss-Prot ([www.uniprot.org/uniprot](http://www.uniprot.org/uniprot)), KEGG ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)), DAVID ([david.ncifcrf.gov/home.jsp](http://david.ncifcrf.gov/home.jsp)). Анализ данных The Cancer Genome Atlas (TCGA) (200 больших МГБ) выполняли с помощью программы GBM-BioDP с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При получении высококачественного секрета ОК предварительно изучался эффект ГС на выживаемость линии клеток U251 МГБ. Перед проведением опыта количество мертвых клеток в контрольном и опытно образцах составляло ~3 %. После инкубации ОК в нормоксических условиях в течение 24 ч число мертвых клеток увеличилось до ~5 %, под дейст-

вием ГС – до ~8 %. Соотношение уровней ЛДГ(ГС)/ЛДГ(НС) составило 1,3.

Мы использовали метод label-free для количественного нано-ВЭЖХ – МС/МС (тандемная масс-спектрометрия) анализа секретомов линии клеток U251 МГБ человека в условиях НС и ГС (1 % O<sub>2</sub>) в течение 24 ч. Анализом триптических пептидов по их 11 059 спектрам МС/МС с помощью программного пакета MaxQuant были просеквенированы 1342 протеина по 3000 (2469 уникальным) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt\_human и ложным уровнем обнаружения (a false discovery rate) 1 % для тройных повторов двух видов образцов. Из них 1133 белка идентифицировали по 2748 (2225 уникальным) пептидам в секретах контрольных клеток U251 и 1025 белков – по 2614 (2098 уникальным) пептидам в секретах клеток U251 после действия ГС. Для всех линий клеток ~32 % белков идентифицировали по 2 и более пептидам. Диапазон молекулярных масс протеинов изменялся от 0,96 до 2993 кДа, из них 524 имели молекулярный вес до 30 кДа, 568 – от 30 до 100 кДа, 206 – от 100 до 300 кДа, 26 – от 300 до 500 кДа, 18 – выше 500 кДа. Процент покрытия анализируемых белков варьировался от 0,2 до 100 %, из них: 1153 белка – с покрытием до 20 %, 155 – от 20 до 40 %, 21 – от 40 до 60 % и 13 – от 60 до 100 %. Коэффициент корреляции Пирсона для данных по образцам клеток U251 до и после действия ГС изменялся от 0,904 до 0,952.

Идентифицированные протеины показали достаточно высокий процент перекрытия для двух клеточных популяций. Восемьсот шестнадцать из 1342 (61 %) протеинов детектировались во всех клеточных секретах, 317 протеинов – только в секрете клеток U251, культивируемых в условиях НС, и 209 протеинов были уникальными для секрета клеток U251 после действия ГС.

Статистически значимые изменения в экспрессии ( $p < 0,05$ ) после действия ГС зарегистрировали для 390 белков. Триста сорок один протеин был дифференциально экспрессированным белком (ДЭБ) и изменял экспрессию более чем в 2 раза, 151 – увеличивал, а 190 – уменьшали. Повышение экспрессии более чем на два порядка наблюдали у 11 протеинов.

Динамический диапазон (определяемый порогом чувствительности масс-спектрометра и линейной зависимостью его сигнала от концентрации анализируемого объекта) для идентифицированных белков составляет 6 порядков (от  $4,1 \cdot 10^8$  до 363), что позволяет выявить низкокопийные белки (протеины с низкими уровнями концентрации в секрете), такие как кофиллин-2, MIF (Macrophage migration inhibitory factor) и др. Также идентифицированы специфические маркеры мезенхимального субтипа (CD44, интегрин  $\beta$ -1) МГБ.

Для лучшего понимания биологических процессов и путей, включенных в гипоксия-индуцированные отклики, мы провели развернутый биоинформатический анализ данных картирования белков секретомов



**Рис. 1.** Биологические процессы с участием дифференциально экспрессированных белков секретама клеток U251 мультиформной глиобластомы, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии  
**Fig. 1.** Biological processes involving the secretome differentially expressed proteins of the U251 glioblastoma multiforme cells cultured at hypoxia and normoxia



**Рис. 2.** Молекулярные функции дифференциально экспрессированных белков секретама клеток U251 мультиформной глиобластомы, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии  
**Fig. 2.** Differentially expressed proteins molecular functions of the secretome of the U251 glioblastoma multiforme cells cultured at hypoxia and normoxia

двух типов клеток с использованием KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и биологических процессов GO (Gene Ontology). В дальнейшем включали в анализ каждой из групп сравнения только ДЭБ.

Каждый идентифицированный белок, удовлетворяющий вышеназванным требованиям, классифицировался в соответствии с его биологической ролью в клетке, молекулярной функцией и функциональным классом. Основная часть ДЭБ участвовала в метаболических (GO:0008152) (28,1 %) и клеточных (GO:0009987) (28,8 %) процессах, а также в процессах организации клеточных компонентов, биогенезе (GO:0071840) (10,7 %) и локализации (GO:0051179) (9,4 %) (рис. 1).

Большая часть ДЭБ проявляла каталитическую (GO:0003824) (39,9 %), связывающую (GO:0005488) (35,4 %), структурно-молекулярную (GO:0005198) (13,4 %), транспортную (GO:0005215) (6,3 %) активность (рис. 2). Основная часть ДЭБ представлена нуклеопро-теидами (PC00171) (11,9 %), гидролазами (PC00121) (10,9 %), модуляторами энзимов (PC00095) (9,5 %), рецепторами (PC00197) (7,5 %), сигнальными молекулами (PC00207) (6,5 %).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ выживаемости линии клеток U251 МГБ при ГС и НС в течение 24 ч показал, что ГС в этих условиях оказывала достаточно слабый эффект. Число мертвых клеток в опыте не превышало 8 %, а в контроле – 5 %, что в целом не мешало получению высококачественного секретама опухолевых клеток и не сказывалось заметно на его качественном и количественном составе. Особенно это касалось ДЭБ, экспрессия которых менялась более чем в 2 раза. Несомненно, что небольшая часть белков секретама связана с гибелью клеток. Тем не менее ГС оказывала значительное влияние на внутриклеточные процессы, что находило свое отражение в протеомном составе секретама линии клеток U251 МГБ.

Нами обнаружено достаточно большое количество ДЭБ, 16 % идентифицированных протеинов были уникальными для ОК после ее действия. Происходили изменения с участием 77 % ДЭБ в клеточных, метаболических процессах, а также в процессах организации клеточных компонентов и биогенезе. Большая часть ДЭБ (89 %) проявляла каталитическую, связывающую и структурно-молекулярную активность. Появление в секретоме 13,4 % ДЭБ со структурно-молекулярной активностью можно объяснить тем, что основную часть этих протеинов составляли два высокоэкспрессированных коллагена (COL5A2 и COL1A2), участвующие в построении внеклеточного матрикса. Оба белка вырабатываются и секретируются клетками U251 МГБ. После действия ГС отмечали значительное обогащение сигнальных путей в клетках U251 МГБ, связанных с клеточным дыханием, инвазией, протеасомной активностью, презентацией антигенов (табл. 1).

Таблица 1. Анализ обогащения сигнальных путей после действия гипоксии на линию клеток U251 мультиформной глиобластомы

Table 1. Enrichment analysis of signaling pathways after exposure to hypoxia on the U251 glioblastoma multiforme cells

Сигнальный каскад Signal cascade	Дифференциально экспрессированный ген Differentially expressed gene	p*
Гликолиз/глюконеогенез Glycolysis/gluconeogenesis	AKR1A1; ALDH2; ALDOC; GAPDH; LDHA; LDHAL6B; PGAM1; PGM1; TPI1	2,5E-4
Фокальная адгезия Focal adhesion	ACTN1; COL1A1; COL1A2; COL5A2; COL6A1; FLNA; FLNC; FN1; ITGB5; LAMC1; MYL12A; MYL12B; MYL9; PTK2; RAPIA; RAPIB	5,0E-4
Регуляция актинового цитоскелета Regulation of the actin cytoskeleton	ACTN1; APC; ARPC2; BAIAP2; CFL1; CFL2; CHRM3; F2; FGF7; FN1; ITGB5; MYL12A; MYL12B; MYL9; PTK2; TMSB4X	1,0E-3
Протеасомы Proteasomes	PSMA1; PSMA3; PSMA5; PSMA6; PSMB4; PSMC5; PSME1	1,9E-3
Процессирование и презентация антигена Antigen processing and presentation	CIITA; HLA-DPB1; HLA-DRB1; HSP90AB1; HSPA1L; HSPA5; HSPA8; KIR2DL3; PSME1	2,2E-3
Взаимодействие внеклеточного матрикса с рецептором Interaction of the extracellular matrix with the receptor	COL1A1; COL1A2; COL5A2; COL5A2; COL5A2; DAG1; FN1; HMMR; ITGB5; LAMC1	2,4E-3

\* Модифицированное точное p-значение критерия Фишера для анализа обогащения генов с диапазоном значений от 0 до 1. Точное p-значение Фишера, равное 0, представляет собой идеальное обогащение. Обычно значение p равно или меньше 0,05, чтобы считаться сильно обогащенным в категориях аннотаций.

\* Modified exact p-value of the Fisher criterion for gene enrichment analysis with a range of values from 0 to 1. Exact p-value of the Fisher criterion of 0 represents ideal enrichment. Usually p-value is equal to or less than 0.05 to be considered highly enriched in annotation categories.

Таблица 2. Дифференциально экспрессированные белки секрета, уровни которых увеличились на 2 порядка при действии гипоксии на клетки U251 мультиформной глиобластомы

Table 2. The levels of secretome differentially expressed proteins which increased over 2 orders of magnitude under the action of hypoxia on the U251 glioblastoma multiforme cells

Индекс гена Gene index	Название белка Protein name	Молекулярный вес, кДа Molecular weight, kDa	Гипоксия/нормоксия Hypoxia/normoxia
S100A6	S100 кальций-связывающий белок A6 S100 calcium-binding protein A6	9,6810	509
HEY1	HESR белок-1, связанный с YRPW-мотивом HESR protein-1 associated with the YRPW motif	32,6380	293
ZIP3	Транспортер цинка ZIP3 Zinc-regulated transporter 3	11,2050	271
BAG6	Белок, богатый пролином BAG6 Large proline-rich protein BAG6	21,2240	221
ATP11A	Фосфолипид-транспортирующие аденозинтрифосфатазы 11A Adenosine triphosphatases phospholipid transporting 11A	10,5700	203
S100A4	S100 кальций-связывающий белок A4 S100 calcium-binding protein A4	11,7280	169
BAZ2B	Бром-домен, ассоциированный с доменом «цинкового пальца» 2B Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	240,4600	159
ZNF350	Белок «цинковый палец» 350 Zinc finger protein 350	60,0110	152
PSMA1	Протеасомная субъединица альфа-1 Proteasome subunit alpha type-1	26,5050	145
SORCS3	VPS10-доменный рецептор SorCS3 VPS10 domain-containing receptor SorCS3	135,7800	113
ZEB2	E-бокс-связывающий белок гомеобокс 2 «цинкового пальца» Zinc finger E-box binding homeobox 2	6,4847	90

В целом зарегистрированы изменения в 45 сигнальных каскадах.

ГС повышала экспрессию 151 ДЭБ и более чем на два порядка 11 белков (табл. 2), для которых участие в канцерогенезе отмечено во многих исследованиях. Согласно литературным источникам, BAG6, ATP11A, BAZ2B, ZNF350, PSMA1, SORCS3 участвуют в патогенезе ряда злокачественных новообразований (табл. 3). Для составления табл. 3 использовалась база данных The Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) с включенным в нее патологическим атласом с данными по опухолевым заболеваниям с повышенной экспрессией интересующих нас белков.

Роль перечисленных 6 белков в патогенезе МГБ и процессах, связанных с ГС, на текущий момент не известна. Впервые полученные нами данные о гиперэкспрессии секретируемых белков BAG6, ATP11A, BAZ2B, ZNF350, PSMA1, SORCS3 при действии ГС на клетки линии U251 МГБ могут быть полезны и ис-

пользованы в других исследованиях для поиска потенциальных терапевтических мишеней и маркеров ГФ МГБ.

При поиске потенциальных маркеров ГФ МГБ основное внимание уделялось 5 гиперэкспрессированным белкам: S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, для которых доказано участие в патогенезе МГБ. Согласно базам данных по изучению протеома человека (Human Proteome Project), протеомному составу ликвора и экзосомам (ExoCarta), все эти белки могут анализироваться в биологических жидкостях больных МГБ, потенциально использоваться для детектирования ГФ МГБ и прослеживания эффективности терапии заболевания.

Для оценки роли генов, кодирующих группу ДЭБ (S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2), в выживаемости больных МГБ были построены кривые Каплана – Мейера для 4 различных субтипов МГБ на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков – отношения риска события в определенный момент времени  $t$  в одной и другой группах (рис. 3). Показатель относится к методам оценки выживаемости и оценивается при проведении регрессионного анализа. Отношение рисков связано с вероятностью того, что событие, не произошедшее к определенному моменту времени, случится в следующий интервал времени. Вероятность того, что событие в одной группе наступит раньше, чем в другой, может быть рассчитана на основании показателя  $HR$  по формуле  $p = HR/(1 + HR)$ .

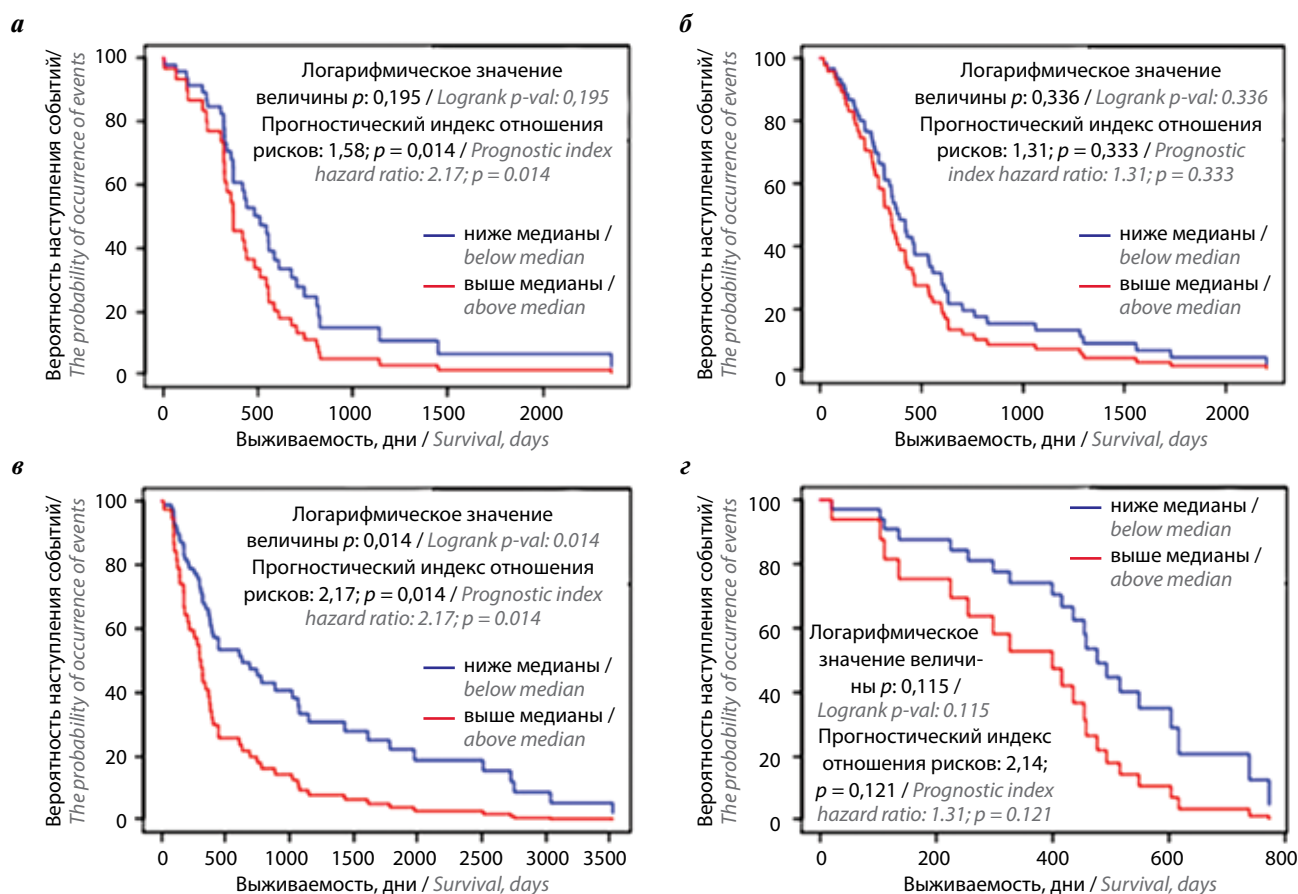
Анализ данных TCGA (200 больных МГБ), выполненный с помощью программы GBM-BioDP с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса, показал, что снижение в опухоли экспрессии группы матричных рибонуклеиновых кислот (мРНК), отвечающих перечисленным выше белкам, приводит к увеличению выживаемости пациентов с МГБ. Наибольший эффект наблюдался для больных с пронеуральным и нейральным субтипами МГБ.

Наиболее изученным белком этой группы является S100A4. Как видно из табл. 2, уровень S100A4 в секрете возрастал в 169 раз после действия ГС на клетки U251. Повышенная экспрессия S100A4 в опухолевой ткани наблюдалась при многих онкозаболеваниях [7]. S100A4 является прогностическим показателем выживаемости пациентов с глиомой и может использоваться в качестве маркера при МГБ [7]. S100A4 связан с мезенхимальным фенотипом МГБ и играет важную роль в пронеурально-мезенхимальном переходе (ПМП) [8]. Мезенхимальный субтип МГБ характеризуется наибольшей инвазивностью и резистентностью к терапии [9]. Нами показано, что уровень экспрессии S100A4 положительно ассоциировался с маркерами мезенхимального субтипа глиобластомы CD44 и FN1 (в условиях ГС экспрессия увеличивалась в 6,8 и 1,22 раза соответственно). Как полагают, S100A4 действует через систему MMP/TIMP (матриксные металлопротеиназы/ингибиторы металлопротеиназы) при индукции

**Таблица 3.** Злокачественные новообразования, в патогенезе которых участвует ряд дифференциально экспрессированных белков

**Table 3.** Malignant neoplasms in the pathogenesis of which a number of differentially expressed proteins are involved

Индекс гена Gene index	Злокачественное новообразование Malignant neoplasm
BAG6	Рак щитовидной железы, головы и шеи, яичка, предстательной железы, молочной железы, яичников, толстой кишки, карциноид, меланома Cancer of the thyroid gland, head and neck, testicle, prostate, breast, ovary, colon, carcinoid, melanoma
ATP11A	Рак щитовидной железы, поджелудочной железы, головы и шеи, мочевого пузыря, яичка, толстой кишки, меланома, карциноид Cancer of the thyroid gland, pancreas, head and neck, bladder, testicle, colon, melanoma, carcinoid
BAZ2B	Рак щитовидной железы, легких, печени, поджелудочной железы, головы и шеи, почки, мочевого пузыря, яичка, предстательной железы, эндометрия, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, лимфома Cancer of the thyroid gland, lungs, liver, pancreas, head and neck, kidney, bladder, testicle, prostate, endometrium, breast, cervix, colon, lymphoma
ZNF350	Рак головы и шеи, предстательной железы, шейки матки Cancer of the head and neck, prostate, cervix
PSMA1	Гепатоцеллюлярная карцинома, рак мочевого пузыря, желудка, шейки матки, яичка, щитовидной железы, меланома Hepatocellular carcinoma, cancer of the bladder, stomach, cervix, testicle, thyroid gland, melanoma
SORCS3	Рак почки Kidney cancer



**Рис. 3.** Анализ выживаемости 200 больных с классическим (а), мезенхемальным (б), proneйральным (в) и нейральным (г) субтипами мультиформной глиобластомы на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков с использованием данных по матричным рибонуклеиновым кислотам из базы «Атласа ракового генома»

**Fig. 3.** Survival analysis of 200 patients with with classical (a), mesenchymal (б), proneural (в), and neural (г) subtypes of glioblastoma multiforme based on the multigenic prognostic index Hazard ratio using matrix ribonucleic acids data from The cancer genome atlas database

инвазии и ангиогенеза. S100A4 сверхэкспрессирован в инвазивных клеточных линиях глиомы одновременно со снижением экспрессии TIMP2 (0,51 раза при ГС). Это указывает на тесную связь S100A4 с системой ММР (MMP19 – в 3,57 раза выше в условиях ГС) при инициации инвазии.

Ранее показано, что экспрессия белка S100A4 контролируется сигнальным путем Wnt/ $\beta$ -катенин [7]. Нами установлена прямая связь S100A4 с WNT/ $\beta$ -катенин каскадом (увеличение экспрессии CTNNB1 при ГС в 6,1 раза) и P53/статин сигнальным каскадом (увеличение экспрессии STMN1 в 2,45 и STMN2 в 53,22 раза). S100A4 является прямой мишенью  $\beta$ -катенин/TCF (transcription factor) и считается маркером ПМП, которому способствует его повышенная экспрессия [8].

Таким образом, в патогенезе МГБ S100A4 играет важную роль: является маркером мезенхимального субтипа опухолевых клеток и способствует метастазированию опухоли, участвует в регуляции клеточного цикла, клеточной пролиферации, подвижности, инвазии и инициирует процесс ангиогенеза.

Как показано в табл. 2, уровень белка S100A6 в секрете ОК возрастал в 509 раз после действия ГС на клетки U251. При ряде новообразований S100A6

сверхэкспрессирован [7, 10] и считается диагностическим маркером или прогностическим фактором при раке поджелудочной железы, желудка, предстательной железы, меланоме и гепатоцеллюлярной карциноме [11].

Белок S100A6 взаимодействует с Caspase/SIP (компонентом убиквитинлигазы) и таким образом может регулировать деградацию  $\beta$ -катенина. S100A6 ингибирует Caspase/SIP, стимулируя клеточную пролиферацию и миграцию, опухолегенез и ПМП посредством ингибирования деградации  $\beta$ -катенина [11].

Можно сделать вывод о том, что S100A6 играет важную роль в патогенезе глиобластомы, участвуя в регуляции нескольких клеточных функций, таких как пролиферация, апоптоз клеток и инвазия.

Согласно данным табл. 2, уровень белка HEY1 в секрете ОК возрастал в 293 раза после действия ГС на клетки U251. HEY1 участвует в патогенезе МГБ, ингибируя транскрипцию proneйральных транскрипционных факторов MASH1, MATH3, нейрогенина. Измененная активность сигнального пути NOTCH играет существенную роль в формировании опухолей головного мозга, увеличивая экспрессию HEY1 [12]. Повышенная активность фактора транскрипции E2F также увеличивает экспрессию HEY1 и усиливает пролиферацию

клеток [12]. Сигнальный путь TGF- $\beta$ /SMAD регулирует экспрессию HEY1 через канонический NOTCH или независимым от NOTCH способом. При активации TGF- $\beta$ 1 инициирование HEY1 происходит через связывание SMAD 3/SMAD 4 с промоторами HEY1 в положениях повторов связывающих элементов SMAD [13]. Как и в случае с каскадом NOTCH, сигнальный каскад TGF- $\beta$ /SMAD часто активируется в опухолях и способствует их прогрессированию [13]. BMP9-белок активирует SMAD 1/5/8 и непосредственно стимулирует экспрессию HEY1 через неканонический путь передачи сигналов NOTCH [13].

Таким образом, HEY1 играет значительную роль в пролиферации и инвазии клеток МГБ.

Экспрессия ZEB2 увеличилась в 90 раз (см. табл. 2). Уровень ZEB2 положительно коррелирует с прогрессией и прогнозом многих видов рака, включая рак молочной железы, почек, поджелудочной железы и яичников. ZEB2 является хорошо известным активатором ПМП. Показано, что в клеточных линиях глиомы, как ZEB1, так и ZEB2, способствуют пролиферации и инвазии опухолевых клеток [14]. Многие молекулы, в том числе ZEB2, N-кадгерин, TWIST и SNAIL, активируют ПМП, тогда как E-кадгерин ингибирует процесс ПМП. ZEB1 может подавлять транскрипцию E-кадгерина и, следовательно, способствовать ПМП. Сигнальный путь ZEB регулирует пролиферацию, миграцию, инвазию, апоптоз клеток и обуславливает хеморезистентность глиобластомы [14].

Как видно из табл. 2, уровень белка ZIP3 в секрете ОК увеличивался в 271 раз после действия ГС

на клетки МГБ. Ген ZIP3 активно взаимодействует с несколькими генами, играющими важную роль в росте клеток и ангиогенезе, такими как MMP-9, VEGF-A, PDGF-A, IL-6, IL-8 и IGFBP-2. Они опосредуют эффект ZIP3 на опухолевый рост и метастазирование глиомы и обратно коррелируют с выживаемостью пациентов. Экспрессия ZIP3 достоверно коррелирует со всеми этими генами, указывая на то, что ZIP3 может участвовать во множестве сигнальных путей и потенциально регулировать прогрессию опухолевого процесса [15].

Полученные нами данные о действии ГС на экспрессию белков S100A6, HEY1, ZIP3, S100A4, ZEB2, по нашему мнению, указывают на то, что они могут являться потенциальными прогностическими маркерами ГФ ОК. Присутствие этих протеинов в экзосомах открывает возможность использования метода жидкой биопсии для оценки эффективности терапии МГБ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучены молекулярные механизмы действия ГС на секретом линии клеток U251 МГБ человека. После действия ГС зарегистрированы статистически значимые изменения в экспрессии 390 белков. Показано значительное влияние ГС на сигнальные пути ОК, связанные с клеточным дыханием, инвазией, протеасомной активностью, презентацией антигенов. В качестве потенциальных прогностических маркеров ГФ МГБ предложен набор из пяти гиперэкспрессированных белков секрета.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Evans S.M., Judy K.D., Dunphy I. et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:8177–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1081.
- Cooper L.A.D., Gutman D.A., Chisolm C. et al. The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am J Pathol* 2012;180:2108–19. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.01.040.
- Masson N., Ratcliffe P.J. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab* 2014;2(1):3. DOI: 10.1186/2049-3002-2-3.
- Schito L., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression. *Trends Cancer* 2016;2:758–70. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.10.016.
- Finger E.C., Giaccia A.J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:285–93. DOI: 10.1007/s10555-010-9224-5.
- Shevchenko V., Arnotskaya N., Kushnir T. et al. Transforming growth factor- $\beta$  mimics the key proteome properties of CD133-differentiated and CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Int Rev Neurobiol* 2020;151:220–42. DOI: 10.1016/bs.irm.2020.03.007.
- Tesarova P., Kalousova M., Zima T., Tesar V. HMGB1, S100 proteins and other RAGE ligands in cancer – markers, mediators and putative therapeutic targets. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016;160:1–10. DOI: 10.5507/bp.2016.003.
- Fei F., Qu J., Zhang M., Li Y., Zhang S. S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget* 2017;8:73219–39. DOI: 10.18632/oncotarget.18016.
- Dao Trong P., Rösch S., Mairbäurl H. et al. Identification of a prognostic hypoxia-associated gene set in IDH-mutant glioma. *Int J Mol Sci* 2018;19:2903. DOI: 10.3390/ijms19102903.
- Yu N.M., Ahn J.Y., Choi E.J. et al. Detection of differentially expressed genes in glioblastoma by suppression subtractive hybridization. *J Korean Neurosurg Soc* 2005;37:443–8.
- Lesniak W., Slomnicki L.P., Filipek A. S100A6 – new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;4:1087–92. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.10.150.
- Hulleman E., Quarto M., Vernell R. et al. A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma. *J Cell Mol Med* 2009;1:136–46. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00307.x.
- Liu Z., Sanders A.J., Liang G. et al. Hey factors at the crossroad of tumorigenesis and clinical therapeutic modulation of hey for anticancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2017;16:775–87. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0576.
- Chen P., Liu H., Hou A. et al. Prognostic significance of zinc finger E-Box-binding homeobox family in glioblastoma. *Med Sci Monit* 2018;24:1145–51. DOI: 10.12659/MSM.905902.
- Lin Y., Chen Y., Wang Y. et al. ZIP4 is a novel molecular marker for glioma. *Neuro-Oncology* 2013;15:1008–16. DOI: 10.1093/neuonc/not042.

**Вклад авторов**

Т.И. Кушнир: получение данных, анализ полученных данных;  
Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов для анализа, статистический анализ;  
И.А. Кудрявцев: получение секретома клеток мультиформной глиобластомы;  
А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;  
А.Х. Бекашев: редактирование черновика рукописи;  
В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

**Authors' contributions**

T.I. Kushnir: obtaining data, analysis;  
N.E. Arnotskaya: preparation of samples for analysis, statistical analysis;  
I.A. Kudryavtsev: obtaining a secretome of glioblastoma multiforme cells;  
A.A. Mitrofanov: reviewing of publications of the article's theme;  
A.K. Bekyashev: analysis of the article, correction of the manuscript;  
V.E. Shevchenko: developing the research design, article editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Т.И. Кушнир/T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>  
Н.Е. Арноцкая/N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>  
И.А. Кудрявцев/I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>  
А.А. Митрофанов/A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>  
А.Х. Бекашев/A.K. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>  
В.Е. Шевченко/V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Финансируется в рамках госбюджетной темы № 2021-76.  
**Funding.** It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.  
**Compliance with patient rights and principles of bioethics**  
This article does not describe any research involving humans or animals as subjects.

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-41-46



# Влияние нокдауна caveолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретлируемых клетками немелкоклеточного рака легких

Г.О. Скрябин<sup>1</sup>, А.В. Комельков<sup>1</sup>, П.Б. Копнин<sup>1</sup>, И.И. Никишин<sup>2</sup>, С.А. Кузьмичев<sup>1</sup>, Е.М. Чевкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

**Контакты:** Елена Максимовна Чевкина tchevkina@mail.ru

**Введение.** Данные исследований последних лет свидетельствуют о том, что белки, входящие в состав липидных рафтов, могут быть задействованы в формировании экзосом и отборе белков, входящих в состав экзосомального карго. Такие данные получены для флотиллинов, структурно-функциональных компонентов плоских рафтов. Для caveолина-1 (Cav-1), основного компонента caveолярных рафтов, показано присутствие в экзосомах некоторых опухолевых клеток, однако его возможное участие в регуляции белкового состава экзосом ранее не исследовалось.

**Материалы и методы.** Нокдаун Cav-1 проводили методом трансдукции лентивирусного вектора, экспрессирующего предшественников малых шпилечных рибонуклеиновых кислот к Cav-1. Экстраклеточные везикулы (ЭКВ) выделяли из клеток линии H1299 немелкоклеточного рака легких методом дифференциального ультрацентрифугирования. Препараты ЭКВ верифицировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (анализ размера и морфологии) и методом анализа траекторий движения наночастиц (среднеразмерное распределение и концентрация). Для анализа экзосомальных маркеров и Cav-1 в клетках и ЭКВ применяли метод иммуноблоттинга.

**Результаты.** Анализ влияния экспрессии Cav-1 на состав белков ЭКВ, ассоциированных с биогенезом экзосом, выявил снижение уровня Alix и TSG101, повышение уровня белков липидных рафтов и отсутствие изменений уровня тетраспанина CD9.

**Заключение.** Полученные данные демонстрируют Cav-1-зависимое изменение состава ЭКВ, свидетельствующее об изменении соотношения везикул, образованных с помощью различных молекулярных механизмов.

**Ключевые слова:** экзосомы, липидные рафты, флотиллин, stomatin, caveолин-1, Alix, TSG101

**Для цитирования:** Скрябин Г.О., Комельков А.В., Копнин П.Б., Никишин И.И., Кузьмичев С.А., Чевкина Е.М. Влияние нокдауна caveолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретлируемых клетками немелкоклеточного рака легкого. Успехи молекулярной онкологии. 2021;8(1):41–6. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-41-46.

## Effect of caveolin-1 knockdown on the protein composition of extracellular vesicles secreted by non-small cell lung cancer cells

G.O. Skryabin<sup>1</sup>, A.V. Komelkov<sup>1</sup>, P.B. Kopnin<sup>1</sup>, I.I. Nikishin<sup>2</sup>, S.A. Kuzmichev<sup>1</sup>, E.M. Tchevkina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; Build. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

**Contacts:** Elena Tchevkina tchevkina@mail.ru

**Background.** Recent data show evidence that lipid rafts (LR) proteins could be involved in the formation of exosomes and the sorting of proteins that make up the exosomal cargo. Such data are available for flotillins, structural and functional components of flattened rafts. The presence of the main component of caveolar rafts, caveolin-1 (Cav-1), has



been shown in exosomes produced by some cancer cells; however, its possible participation in the regulation of the protein composition of exosomes has not been studied previously.

**Materials and methods.** Knockdown of Cav-1 by transduction of a lentiviral vector expressing precursors of short hairpin ribonucleic acid to Cav-1; isolation (by ultracentrifugation) and analysis (transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis) of extracellular vesicles (EVs) from non-small cell lung cancer cells (NSCLC) H1299; analysis of proteins in cells and in EVs by immunoblotting.

**Results.** Analysis of the effect of Cav-1 expression on the composition of EV proteins associated with exosome biogenesis revealed a decrease in the level of Alix and TSG101, an increase in the level of LR proteins and the absence of changes in the level of tetraspanin CD9.

**Conclusion.** The obtained data demonstrate a Cav-1-dependent changes in the composition of EVs, indicating a change in the ratio of vesicles formed by the various molecular mechanisms.

**Key words:** exosomes, lipid rafts, flotillin, stomatin, caveolin-1, Alix, TSG101

**For citation:** Skryabin G.O., Komelkov A.V., Kopnin P.B., Nikishin I.I., Kuzmichev S.A., Tchevkina E.M. Effect of Caveolin-1 knockdown on the protein composition of extracellular vesicles secreted by non-small cell lung cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(1):41–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-1-41-46.

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на растущий интерес к экзосомам как в области фундаментальных исследований, так и в контексте клинической онкологии, до сих пор молекулярные механизмы биогенеза экзосом и отбора биомолекул, входящих в их состав (экзосомального карго), изучены далеко не полностью. Процесс селекции биомолекул для включения в состав будущих экзосом неразрывно связан с процессом образования интралиминальных везикул (ИЛВ) — внутриклеточных предшественников экзосом, возникающих путем инвагинации мембран эндосом и приводящих к формированию мультивезикулярных эндосом. Предполагается, что существует несколько путей образования ИЛВ. Наиболее изученным является механизм, реализуемый с помощью комплексов, включающих в себя более 20 белков, относящихся к четырем классам ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) — ESCRT-0, -I, -II и -III.

Схематично это происходит так: гетеродимер ESCRT-0 узнает убиквитинированные белки и привлекает их к мембране, формируя тем самым сортировочные микродомены (sorting microdomains) и отвечая за отбор содержимого будущей экзосомы. Кроме того, он рекрутирует комплексы ESCRT-I и -II, которые также могут связывать карго (например, ESCRT-II привлекает различные рибонуклеиновые кислоты (РНК)), но преимущественно индуцируют инвагинацию участка мембраны с выбранным «грузом». Помимо этого они привлекают каркасный белок Alix, который, в свою очередь, рекрутирует комплекс ESCRT-III, в состав которого входят белки, отвечающие за финальные этапы формирования ИЛВ — отделение сформировавшегося пузырька и диссоциацию комплекса от мембраны [1]. Маркерами данного пути биогенеза ИЛВ (и, соответственно, экзосом) считаются компоненты комплекса ESCRT, прежде всего белок TSG101 (tumor susceptibility gene 101), субъединица комплекса ESCRT. Другой механизм, не связанный, по-видимому, с уни-

квитинированием молекул карго, реализуется с помощью трансмембранных белков синдекана и синтенина. Эти белки способны привлекать различные лиганды (хемокины, факторы роста, молекулы адгезии, интегрины и др.). Карго-зависимая олигомеризация синдекана и его связывание с молекулами синтенина приводят, в частности, к рекрутированию тетраспанина CD63 и белка Alix и, в конечном счете, к формированию ИЛВ [2–4]. Соответственно, каркасный белок Alix используется в качестве маркера экзосом, биогенез которых проходит с участием обоих названных механизмов. Ряд данных указывает на существование третьего, так называемого рафт-зависимого механизма, при котором основную роль в формировании ИЛВ и селекции молекул карго играют компоненты мембранных липидных микродоменов, или липидных рафтов (ЛР) [5, 6].

Этот тип сортировки карго и формирования ИЛВ изучен менее подробно и связан с изменением липидного состава эндосомальной мембраны, когда липиды кластеризуются в специфические субдомены (рафты), которые, с одной стороны, служат сборочными платформами для белковых комплексов и рекрутинга белков, с другой — вызывают инвагинацию и отпочковывание мембран с помощью процесса, инициируемого керамидом [7, 8]. Механизм сортировки экзосомального содержимого в этом случае остается малоизученным. Предполагается, что в нем могут быть задействованы тетраспанины [9] и флотиллины [10]. Описываемый путь секреции экзосом зависит от нейтральной сфингомиелазы 2-го типа (фермента, катализирующего формирование керамидов) [11] и не зависит от подавления продукции компонентов комплексов ESCRT, таких как HRS, Alix или TSG101 [7].

Липидные рафты по морфологии делятся на 2 основных типа — плоские и инвагинированные (или кавеоларные). Некоторые исследователи в качестве отдельного подтипа ЛР рассматривают тетраспанин-обогащенные микродомены. Подробнее о рафт-зависимом

пути биогенеза экзосом и участия рафт-образующих белков в этом процессе можно прочесть в обзорной статье Г.О. Скрыбина и соавт. [12]. К белкам, стабилизирующим плоские ЛР, относятся представители SPFH-семейства (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C). Основным белком, организующим инвагинированные рафты, является кавеолин-1 (Cav-1). Учитывая сходство процессов с участием ЛР на плазматической мембране (сборка сигнальных комплексов, рафт-зависимый эндоцитоз) и мембранах эндосом (формирование ИЛВ), можно предположить, что белки ЛР задействованы в процессах биогенеза экзосом и селекции карго. Флотиллины (Flot-1, -2) неоднократно показаны в составе экзосом [13], есть данные, указывающие и на их участие в продукции экзосом и селекции экзосомального карго [10, 14]. Предполагается, что флотиллины наряду с керамидом можно считать маркерами рафт-зависимого пути биогенеза экзосом [3]. Нами впервые было показано присутствие в экзосомах и другого представителя SPFH-семейства белков плоских ЛР — стоматина (Stom), более того, по ряду характеристик этот белок можно рассматривать в качестве нового экзосомального маркера [15]. Имеются данные и о присутствии в экзосомах Cav-1, и даже о связи экзосомального кавеолина с малигнизацией клеток [16], однако функциональная роль этого белка в биогенезе экзосом и селекции карго ранее не исследовалась. Целью данной работы было исследование влияния Cav-1 на состав экзосомальных белков, относящихся к различным функциональным группам и рассматриваемых в качестве маркеров различных путей биогенеза экзосом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток.** Клетки немелкоклеточного рака легкого линии H1299 культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), 0,294 мг/мл L-глутамин, 0,1 мг/мл стрептомицин, 100 ед/мл пенициллина.

**Выделение экстраклеточных везикул (ЭКВ).** ЭКВ выделяли из кондиционированной среды после инкубации в течение 72 ч в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки, очищенной от экзосом по ранее описанной методике [15].

**Анализ морфологии ЭКВ.** Визуализацию частиц не менее чем в 10 полях зрения проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM1011 (Jeol, Япония) по ранее описанной методике [15].

**Характеризация наночастиц.** Размер частиц и их концентрация оценивались методом анализа траекторий движения наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с использованием прибора NanoSight LM10 (Malvern Panalytical, Великобритания) по методике, описанной нами ранее [15].

**Подавление эндогенной экспрессии кавеолина-1.** Последовательности малых шпилечных РНК (short

hairpin RNA, shRNA), комплементарные матричной РНК Cav-1 человека, и контрольная последовательность shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP) были клонированы в вектор pLKO.1 puro и трансдуцированы в клетки H1299 методом лентивирусной инфекции по методике, описанной ранее [17]. В работе использовались последовательности sh1 GCTTTG TGATTCAATCTGTAA, sh2 CCACSTTCACTG TGACGAAAT, sh3 GACCCTAAACACCTCAACGAT, sh4 GACGTGGTCAAGATTGACTTT, sh7 GACCCACT CTTTGAAGCTGTT.

**Иммуноблоттинг.** На 15 % полиакриламидный гель для электрофореза наносили 20 мкг клеточного лизата и 10 мкг экзосомального белка. Анализ проводили по методике, описанной нами ранее [15]. Для гибридизации использовали следующие антитела: anti-flotillin-1 (BD, 610821), anti-caveolin-1 (BD, 610407), anti-stomatin (Santa Cruz Biotech, sc-134554), anti-Alix (Cell Signaling, 2171S), anti-CD9 (Cell Signaling, 13174S), anti-TSG101 (Abcam, ab125011), anti-β-actin (Abcam, ab8227).

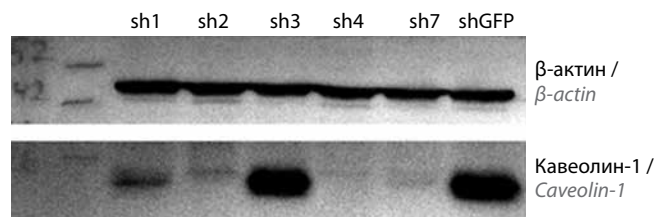
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для подавления эндогенной экспрессии Cav-1 в клетках H1299 использовали 5 последовательностей shRNA. Оценка эффективности нокдауна Cav-1 после лентивирусной инфекции приведена на рис. 1.

Для дальнейших экспериментов были выбраны производные сублинии H1299 sh2Cav-1 и sh4Cav-1. Из кондиционированной среды были выделены препараты ЭКВ, которые верифицировались согласно требованиям международной ассоциации по исследованию ЭКВ (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) [18] методами NTA (рис. 2, а) и анализа морфологии частиц с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (рис. 2, б).

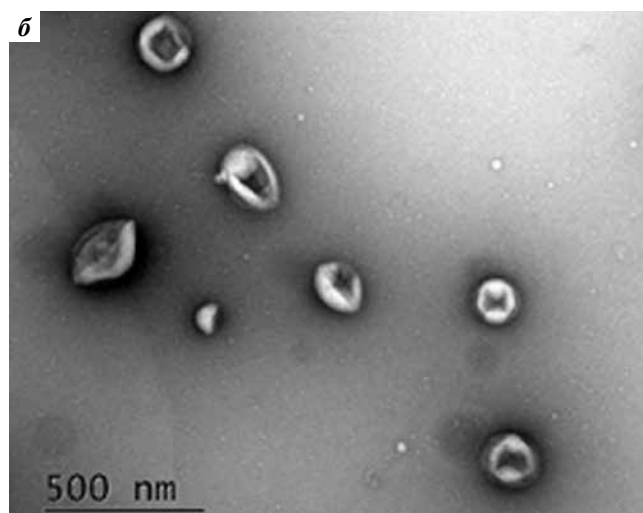
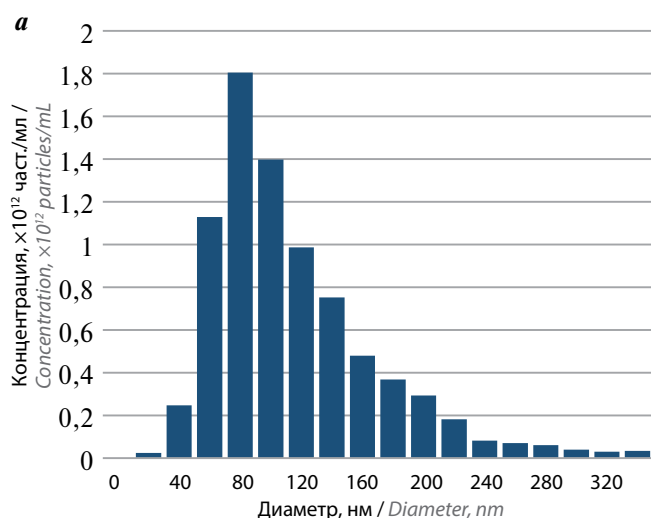
Средний размер (105 нм, стандартное отклонение 11,7 нм) и положение максимума (73 нм), по данным NTA, находятся в диапазоне стандартных для экзосом значений. Морфология частиц (чашеобразная форма или форма «сдутых мячиков») соответствует экзосомам при визуализации методом ТЭМ.

Анализ Cav-1 показал практически полное отсутствие данного белка в экзосомах клеток с нокдауном Cav-1 (рис. 3, а).



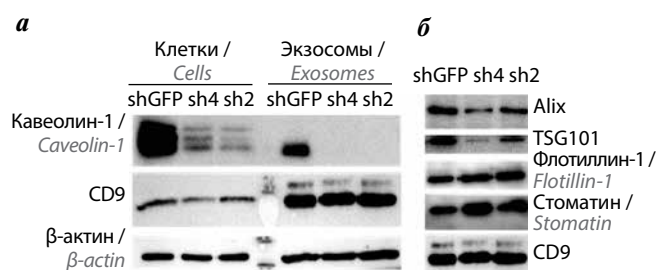
**Рис. 1.** Анализ экспрессии кавеолина-1 в производных клеточной линии H1299 с экспрессией shCav-1 (sh1, sh2, sh3, sh4, sh7) и контрольной линии H1299 shGFP методом иммуноблоттинга

Fig. 1. Analysis of the expression of caveolin-1 in derivatives of H1299 cell line with expression of shCav-1 (sh1, sh2, sh3, sh4, sh7) and the control line H1299 shGFP by immunoblotting



**Рис. 2.** Пример анализа экстраклеточных везикул для линии H1299 shGFP: а — среднечисловое размерное распределение по результатам анализа траекторий движения наночастиц; б — анализ морфологии частиц методом трансмиссионной электронной микроскопии (на фото приведен масштабный отрезок 500 нм)

**Fig. 2.** An example of extracellular vesicles analysis for H1299 shGFP cells: a — number-average size distribution based on nanoparticle tracking analysis results; b — analysis of particle morphology by transmission electron microscopy (the photo shows a scale bar of 500 nm)



**Рис. 3.** Анализ уровня представленности белков в экстраклеточных везикулах, секретируемых клетками H1299 с нокадауном Cav-1 (sh2 и sh4) и клетками контрольной линии H1299 shGFP; в качестве референсных белков использованы  $\beta$ -актин (для клеток) и CD9 (для экзосом): а — анализ экспрессии Cav-1 в клетках и экзосомах; б — анализ белков липидных рафтов, флотиллина-1 и стоматина, а также белков Alix и TSG101 в экзосомах

**Fig. 3.** Analysis of the protein levels in extracellular vesicles secreted by H1299 cells with Cav-1 knockdown (sh2 and sh4) and the control line H1299 shGFP;  $\beta$ -actin (for cells) and CD9 (for exosomes) were used as reference proteins: a — analysis of Cav-1 expression in cells and exosomes; b — analysis of lipid raft proteins flotillin-1 and stomatin, as well as Alix and TSG101 proteins in exosomes

Далее в препаратах экзосом был проведен анализ белков, ассоциированных с биогенезом экзосом, включая тетраспанин CD9, предположительно участвующий во всех путях биогенеза экзосом [19], белок Alix, участвующий в ESCRT- и синдекан/синтенин-зависимых механизмах [3], TSG-101, ассоциированный с ESCRT-зависимым механизмом [3], и белки ЛР семейства SPFH: флотиллин-1, ассоциированный с рафт-зависимым путем [10], и стоматин, белок ЛР, предложенный нами ранее в качестве экзосомального маркера [15]. На рис. 3, б представлен репрезентатив-

ный пример результатов иммуноблоттинга, полученных в одном эксперименте с использованием единой мембраны для возможности адекватного сравнения уровня исследуемых белков. Как видно на рис. 3, б, нокадаун Cav-1 никак не отразился на уровне «общего» экзосомального маркера CD9, при этом уровень белков ЛР увеличился, а белков, ассоциированных с «не-рафтовыми» путями биогенеза экзосом, — снизился по сравнению с контролем.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовалось влияние Cav-1 на уровень белков, ассоциированных с различными механизмами биогенеза экзосом, а также рафт-образующего белка плоских ЛР, стоматина, ранее предложенного нами в качестве нового экзосомального маркера [15] в ЭКВ, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легких. Мы показали, что подавление экспрессии Cav-1 в клетках H1299 привело к снижению в ЭКВ уровня белков, ассоциированных с «не-рафтовыми» путями биогенеза экзосом, таких как Alix и TSG-101, и к повышению уровня рафтовых белков флотиллина-1 и стоматина. При этом уровень тетраспанина CD9, «универсального» маркера экзосом, предположительно, задействованного во всех молекулярных сценариях биогенеза экзосом, в ЭКВ, секретируемых клетками с нокадауном Cav-1, остался прежним. Полученные данные демонстрируют Cav-1-зависимое изменение состава ЭКВ, свидетельствующее об изменении соотношения везикул, образованных с участием различных молекулярных механизмов.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Soung Y.H., Nguyen T., Cao H. et al. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep* 2016;49(1):18–25. DOI: 10.5483/BMBRep.2016.49.1.239.
2. Baietti M.F., Zhang Z., Mortier E. et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14(7):677–85. DOI: 10.1038/ncb2502.
3. Villarroya-Beltri C., Baixauli F., Gutiérrez-Vázquez C. et al. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014;28(1):3–13. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009.
4. Kowal J., Tkach M., Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29(1):116–25. DOI: 10.1016/j.ccb.2014.05.004.
5. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 2010;327(5961):46–50. DOI: 10.1126/science.1174621.
6. Simons K., Sampaio J.L. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(10):1–17. DOI: 10.1101/cshperspect.a004697.
7. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S. et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008;319(5867):1244–7. DOI: 10.1126/science.1153124.
8. Stuffers S., Sem Wégner C., Stenmark H., Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 2009;10(7):925–37. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
9. van Niel G., Charrin S., Simoes S. et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 2011;21(4):708–21. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
10. Phuyal S., Hessvik N.P., Skotland T. et al. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J* 2014;281(9):2214–27. DOI: 10.1111/febs.12775.
11. Yuyama K., Sun H., Mitsutake S., Igarashi Y. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- $\beta$  by microglia. *J Biol Chem* 2012;287(14):10977–89. DOI: 10.1074/jbc.M111.324616.
12. Скрябин Г.О., Комельков А.В., Савельева Е.Е., Чевкина Е.М. Липидные рафты в биогенезе экзосом. *Биохимия* 2020;85(2):208–24. [Skryabin G.O., Komelkov A.V., Savelyeva E.E., Tchevkina E.M. Lipid rafts in exosome biogenesis. *Biohimiya = Biochemistry (Moscow)* 2020;85(2):208–24. (In Russ.)].
13. Théry C., Clayton A., Amigorena S., Raposo G., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;30(1):3.22.1–9. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
14. Kajimoto T., Okada T., Miya S. et al. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun* 2013;4:2712. DOI: 10.1038/ncomms3712.
15. Skryabin G.O., Komelkov A.V., Galetsky S.A. et al. Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker. *J Cell Biochem* 2021;122(1):100–15. DOI: 10.1002/jcb.29834.
16. Campos A., Salomon C., Bustos R. et al. Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines. *Nanomedicine* 2018;13(20):2597–609. DOI: 10.2217/nmm-2018-0094.
17. Kainov Y., Favorskaya I., Delektorskaya V. et al. CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors. *Cell Cycle* 2014;13(10):1530–9. DOI: 10.4161/cc.28475.
18. Théry C., Lavieu G., Martin-Jaular L. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7(1):1535750.
19. Yanez-Mo M., Barreiro O., Gordon-Alonso M. et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 2009;19(9):434–46. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.06.004.

**Вклад авторов:**

Г.О. Скрябин: получение клеточных линий с нокдауном caveолина-1, выделение экстраклеточных везикул (ЭКВ), анализ белков, анализ ЭКВ методом анализа траекторий движения наночастиц (Nanoparticles tracking analysis, NTA);

А.В. Комельков: анализ данных NTA, трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), денситометрия;

П.Б. Копнин: получение генно-инженерных конструкторов;

И.И. Никишин: анализ ЭКВ методом ТЭМ;

С.А. Кузьмичев: анализ литературы, анализ NTA;

Е.М. Чевкина: дизайн исследования, анализ результатов, написание статьи.

**Authors' contributions:**

G.O. Skryabin: knockdown of caveolin-1, isolation of extracellular vesicles (EVs), protein analysis, analysis of EVs by nanoparticle tracking analysis (NTA);

A.V. Komelkov: analysis of NTA and transmission electron microscopy (TEM) data, densitometry;

P.B. Kopnin: development of vectors for caveolin-1 knockdown;

I.I. Nikishin: TEM analysis of EVs;

S.A. Kuzmichev: analysis of literature data, NTA analysis;

E.M. Tchevkina: research design, analysis of results, article writing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Скрябин Г.О. / G.O. Skryabin: <https://orcid.org/0000-0002-4127-6973>

Комельков А.В. / A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>

Копнин П.Б. / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

Никишин И.И. / I.I. Nikishin: <https://orcid.org/0000-0002-4071-7693>

Кузьмичев С.А. / S.A. Kuzmichev: <https://orcid.org/0000-0003-1660-0898>

Чевкина Е.М. / E.M. Tchevkina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00038А).  
**Financing.** The study was performed with the support of Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-04-00038A).



## Памяти профессора Аллы Александровны Ставровской (1932–2020)

В последний день минувшего года в 88 лет ушла из жизни доктор медицинских наук профессор Алла Александровна Ставровская. С 1961 г. она работала в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (в то время Институт экспериментальной и клинической онкологии), руководила лабораторией генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза со дня ее основания в 1981 г.

А.А. Ставровская окончила Первый Московский ордена Ленина медицинский институт им. И.М. Сеченова в 1956 г. и по распределению уехала в г. Братск, где два года была главным врачом Братской городской санитарной эпидемиологической станции. В 1958–1960 гг. работала государственным санитарным инспектором на строительстве Братской ГЭС. Талант организатора и энергия, с которыми Алла Александровна развернула и затем возглавляла санитарную службу на ГЭС, определили и ее дальнейшую деятельность. В 1961 г., в связи с окончанием срока «северного» договора, она вернулась в Москву и стала старшим лаборантом в Институте экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР (ныне НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). В 1966 г. защитила диссертацию на звание кандидата медицинских наук, а в 1975-м – докторскую диссертацию.

А.А. Ставровская принадлежит к плеяде ученых старшего поколения, известных не только в своем Отечестве, но и за рубежом. Основное направление ее научной деятельности было посвящено изучению механизмов развития множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), являющейся одной из важнейших причин неудач химиотерапии при лечении онкобольных. Алла Александровна первой в нашей стране и одной из первых в мире начала исследовать лекарственную устойчивость опухолевых клеток, опосредованную Р-гликопротеином – белком, принадлежащим к семейству АВС-транспортеров. Эта работа успешно продолжается ее учениками, они положили начало ряду направлений в исследованиях, которые развивают в НИИ канцерогенеза и других научных учреждениях.

В лаборатории, руководимой Аллой Александровной, получен ряд принципиально новых данных, касающихся участия фосфатазы РТЕН и сфинголипидного пути сигнальной трансдукции в регуляции транспортных белков семейства АВС, активность которых часто является причиной возникновения МЛУ, и впервые показано, что рецептор ретиноевой кислоты RARα принимает участие в регуляции активности Р-гликопротеина. Эти данные свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия RARα в клетках лейкозов разных типов дифференцировки может приводить к МЛУ. Также впервые было определено, что многофункциональный белок YB-1, контролирующий в клетках процессы транскрипции и трансляции, участвует в контроле многофакторной МЛУ, влияя

на экспрессию нескольких АВС-белков, и что повышенная экспрессия YB-1 в опухолевых клетках сообщает им селективные преимущества при действии химиотерапевтических агентов. Исследование количества мРНК гена YB-1 предложено в качестве теста на МЛУ при раке молочной железы (РМЖ). Показано, что группу пациентов, имеющих малые (T1, T2) опухоли молочной железы с высоким содержанием мРНК гена YB-1, можно выделить в группу повышенного риска возникновения отдаленных метастазов.

За свою долгую научную деятельность проф. А.А. Ставровская воспитала не одно поколение молодых ученых, под ее управлением подготовлены 18 кандидатских диссертаций. Под руководством Аллы Александровны начинали свою научную деятельность проф. Б.П. Копнин, возглавивший позже лабораторию цитогенетики, а затем и НИИ канцерогенеза, д.м.н. А.А. Штиль – руководитель лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза, а также известные ученые-исследователи к.б.н. Е.С. Какпакова и к.м.н. Т.П. Стромская.

Возглавляемая Аллой Александровной лаборатория сотрудничала со многими научными институтами Москвы, Институтом белка РАН в Пущино, МГУ им. М.В. Ломоносова. А.А. Ставровская с большим интересом погружалась в проблемы клинической онкологии, и под ее руководством защищали кандидатские и докторские диссертации врачи из Гематологического научного центра РАМН (ныне НИИЦ гематологии), Московского

областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского и центральной клинической больницы «РЖД-Медицина».

А.А. Ставровская была до конца предана науке и, будучи уже в преклонном возрасте, продолжала активно писать научные статьи и публиковаться в престижных научных журналах. Она прово-

дила большую консультативную, педагогическую и научно-организационную работу, была примером настоящего ученого, восхищавшего своим талантом и трудоспособностью.

А.А. Ставровская была мужественным человеком, чрезвычайно скромным и в то же время строгим, но очень добрым, по-матерински заботящимся

о каждом из своих сотрудников. И ее всегда будут вспоминать с восхищением и благодарностью.

*Коллектив сотрудников  
лаборатории генетики опухолевых  
клеток НИИ канцерогенеза  
ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России*