

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

И.Р. Гилязова, Е.А. Иванова, А.А. Измайлов, И.Р. Султанов,
Р.И. Сафиуллин, Г.Р. Гилязова, В.Н. Павлов,
Э.К. Хуснутдинова

ЧАСТОТА ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НОСИТЕЛЬСТВА МУТАЦИЙ В ГЕНАХ NOTCH-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ У ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ПОЧКИ И В ПОПУЛЯЦИЯХ ВОЛГО-УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА

DOI 10.25789/YMJ.2021.73.01

УДК 616-006

В статье представлены результаты анализа частоты изменений нуклеотидной последовательности генов сигнального пути Notch (*DLL4* (rs35748882), *HEY2* (rs61737181), *JAG1* (rs1801140, rs1801139, rs45575136), *NOTCH1* (rs61751542), *NOTCH2* (rs3795666), *NOTCH4* (rs8192576, rs8192579, rs8192585)) у пациентов со светлоклеточным раком почки и здоровых индивидов из популяционного контроля. Было обнаружено, что частота выявленных изменений у пациентов в среднем была выше общепопуляционных значений. Полученные в настоящем исследовании результаты могут свидетельствовать о вкладе изученных изменений нуклеотидной последовательности генов сигнального пути Notch в патогенез светлоклеточного рака почки, а также о возможности их использования при создании панели молекулярных маркеров для диагностики и прогноза течения заболевания.

Ключевые слова: светлоклеточный рак почки, сигнальный путь Notch, однонуклеотидные замены.

The article presents the results of frequency analysis in the nucleotide sequence of genes of the signal path Notch (*DLL4* (rs35748882), *HEY2* (rs61737181), *JAG1* (rs1801140, rs1801139, rs45575136), *NOTCH1* (rs61751542), *NOTCH2* (rs3795666), *NOTCH4* (rs8192576, rs8192579, rs8192585)) at patients with clear cell kidney cancer and healthy individuals from the population control. It was found that the frequency of detected changes in patients was on average higher than the general population values. The results of this study may indicate the contribution of the studied changes in the nucleotide sequence of genes of Notch signaling pathway to the pathogenesis of clear cell kidney cancer, as well as the possibility of their use while creating a panel of molecular markers for diagnosis and prognosis of the course of the disease.

Keywords: clear cell kidney cancer, Notch signaling path, uninnucleotide substitutions.

Введение. Рак почки (РП) – это гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство которых представляют собой почечно-клеточные карциномы различных морфологических типов. Ежегодно в мире регистрируют более 300 тыс. новых случаев РП [4]. Ввиду бессимптомного течения рака почки заболевание зачастую выявляется на поздних стадиях, отягощенных метастазированием. В связи с этим существует явная потребность в углубленном молекулярно-генетическом изучении патогенеза рака почки, что позволит выявить новые молекулярные маркеры для ранней диагностики РП, осуществлять более эффективные оценки риска, про-

водить отбор пациентов для более агрессивных методов лечения, а также осуществлять выбор молекул, которые будут служить новыми мишенями для лекарственных препаратов.

Основным молекулярно-генетическим событием при развитии рака почки является изменение активности гена-супрессора опухолевого роста фон Хиппеля-Линдау (*VHL*), сопровождающего порядка 70% случаев спорадического рака почки. Наряду с геном *VHL* в патогенезе рака почки задействован ряд генов, вовлеченных в различные молекулярные пути. Трансмембранные рецепторы семейства Notch осуществляют регуляторные воздействия, влияя на пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, ангиогенез, метастазирование и другие клеточные процессы, индуцирующие возникновение и развитие злокачественных опухолей. Передача сигналов через рецепторы Notch защищает клетки от разнообразных апоптотических стимулов [10].

Четыре рецептора Notch (Notch-1, -2, -3 и -4) представляют собой однопроходные гетеродимерные трансмембранные белки, которые активируются связыванием с одним из пяти лигандов, Delta-like 1/3/4 или Jagged 1/2, экспрессирующихся на соседних

клетках [11]. В результате ряда исследований было показано, что сигнальный путь Notch играет важную роль в формировании почек млекопитающих. Показано, что при ингибировании передачи сигналов Notch у мыши происходит уменьшение эпителиального компартмента в развивающейся почке с деградацией проксимальных канальцев [13].

Известно, что аномальная активация генов сигнального пути Notch наблюдается при различных типах опухолей. Предполагают, что пути Notch и Wnt могут использоваться в качестве терапевтических мишеней. В отличие от *VHL*, мутации членов Wnt и Notch путей при почечно-клеточной карциноме встречаются редко [5]. Однако *VHL* и другие важные молекулярно-генетические факторы, ответственные за развитие рака почки, активируют пути Wnt и Notch. Например, потеря *VHL* стабилизирует β -катенин через *JADE1*. Активация β -катенина, в свою очередь, связана с поздними стадиями рака почки и более низкой выживаемостью пациентов. В то же время показано, что передача сигналов пути Notch не зависит от активности *VHL*, HIF1 α , HIF2 α и уровня оксигенации клеток. [8].

Ранее нами был проведен анализ

ФГБУН Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа: **ГИЛЯЗОВА Ирина Рашатовна** – к.б.н., с.н.с., **ИВАНОВА Елизавета Алексеевна** – к.б.н., н.с., **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., директор.

ГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, г. Уфа: **ИЗМАЙЛОВ Адель Альбертович** – д.м.н., проф., **СУЛТАНОВ Ильнур Миндиаметович** – врач-уролог, **САФИУЛЛИН Руслан Ильясович** – д.м.н., проф., **ГИЛЯЗОВА Гульшат Руслановна** – студент, **ПАВЛОВ Валентин Николаевич** – д.м.н., проф.

экзома у пациентов со светлоклеточным раком почки, в результате которого наиболее патогенные изменения нуклеотидной последовательности были обнаружены в генах пути Notch.

Целью данной работы было определение частоты мутаций сигнального пути Notch (*DLL4* (rs35748882), *HEY2* (rs61737181), *JAG1* (rs1801140, rs1801139, rs45575136), *NOTCH1* (rs61751542), *NOTCH2* (rs3795666), *NOTCH4* (rs8192576, rs8192579, rs8192585)), выявленных ранее в результате экзомного секвенирования, в расширенной группе пациентов со светлоклеточным раком почки.

Материалы и методы. В исследование включено 238 парных образцов опухолевой и нормальной тканей почки пациентов со светлоклеточным раком почки. Все обследованные были пациентами клиники Башкирского государственного медицинского университета г. Уфы. Забор образцов тканей проводился сотрудниками кафедры урологии. Исследование одобрено биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики. В исследуемой группе 56,7% пациентов имели начальные стадии заболевания (I-II стадии злокачественного процесса согласно TNM классификации) и 43,3% пациентов – поздние стадии (III-IV стадии злокачественного процесса согласно TNM классификации). Возраст пациентов варьировал от 37 до 89 лет.

Частота мутаций была также изучена в группе здоровых лиц из популяционного контроля башкирской, русской и татарской этнической принадлежности (по 50 индивидов в каждой этнической группе).

Выделение геномной ДНК из парных образцов опухолевой ткани почки

и прилегающей нормальной почечной паренхимы проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Частоту мутаций определяли в генах пути Notch, выявленных при экзомном секвенировании. Для анализа были отобраны наиболее патогенные варианты с использованием шести *in silico* программ (SIFT, PolyPhen-2, LRT, Mutation Assessor, Mutation-Taster, phyloP и GERP++) из dbNSFP v. 3.0a. Детекция изменений нуклеотидной последовательности генов осуществлялась с помощью ПЦП с последующим ПДРФ анализом. Ферменты рестрикции были подобраны с помощью интернет ресурса NEBcutter V2.0 [12].

Результаты и обсуждение. Нами было проанализировано 10 локусов генов сигнального пути Notch в опухолевой и нормальной тканях почки у 238 пациентов со светлоклеточным раком почки: *DLL4* (rs35748882), *HEY2* (rs61737181), *JAG1* (rs1801140, rs1801139, rs45575136), *NOTCH1* (rs61751542), *NOTCH2* (rs3795666), *NOTCH4* (rs8192576, rs8192579, rs8192585). Частота мутаций генов пути Notch в исследуемой группе пациентов приведена в таблице.

Все изученные мутации были обнаружены в гетерозиготном состоянии. В среднем частота выявленных изменений в группе пациентов со светлоклеточным раком почки была выше общепопуляционных значений. По клинико-патологическим характеристикам опухоли, в которых были выявлены изучаемые мутации, были разнородны и включали пациентов как с ранними, так и с поздними стадиями. Статистически значимых различий частоты мутаций с полом и возрастом пациентов также выявлено не было. В популяци-

онном контроле исследуемых изменений обнаружено не было.

Наибольшую частоту встречаемости среди изученных локусов продемонстрировали изменения в гене *NOTCH4* (rs8192579 и rs8192585). Белок NOTCH4 представляет собой однопроходный трансмембранный рецептор, содержащий внеклеточные (NECD), трансмембранные и внутриклеточные домены (NICD). Внеклеточный домен NECD содержит повторы, подобные 29-эпидермальному фактору роста (EGF), и служит для связывания лигандов и кальция. При связывании с лигандами (включая Jag 1 и 2, Delta-подобные 1, 3 и 4) происходит протеолиз NOTCH, который высвобождает внутриклеточные домены NICD из клеточной мембраны. Затем NICD перемещается в ядро. NICD, в свою очередь, активирует экспрессию группы нижестоящих генов, таких как *Hes* и *Hay*. Передача сигналов Notch является важным путем, включающим пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток [1]. Показано, что NOTCH4 играет важную роль в регуляции роста и развития молочной железы. При этом аномальная экспрессия NOTCH4 может ингибировать процесс дифференцировки стволовых клеток молочной железы, а мутации в данном гене ассоциированы с усилением пролиферации эпителиальных клеток [9]. Повышенная экспрессия Notch4 отмечается также в опухолевых тканях при раке печени и колоректальном раке [7], а также в клеточных линиях рака предстательной железы [8]. Вместе с тем было обнаружено, что мутации в гене *Notch4* ассоциированы с повышением общей выживаемости пациентов с раком же-

Частота изменений нуклеотидной последовательности генов сигнального пути Notch у пациентов со светлоклеточным раком почки

Ген	Тип замены	Частота, n (%)	Средняя частота в общей популяции согласно БД Ensembl - 1000 Genomes Project Phase 3 (%)*
<i>DLL4 c.C1239T</i> (rs35748882)	Синонимичная	0/238 (0)	1,0
<i>HEY2 c.G588C</i> (rs61737181)	-«-	1/238 (0,42)	5,0
<i>JAG1 c.A2214C</i> (rs1801140)	-«-	2/238 (0,81)	1,0
<i>JAG1 c.C1578T</i> (rs1801139)	-«-	5/238 (2,10)	1,0
<i>JAG1 c.C924T</i> (rs45575136)	-«-	1/238 (0,42)	3,0
<i>NOTCH1 c.C4129T</i> (rs61751542)	Несинонимичная	5/238 (2,10)	9,0
<i>NOTCH2 c.C6421T</i> (rs3795666)	Синонимичная	0/238 (0)	5,0
<i>NOTCH4 c.T4828C</i> (rs8192576)	-«-	3/238 (1,26)	5,0
<i>NOTCH4 c.A5427G</i> (rs8192579)	-«-	7/238 (2,94)	8,0
<i>NOTCH4 c.C731T</i> (rs8192585)	Несинонимичная	8/238 (3,36)	2,0

*В популяциях русских, татар и башкир из Волго-Уральского региона России исследуемых изменений обнаружено не было.

лудка, получавших иммунотерапию ингибиторами PD-1/PD-L1 [2].

Известно, что активность гена *NOTCH4* ассоциирована с пролиферацией, инвазией и миграцией клеток рака почки, а также с размером опухоли и уровнем ее дифференцировки [6]. Кроме того, недавнее исследование продемонстрировало, что мутации в генах сигнального пути Notch могут влиять на эффективность иммунотерапии при светлоклеточном раке почки [3].

Выводы. Полученные в настоящем исследовании результаты могут свидетельствовать о вкладе изученных изменений нуклеотидной последовательности генов сигнального пути Notch в патогенез светлоклеточного рака почки, а также о возможности их использования при создании панели молекулярных маркеров для диагностики и прогноза течения заболевания. Тем не менее, требуются дальнейшие исследования на более крупных группах больных.

Работа выполнена при поддержке Министрства образования и науки Российской Федерации [№ААА-А16-116020350032-1] и за счет средств гранта СПбГУ [ID № 60238366/№ проекта 60257092]. В

работе использованы образцы ДНК из «Коллекции биологических материалов человека» ИБГ УФНЦ РАН при поддержке Программы коллекций биоресурсов ФАНО России [Соглашение № 007-030164/2].

Литература

1. Associations of multiple NOTCH4 exonic variants with systemic sclerosis/ X. Zhou, H. Li, S. Guo et al. // J. Rheumatol. - 2019. - V. 46. - № 2. - P. 184–189. doi:10.3899/jrheum.180094
2. He, Y., Wang, X. Identification of molecular features correlating with tumor immunity in gastric cancer by multi-omics data analysis/ Y. He, X. Wang. // Ann. Transl. Med. - 2020. - V. 8. - № 17. - P. 1050–1050. doi:10.21037/atm-20-922
3. Hyperprogression to a dual immune blockade followed by subsequent response with cabozantinib in metastatic poor-risk clear cell renal cell carcinoma with NOTCH mutation/ J. Molina-Cerrillo, T. Alonso-Gordoa, A. Carrato et al. // Oncotarget. - 2020. - V. 11. - № 22. - P. 2137–2140. doi:10.18632/oncotarget.27598
4. Incidence and mortality of kidney cancer and its relationship with HDI (Human Development Index) in the world in 2012/ M. Mohammadian, R. Pakzad, F. Towhidi et al. // Clujul Med. - 2017. - V. 90. - № 3. - P. 286–293. doi: 10.15386/cjmed-691
5. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma/ Y. Sato, T. Yoshizato, Y. Shiraishi et al. // Nat. Genet. - 2013. - V. 45. - № 8. - P. 860–867. doi: 10.1038/nature12222
6. Notch pathway is activated via genetic and epigenetic alterations and is a therapeutic target in clear cell renal cancer/ T.D. Bhagat, Y. Zou, S. Huang et al. // J. Biol. Chem. - 2017. - V. 292. - № 3. - P. 837–846. DOI: 10.1074/jbc.M116.745208
7. NOTCH4 is a novel prognostic marker that correlates with colorectal cancer progression and prognosis/ G. Wu, Z. Chen, J. Li, et al. // J. Cancer. - 2018. - V. 9. - № 13. - P. 2374–2379. doi: 10.7150/jca.26359
8. Notch-4 silencing inhibits prostate cancer growth and EMT via the NF-κB pathway/ J. Zhang, Y. Kuang, Y. Wang et al. // Apoptosis. - 2017. - V. 22. - № 6. - P. 877–884. doi: 10.1007/s10495-017-1368-0
9. P2Y2R has a significant correlation with Notch-4 in patients with breast cancer/ D.C. Kim, H. Jin, J.S. Lee et al. // Oncol. Lett. - 2020. - V. 20. - № 1. - P. 647–654. doi:10.3892/ol.2020.11630
10. Saini, N., Sarin, A. Nucleolar localization of the Notch4 intracellular domain underpins its regulation of the cellular response to genotoxic stressors/ N. Saini, A. Sarin. // Cell Death Discov. - 2020. - V. 6. - № 1. - P. 7. doi:10.1038/s41420-020-0242-y
11. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo/ J. Sjölund, M. Johansson, S. Manna et al. // J. Clin. Invest. - 2008. - V. 118. - № 1. - P. 217–228. doi: 10.1172/JCI32086
12. Vincze, T. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes / T. Vincze, J. Posfai, and R.J. Roberts // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - P. 3688–3691. doi: 10.1093/nar/gkg526
13. Yu J. Recent genetic studies of mouse kidney development / J. Yu, A.P. McMahon, M.T. Valerius // Curr. Opin. Genet. Dev. - 2004. - V. 14. P. 550–557. doi: 10.1016/j.gde.2004.07.009

А.М. Аммосова, А.И. Черноградский, М.В. Ханды, С.Ю. Артамонова, Н.М. Захарова, С.В. Маркова, Л.А. Степанова

ОЦЕНКА ФАКТОРОВ РИСКА БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ДИСПЛАЗИЕЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ, У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

DOI 10.25789/YMJ.2021.73.02

УДК: 616.248-06:616-018.2-007.17

В статье представлены результаты обследования детей с бронхиальной астмой (БА), ассоциированной с дисплазией соединительной ткани (ДСТ). Описан сравнительный анализ клинической характеристики БА. Течение БА, ассоциированной с умеренной и выраженной ДСТ, характеризуется среднетяжелыми формами и тенденцией к снижению уровня контроля над заболеванием, худшим прогнозом. Большинство детей с БА имели дефицит массы тела. Все дети с БА, ассоциированной с ДСТ, имели патологию костно-мышечной системы, а также другие коморбидные и сопутствующие заболевания. Выявлены значимые факторы риска развития заболевания у детей, такие как курение родителей, наличие домашних животных и низкая частота грудного вскармливания.

Ключевые слова: бронхиальная астма у детей, дисплазия соединительной ткани, дети, аллергия.

The article presents the results of the examination of children with bronchial asthma associated with connective tissue dysplasia (CTD). Comparative analysis of BA clinical characteristics was described. The BA course associated with moderate and severe CTD is characterized by moderate forms and tendency to lower disease control, worse prognosis. Most children with BA in both groups had underweight. All children with BA associated with CTD had musculoskeletal pathology as well as other comorbid diseases. Significant risk factors have been identified, such as effect of parental smoking, presence of pets, and low rates of breastfeeding.

Keywords: bronchial asthma in children, dysplasia connective tissue, children, allergies.

ФГАОУ ВО Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова: **АММОСОВА Аэлита Михайловна** – к.м.н., доцент, aelmma@yandex.ru, **ХАНДЫ Мария Васильевна** – д.м.н., проф., **АРТАМОНОВА Саргылана Юрьевна** – к.м.н., доцент, **ЗАХАРОВА Надежда Михайловна** – к.м.н., доцент, **МАРКОВА Сардана Валерьевна** – к.м.н., доцент, зав. кафедрой, **СТЕПАНОВА Лена Анатольевна** – к.м.н., доцент. **ЧЕРНОГРАДСКИЙ Александр Ильич** – врач пульмонолог ГАУ РС(Я) «РБН-1 Национальный центр медицины».