

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-37-44>

Влияние инактивирующих гетерозиготных мутаций в генах репарации ДНК на развитие экспериментального канцерогенеза легкого у мышей

М.А. Майдин¹, М.Н. Юрова¹, Е.И. Федорос¹, П.В. Сергиев², С.Н. Алексахина¹, Е.А. Отраднова¹, С.С. Круглов¹, Е.Н. Имянитов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, ул. Колмогорова, 1

Контакты: Михаил Александрович Майдин mikhail.maydin@gmail.com

Введение. Известно, что инактивирующие мутации в генах *Chek2* и *Gprc5a* ассоциированы с развитием онкологических заболеваний. Экспериментальные исследования канцерогенеза у генетически модифицированных мышей позволяют получить новые данные об их влиянии на развитие патологии.

Цель исследования – на мышах с гетерозиготными инактивирующими мутациями в генах *Chek2* и *Gprc5a* оценить выживаемость, а также множественность и размеры экспериментальных опухолей в модели канцерогенеза легкого.

Материалы и методы. Использовали мышей гибридов 2-го поколения от скрещивания гетерозиготных по исследуемым мутациям самцов СВAB6F1 с самками BALB/c дикого типа: потомков носителей мутаций *Chek2*^{dAA} (76 самцов и 64 самки) и *Gprc5a*^{insA} (60 самцов и 42 самки). Начиная с 4-месячного возраста мыши получали уретан (этилкарбамат) внутривентрально в дозе 600 мг/кг еженедельно в течение 6 нед. После генотипирования с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции животных распределяли по группам. Через 40 нед от начала опыта проводили оценку параметров канцерогенеза.

Результаты. Доля доживших до 3-месячного возраста мышей с мутациями примерно соответствовала менделевскому распределению (35/41 самцы и 33/31 самки) для потомства самцов, гетерозиготных по *Chek2*^{dAA}, и была существенно меньше в случае *Gprc5a*^{insA} (20/40 самцы и 17/25 самки; $p = 0,043$). Гибель носителей *Gprc5a*^{insA} в течение опыта также была выше, чем у контрольной группы ($p = 0,0506$ у самок). У 2 из 4 погибших до окончания опыта самок *Gprc5a*^{insA} обнаружены синхронные новообразования легких и тимуса, не встречавшиеся в других группах. В конце эксперимента не выявлено существенных различий между значениями показателей множественности, средних линейных размеров и объемов опухолей в группах мышей с мутациями и без них.

Заключение. Установлено, что гетерозиготная инактивирующая мутация *Chek2*^{dAA} у мышей не влияет на развитие животных раннего возраста и не модифицирует параметры индуцированного канцерогенеза легкого. Гетерозиготное носительство мутации *Gprc5a*^{insA} у мышей повышает риск ранней гибели и чувствительность к токсическому и канцерогенному воздействию уретана.

Ключевые слова: мыши, канцерогенез, инактивирующие мутации, CHEK2, GPRC5A

Для цитирования: Майдин М.А., Юрова М.Н., Федорос Е.И. и др. Влияние инактивирующих гетерозиготных мутаций в генах репарации ДНК на развитие экспериментального канцерогенеза легкого у мышей. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):37–44. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-37-44>

Effect of inactivating heterozygous mutations in DNA repair genes on experimental lung carcinogenesis in mice

Mikhail A. Maydin¹, Maria N. Yurova¹, Elena I. Fedoros¹, Petr V. Sergiev², Svetlana N. Aleksakhina¹, Ekaterina A. Otradnova¹, Stepan S. Kruglov¹, Evgeny N. Imyanitov¹

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaia Str., Pesochnyi, Saint Petersburg 197758, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Kolmogorova Str., Moscow 119991, Russia

Contacts: Mikhail Aleksandrovich Maydin mikhail.maydin@gmail.com

Background. Inactivating mutations in *Chek2* and *Gprc5a* genes are known to be associated with cancer development. Experimental carcinogenesis studies in genetically modified mice generate new data on their influence on pathology development.

Aim. In the present study in a model of lung carcinogenesis, survival parameters as well as tumor multiplicity and size in mice with *Chek2* and *Gprc5a* heterozygous inactivating mutations were evaluated.

Material and methods. F2 hybrid mice from crosses between CBAB6F1 males heterozygous for the studied mutations and wild-type BALB/c females were used: *Chek2*^{ΔΔ}-carriers (76 males and 64 females) and *Gprc5a*^{insA}-carriers (60 males and 42 females). Starting at four months of age, mice received urethane (ethyl carbamate) intraperitoneally at a dose of 600 mg/kg weekly for 6 weeks. After genotyping by allele-specific PCR, animals were allocated to groups. Carcinogenesis parameters were evaluated 40 weeks after the beginning of the experiment.

Results. The proportion of mice with mutations surviving to the age of three months roughly followed the Mendelian distribution (35/41 males and 33/31 females) for the offspring of males heterozygous for *Chek2*^{ΔΔ} and was significantly lower in the case of *Gprc5a*^{insA} (20/40 males and 17/25 females, $p = 0.043$). The death of *Gprc5a*^{insA} carriers during the experiment was also higher than in the control group ($p = 0.0506$ in females). Synchronous lung and thymus neoplasms were found in 2 out of 4 *Gprc5a*^{insA} females that died before the end of the experiment, which were not found in other groups. At the end of the experiment, no significant differences in tumor multiplicity, mean linear size, and volume were found between the groups of mice with and without mutations.

Conclusion. It was found that heterozygous inactivating mutation *Chek2*^{ΔΔ} does not affect early age development and does not modify the parameters of induced lung carcinogenesis in mice. Heterozygous carriage of *Gprc5a*^{insA} mutation in mice increases the risk of early death and sensitivity to the toxic and carcinogenic effects of urethane.

Keywords: mice, carcinogenesis, inactivating mutations, CHEK2, GPRC5A

For citation: Maydin M.A., Yurova M.N., Fedoros E.I. et al. Effect of inactivating heterozygous mutations in DNA repair genes on experimental lung carcinogenesis in mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):37–44. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-37-44>

Введение

Наследственные формы рака могут демонстрировать свойства отдельного биологического подтипа и иметь иной профиль лекарственной чувствительности, что требует особых терапевтического и хирургического подходов к лечению [1]. Большинство генов, связанных с наследуемыми типами рака, относятся к группе так называемых генов сохранения стабильности, или генов-попечителей, контролирующих и реализующих различные механизмы репарации ДНК.

Геномные исследования показали ведущую роль генов репарации ДНК в канцерогенезе, особенно при местно-распространенной и метастатической форме опухолевого процесса [2, 3]. *CHEK2* — ядерная серин/треонин-протеинкиназа — является одним из значимых генов, осуществляющих контроль переключения фаз клеточного цикла, работу сигнальной системы репарации ДНК и регуляции апоптоза. У носителей мутаций повышен риск развития рака молочной железы, простаты и толстой кишки, но риск развития рака легкого несколько снижен [4, 5]. В настоящее время определено не менее 100 мутаций в гене *CHEK2*.

GPRC5A (RAIG1) изначально был открыт как индуцируемый ретиноевой кислотой ген, в большей

степени экспрессирующийся в легких [6]. В нормальных тканях белок GPRC5A имеет мембранную локализацию [7] и играет важную роль в процессах регуляции клеточного цикла, репарации ДНК, апоптоза и пр. Исследования последних лет показали, что нарушения экспрессии *GPRC5A* могут привести к развитию множества различных типов рака у людей, а также к другим заболеваниям [8–10].

Установление роли гетерозиготных инактивирующих мутаций в генах репарации ДНК у человека затрудняется тем, что в исследуемую выборку обычно входит только материал, полученный от онкологических пациентов, т. е. отсутствует «контрольная группа». В соответствии с этим исследования на трансгенных животных представляются актуальными.

Цель исследования — на мышях с гетерозиготными инактивирующими мутациями в генах *Chek2* и *Gprc5a* оценить выживаемость, а также множественность и размеры экспериментальных опухолей в модели канцерогенеза легкого.

Материал и методы

Животные. Трансгенные мыши с гетерозиготными инактивирующими мутациями в генах *Chek2*

или *Gprc5a* были получены с использованием систем CRISPR/Cas9 [11]. С целью направленного разрезания и инактивации генов *Chek2* и *Gprc5a* были созданы компоненты системы CRISPR/Cas9. Последовательность гидовой РНК для инактивации гена *Chek2*: GCATACATCGGGACTTAAAGC, *Gprc5a*: GGGGAGCATCTTTCTTTTGT. Для получения зигот использовали мышей инбредных линий CBA (самок) и C57BL/6 (самцов). Генотипирование полученных мышат проводили в возрасте 2 нед.

Использовали отобранную в пробирки с трикалиевой солью этилендиаминуксусной кислоты кровь (40–50 мкл) из кончика хвоста мыши. ДНК из крови выделяли с использованием набора реактивов Blood genomicPrep Mini Spin Kit (Cytiva, США). Генотипирование потомства проводили с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Праймеры для генотипирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Праймеры для генотипирования потомства мышей с мутациями в генах *Chek2* и *Gprc5a*

Table 1. Primers for genotyping offspring of mice with mutations in *Chek2* and *Gprc5a* genes

Название праймера Primer name	Нуклеотидная последовательность праймера Primer nucleotide sequence
nCHEK2_dAA	TCATACATCGGGACTTAGCC
nGPRC5A_insA	GTGCAGGACTCCAACAAAAG

Для получения следующих поколений использовали половозрелых самцов СВAB6F1–носителей гетерозиготных инактивирующих мутаций в генах *Chek2* (с.1057–1058delAA) и *Gprc5a* (с.190insA). Данные мутации приводят к сдвигу рамки считывания и синтезу укороченного белка. Самцов с мутациями скрещивали с самками BALB/c и потомков С (СВAB6F1) F₁ генотипировали в возрасте 3 мес по ранее описанной процедуре. Далее проводили возвратное скрещивание С (СВAB6F1) F₁ самцов – носителей мутации – с самками BALB/c для получения поколения F₂.

В исследование включено 76 самцов и 64 самки – потенциальных носителей мутации *Chek2*^{ΔAA}, а также 60 самцов и 42 самки – потенциальных носителей мутации *Gprc5a*^{insA}.

Условия содержания. Мыши содержались в пластиковых клетках типа Т2 (Tecniplast, Италия) при световом режиме 12:12, температуре 22 ± 2 °С, относительной влажности 50–70 % и режиме проветривания 15 объемов помещения в час. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и гранулированному корму (ООО «Лабораторкорм», Россия).

Вещества/препараты. Для индукции канцерогенеза легкого у мышей использовали уретан (этилкарбамат) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Япония). Канцероген вводили внутривентриально в дозе 600 мг/кг еженедельно в течение 6 нед. В качестве растворителя использовали натрия хлорид 0,9 % (ОАО «Дальхимфарм», Россия).

Экспериментальные процедуры. За 1 нед до начала эксперимента у животных была отобрана кровь для генотипирования, как описано ранее. В возрасте 4 мес животные получали 0,6 г/кг уретана внутривентриально еженедельно в течение 6 нед.

В период введения канцерогена и в последующие 2 нед за животными наблюдали ежедневно с целью выявления ослабленных животных, отвечающих критериям эвтаназии, которая осуществлялась ингаляцией CO₂. Животных взвешивали еженедельно в период введения канцерогена (0–6-я недели опыта), далее – 2 раза в месяц. Через 40 нед после начала введения канцерогена эксперимент был остановлен, все мыши были подвергнуты эвтаназии и немедленной аутопсии.

Легкие с опухолями и основные органы фиксировали в 10 % нейтральном формалине (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) в течение 24–48 ч. После фиксации оценивали частоту и множественность опухолей легкого на основе макроскопического анализа.

Размер опухолей определяли с помощью штангенциркуля после разделения фиксированных легких на доли. Объем опухолей рассчитывали по формуле объема сфероиды (для опухолей, имеющих форму, близкую к сферической) или эллипсоида (для новообразований, у которых измерялся больший и меньший линейные размеры).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc., США). Количественные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, а m – ошибка среднего. Для проверки гипотезы о нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка. Оценку различий в группах по количественным переменным проводили с использованием многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, критерий Краскела–Уоллиса). Частотные показатели оценивали с использованием двустороннего точного теста Фишера, кривые выживаемости анализировали с использованием критерия Гехана–Уилкоксона. Оценка относительного риска представлена в виде ОР [верхняя граница доверительного интервала; нижняя граница доверительного интервала]. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты генотипирования для мышей – потомков гетерозиготных самцов, несущих мутацию в генах *Chek2* или *Gprc5a*, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты генотипирования мышей в опыте

Table 2. Mice genotyping results

Мутация Mutation	Самцы Males		Самки Females		Всего Total	
	mut	wt	mut	wt	mut	wt
<i>Chek2</i>	35	41	33	31	68	72
<i>Gprc5a</i>	20	40	17	25	37*	65

* $p = 0,043$ по сравнению с ожидаемым распределением, точный тест Фишера.
* $p = 0.043$ compared to the expected distribution, Fisher's exact test.

Как видно из представленных данных, доля мышей – носителей мутации в гене *Chek2*, полученных от скрещивания гетерозиготных самцов с мутацией с самками дикого типа, примерно соответствовала ожидаемой (50/50 %). В то же время гетерозиготное носительство мутации в гене *Gprc5a* сопровождалось более низкой выживаемостью мышей на ранних стадиях развития: до возраста 3 мес (время генотипирования) дожило на 50 % меньше самцов – носителей мутации, чем самцов дикого типа; для самок эти различия составили 32 %. Относительный риск (ОР) гибели в раннем возрасте для самцов – носителей *Gprc5a^{insA}* составил 1,33 [ДИ 1,002; 1,778] и для самок 1,19 [ДИ 0,8151; 1,227].

Динамика гибели экспериментальных животных в ходе исследования представлена на рис. 1.

Мутация в гене *Chek2* не оказывала влияния на выживаемость экспериментальных животных в период и после введения уретана (рис. 1, а).

На 17–19-й дни опыта погибло по одному самцу и одной самке в каждой группе животных (*Chek2* и дикого типа). У самцов – носителей мутации *Chek2^{dAA}*

дополнительно фиксировали случаи ранней гибели животных без опухолей на 81-й и 117-й дни опыта, вероятно, связанные с отсроченной реакцией на токсическое воздействие уретана. У мышей самок дикого типа, погибших на 199-й и 271-й дни опыта, а также у самки с мутацией *Chek2^{dAA}*, погибшей на 250-й день опыта, фиксировали опухоли в легких.

У носителей мутации *Gprc5a^{insA}* (рис. 1, б) наблюдалась повышенная гибель по сравнению с животными без мутации, приближающаяся к уровню статистической значимости у самок ($p = 0,0506$, тест Гехана–Уилкоксона).

Число гибели в течение опыта у носителей гетерозиготной мутации *Gprc5a^{insA}* составило 20 % (4 из 20) у самцов и 23,5 % (4 из 19) – у самок (различия с диким типом не достигают уровня статистической значимости; $p = 0,06$, точный критерий Фишера).

Следует отметить, что у самок – носителей мутации *Gprc5a^{insA}* наблюдали раннюю гибель животных с новообразованиями: на 190-й день от введения канцерогена (2 особи, 1 – с синхронным новообразованием тимуса), на 216-й и 251-й (с синхронным

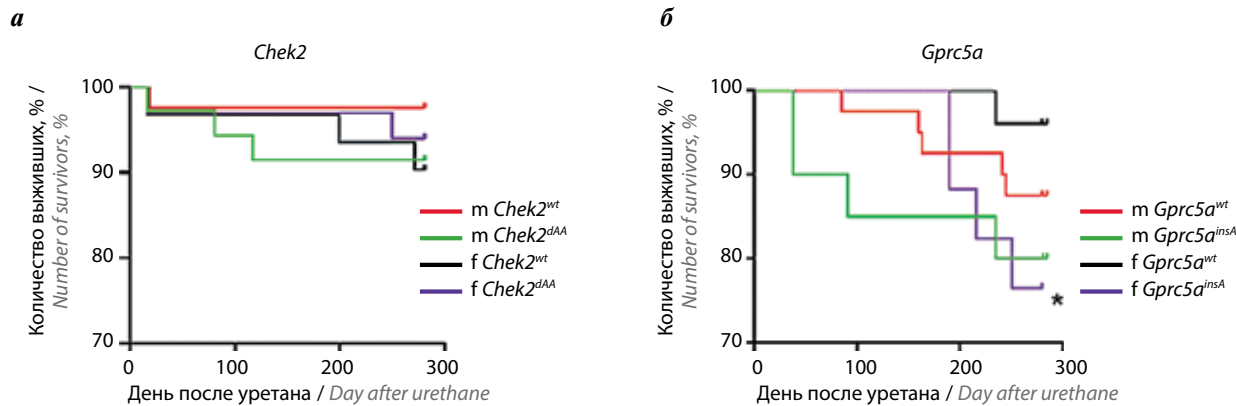


Рис. 1. Динамика гибели экспериментальных животных

*У носителей мутации *Gprc5a^{insA}* наблюдалась повышенная гибель по сравнению с животными без мутации, приближающаяся к уровню статистической значимости у самок: $p = 0,0506$, критерий Гехана–Уилкоксона ($p = 0,0506$)

Fig. 1. Animal survival dynamics

**Gprc5a^{insA}* carriers showed increased mortality compared to non-carriers, approaching the level of statistical significance in females $p = 0.0506$, Gehan–Wilcoxon test ($p = 0.0506$)

новообразованием тимуса) дни опыта (данные не включены в расчет множественности, размеров и объема опухолей). В контрольной группе самок наблюдали гибель животного с новообразованием на 235-й день опыта.

Гибель самцов *Gprc5a^{insA}*, которая наблюдалась в период введения уретана (38-й день, 2 особи) и через 1,5 мес после окончания введения (91-й день, 1 особь), вероятно, была связана с токсическим, а не канцерогенным действием уретана. У животного, погибшего на 235-й день опыта, обнаружены опухолевые новообразования в легких. Среди однопометников без мутации отмечен единичный случай гибели на раннем сроке опыта (85-й день). У 2 из 4 животных, погибших в срок со 160-го по 241-й день опыта, наблюдали новообразования легких на аутопсии.

Под влиянием многократного введения уретана опухоли развивались у 100 % животных, доживших до конца опыта. Множественность опухолей составила $10,5 \pm 1,2$ у самцов – носителей мутации *Chek2^{dAA}* и $9,3 \pm 0,8$ у их однопометников, свободных от мутации ($p > 0,05$). У самок эти значения были схожими ($10,3 \pm 1,1$ и $10,0 \pm 0,9$ соответственно) и также не различались в 2 группах (рис. 2, а). Выявлено, что средний линейный размер опухолей у самцов – носителей мутации *Chek2^{dAA}* статистически значимо превышал значения показателя у самок с таким же генетическим статусом ($1,44 \pm 0,06$ мм vs $1,07 \pm 0,03$ мм; $p < 0,0001$, критерий Краскела–Уоллиса) (рис. 2, в). Аналогичные результаты получены для среднего объема опухоли (рис. 2, д), который составил у носителей гетерозиготной мутации в гене *Chek2* $1,98 \pm 0,27$ мм³ у самцов и $0,83 \pm 0,13$ мм³ – у самок ($p < 0,0001$, критерий Краскела–Уоллиса). Не обнаружено статистически значимых различий в значениях показателей среднего размера и среднего объема опухолей легкого у животных с различным генетическим статусом.

У мышей – носителей инактивирующей мутации в гене *Gprc5a* множественность опухолей составила $10,2 \pm 1,3$ у самцов и $10,2 \pm 1,3$ у самок, что было сравнимо со значениями, полученными у животных без мутации ($12,9 \pm 0,8$ и $13,2 \pm 1,2$ у самцов и самок соответственно; $p > 0,05$) (рис. 2, б). Различия в среднем размере и объеме опухоли между самцами и самками с мутацией, характерные для мышей с *Chek2^{dAA}*, были менее выражены у *Gprc5a^{insA}*. Так, у самцов – носителей мутации *Gprc5a^{insA}* средний размер опухоли составлял $1,33 \pm 0,07$ мм и у самок – $1,16 \pm 0,05$ мм (рис. 2, в), а для среднего объема опухоли были получены значения $1,98 \pm 0,30$ и $1,33 \pm 0,25$ мм³ у самцов и самок соответственно (рис. 2, д). Опухоли у животных – носителей мутации *Gprc5a^{insA}* не отличались по размеру и объему от новообразований у мышей без мутации.

Обсуждение

Проведенное нами исследование показало, что ранняя гибель мышей с гетерозиготной мутацией в гене *Chek2* не отличалась от таковой у мышей дикого типа, что хорошо согласуется с литературными данными, описывающими линию *Chek2^{1100delC}* и нокаутную линию *Chek2^{-/-}* [12].

В наших исследованиях получены данные о том, что носительство гетерозиготной инактивирующей мутации *Gprc5a^{insA}* у мышей сопряжено с повышенным риском гибели в раннем возрасте. В то же время в работе [13] показано, что рождение потомков различного генетического статуса от скрещивания гетерозиготных *Gprc5a^{+/-}* подчиняется менделевскому распределению. Авторы также не наблюдали ускоренной гибели нокаутных или гетерозиготных мышей. Мыши аналогичной нокаутной линии характеризовались ненарушенной структурой легочной ткани и сохраняли нормальное состояние здоровья и продолжительности жизни [14]. Возможно, наличие белка Gprc5a с нарушенной функциональностью в случае инактивирующей мутации *Gprc5a^{insA}* затрудняет реализацию альтернативных механизмов, как это происходит в случае его отсутствия.

В проведенном нами эксперименте при многократном введении уретана частота развития опухолей у мышей самцов и самок составила 100 %, что соответствует более ранним данным по аналогичной модели [15]. При этом существенных различий между значениями показателей множественности, средних линейных размеров и объемов опухолей в группах мышей с мутациями и без таковых не обнаружено. Известно, что гетерозиготные варианты мутаций или нокаутов гена *Chek2* у мышей в отличие от гомозиготных не оказывают существенного влияния на спонтанный и индуцированный канцерогенез у мышей [12, 16]. Это свидетельствует о том, что активность киназы Chek2 избыточна и для нормального функционирования процесса репарации ДНК достаточно 1 копии соответствующего гена. Заслуживает внимания также предположение о возможной компенсации недостаточной активности СНЕК1, близкой по функциям СНЕК2 [17]. Например, на эмбриональных фибробластах, полученных от мышей с двойным нокаутом *Chk1^{+/-}Chk2^{+/-}* в отличие от *Chk1^{+/-}* или *Chk2^{+/-}*, был показан высокий уровень спонтанных повреждений ДНК, совмещенный с недостаточной их репарацией, что может рассматриваться как предиктор канцерогенеза [18].

Проведенное исследование показало, что у мышей с гетерозиготной мутацией *Gprc5a* развивается такое же количество опухолей, как и у животных без мутаций. По данным Q. Тао с соавт. [13], склонностью к повышенному канцерогенезу легких обладают гомозиготные *Gprc5a^{-/-}* животные, но не гетерозиготы.

В работе J. Wang и соавт. 2016 г. показано, что нокаутирование *Gprc5a* увеличивает индуцированную ионизирующим излучением, а также спонтанную частоту опухолей легких у мышей *Gprc5a*^{-/-} [19]; сходные данные были получены в 2020 г. у нокаутных по *Gprc5a*

мышей на модели канцерогенеза легких, индуцированного никотиновым нитрозамин-кетонном [20].

Кроме того, в исследованиях показано, что удаление гена *Gprc5a* у мышей приводит к изменениям регуляции транскрипционного фактора NF-κB, что

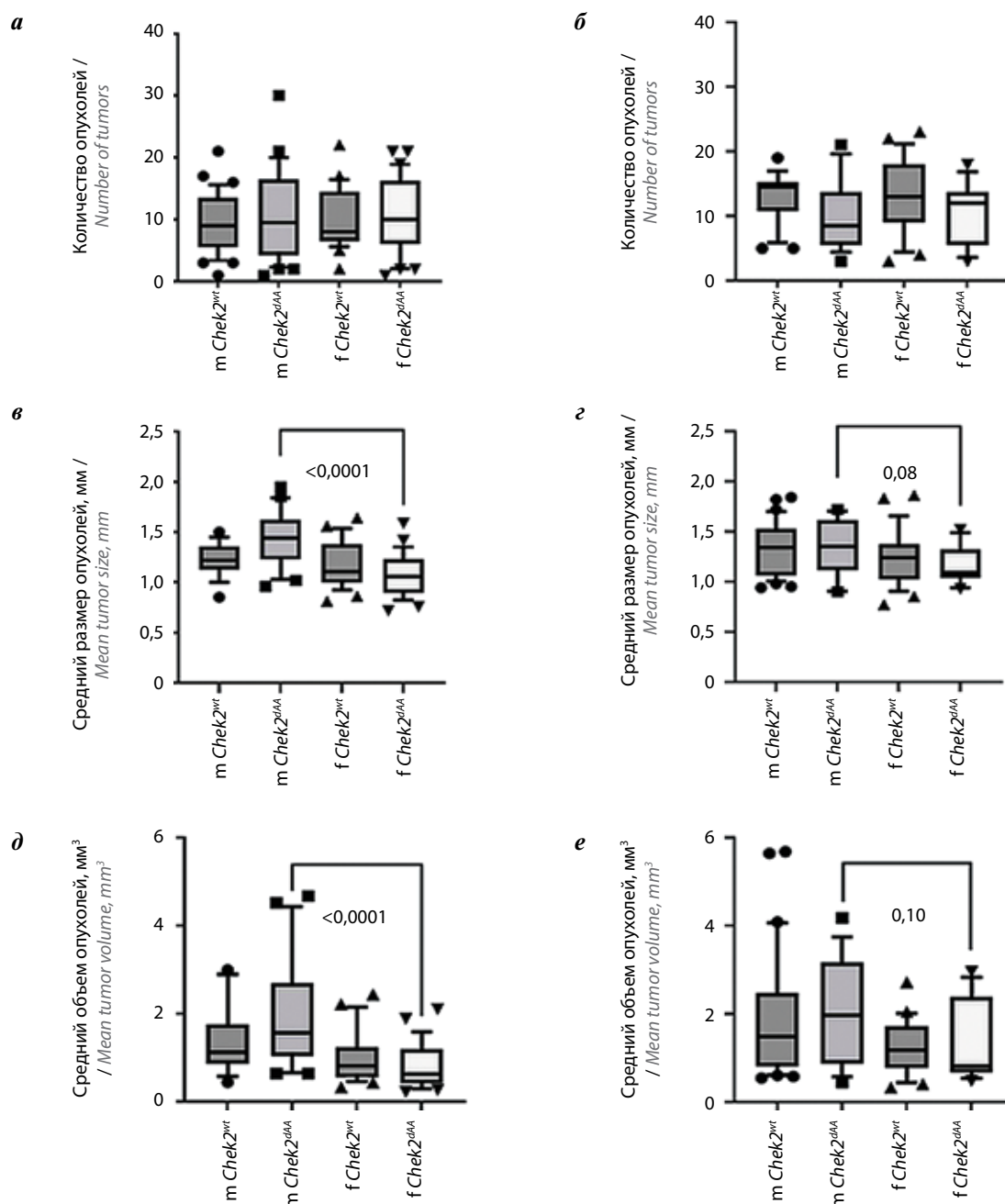


Рис. 2. Множественность и размеры новообразований легких у мышей. Границы «коробки» представляют 1-й и 3-й квартили, линия внутри — медиану, «усы» — 10-й и 90-й процентиля. Использовали критерий Краскела—Уоллиса. Количество новообразований (а и б), средний размер опухолей (мм, в и г) и средний объем новообразований (мм³, д и е) в легких животных групп Chek2 и Gprc5a соответственно

Fig. 2. Multiplicity and size of lung neoplasms in mice. The boundaries of the “box” represent the 1st and 3rd quartiles, the line inside represents the median, and the “whiskers” represent the 10th and 90th percentiles. The Kruskal–Wallis criterion was used. Number of neoplasms (a and b), mean tumor size (mm, в and г) and mean volume of neoplasms (mm³, д and е) in the lungs of animals of Chek2 and Gprc5a groups, respectively

является причиной нарушений работы иммунной системы: так, мыши *Gprc5a*^{-/-} проявляют более сильные воспалительные реакции в ответ на стимуляцию липополисахаридом и бóльшую склонность к развитию как опухолей легких, так и ассоциированных с ними пневмоний [21, 22].

Возможно, именно особенностями иммунитета гетерозиготных по *Gprc5a* животных можно объяснить наблюдаемую в нашем эксперименте гибель наиболее слабых животных на ранних и средних сроках исследования, которая могла занизить результаты оценки количества и размеров опухолей у мышей данной линии. Ранее нами обнаруживалась тенденция к промотированию опухолей легкого у животных с гетерозиготной мутацией *Gprc5a* [11]. В проведенном эксперименте мы наблюдали синхронные новообразования легкого

и тимуса у 2 не доживших до конца опыта самок мышей *Gprc5a*^{insA} (из 17 включенных), что указывает на повышенную чувствительность мышей с данной мутацией не только к токсическому, но и канцерогенному воздействию уретана.

Заключение

Установлено, что гетерозиготная инактивирующая мутация *Chek2*^{ΔA} у мышей не влияет на развитие животных раннего возраста и не модифицирует параметры индуцированного канцерогенеза легкого. Гетерозиготное носительство мутации *Gprc5a*^{insA} у мышей повышает риск ранней гибели и чувствительность к токсическому и канцерогенному воздействию уретана.

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

1. Imyaninov E.N., Byrski T. Systemic treatment for hereditary cancers: A 2012 update. *Hered Cancer Clin Pract* 2013;11(1):2. DOI: 10.1186/1897-4287-11-2
2. De Castro D.G., Clarke P.A., Al-Lazikani B., Workman P. Personalized cancer medicine: Molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93(3):252–9. DOI: 10.1038/clpt.2012.237
3. Pritchard C.C., Mateo J., Walsh M.F. et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2016;375(5):443–53. DOI: 10.1056/NEJMOA1603144
4. Cybulski C., Górski B., Huzarski T. et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004;75(6):1131–5. DOI: 10.1086/426403
5. Kilpivaara O., Vaheristo P., Falck J. et al. CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2004;111(4):543–7. DOI: 10.1002/IJC.20299
6. Cheng Y., Lotan R. Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998;273(52):35008–15. DOI: 10.1074/JBC.273.52.35008
7. Zhou H., Rigoutsos I. The emerging roles of GPRC5A in diseases. *Oncoscience* 2014;1(12):765–76. DOI: 10.18632/oncoscience.104
8. Kume H., Muraoka S., Kuga T. et al. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(6):1471–84. DOI: 10.1074/mcp.M113.037093
9. Liu S., Zhong S., Ye D. et al. Repression of G protein-coupled receptor family C group 5 member A is associated with pathologic differentiation grade of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2013;42(10):761–8. DOI: 10.1111/jop.12077
10. Subrungruang I., Thawornkuno C., Porntip C.P. et al. Gene expression profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013;14(1):557–63. DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.1.557
11. Imyaninov E., Panchenko A., Permyakov O. et al. 21P Urethane-induced lung carcinogenesis in genetically edited C57Bl/6 mice with CHEK2 and GPRC5A heterozygous inactivating mutations. *Ann Oncol* 2020;31:S251. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.173
12. Bahassi E.M., Robbins S.B., Moying Y. et al. Mice with the CHEK2*1100delC SNP are predisposed to cancer with a strong gender bias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(40):17111–6. DOI: 10.1073/PNAS.0909237106
13. Tao Q., Fujimoto J., Men T. et al. Identification of the retinoic acid-inducible *Gprc5a* as a new lung tumor suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(22):1668–82. DOI: 10.1093/jnci/djm208
14. Xu J., Tian J., Shapiro S.D. Normal lung development in RAIG1-deficient mice despite unique lung epithelium-specific expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32(5):381–7. DOI: 10.1165/RCMB.2004-0343OC
15. Панченко А.В., Пигарев С.Е., Федорос Е.И. и др. Трансгенерационный канцерогенез, индуцированный уретаном, у потомков мышей-самцов BALB/c, подвергнутых общему равномерному гамма-облучению. *Вопросы онкологии* 2023;69(2):246–52. DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-246-252
16. Panchenko A.V., Pigarev S.E., Fedoros E.I. et al. Urethane-induced transgenerational carcinogenesis in the offspring of male BALB/c mice exposed to general uniform gamma irradiation. *Voprosy onkologii = Oncology issues* 2023;69(2):246–52. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-246-252
17. Takai H., Naka K., Okada Y. et al. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J* 2002;21(19):5195. DOI: 10.1093/EMBOJ/CDF506
18. Stolarova L., Kleiblova P., Janatova M. et al. *CHEK2* germline variants in cancer predisposition: Stalemate rather than checkmate. *Cells* 2020;9(12):2675. DOI: 10.3390/CELLS9122675
19. Niida H., Murata K., Shimada M. et al. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumour susceptibility *in vivo*. *EMBO J* 2010;29(20):3558. DOI: 10.1038/EMBOJ.2010.218
20. Wang J., Farris A.B., Xu K. et al. GPRC5A suppresses protein synthesis at the endoplasmic reticulum to prevent

- radiation-induced lung tumorigenesis. *Nat Commun* 2016;7:11795. DOI: 10.1038/ncomms11795
20. Fujimoto J., Nunomura-Nakamura S., Liu Y. et al. Development of Kras mutant lung adenocarcinoma in mice with knockout of the airway lineage-specific gene *Gprc5a*. *Int J Cancer* 2017;141(8):1589–99. DOI: 10.1002/ijc.30851
21. Deng J., Fujimoto J., Ye X.F. et al. Knockout of the tumor suppressor gene *Gprc5a* in mice leads to NF-kappa B activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3(4):424–37. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0032
22. Wang T., Jing B., Xu D. et al. PTGES/PGE₂ signaling links immunosuppression and lung metastasis in *Gprc5a*-knockout mouse model. *Oncogene* 2020;39(15):3179–94. DOI: 10.1038/s41388-020-1207-6

Вклад авторов

М.А. Майдин: проведение эксперимента на животных, написание статьи;
 М.Н. Юрова: статистическая обработка данных, написание статьи;
 Е.И. Федорос: редактирование рукописи, подготовка иллюстративного материала;
 П.В. Сергиев: получение исходной трансгенной линии мышей;
 С.Н. Алексахина: написание статьи;
 Е.А. Отраднова: генотипирование потомства;
 С.С. Круглов: разведение животных, подготовка материала для генотипирования;
 Е.Н. Имянитов: концепция исследования, редактирование статьи

Authors contributions

M.A. Maydin: conducting an experiment on animals, article writing;
 M.N. Yurova: statistical processing of data, article writing;
 E.I. Fedoros: manuscript editing, illustrative material preparation;
 P.V. Sergiev: initial transgenic strain generation;
 S.N. Aleksakhina: article writing;
 E.A. Otradnova: genotyping;
 S.S. Kruglov: breeding, blood sampling for genotyping;
 E.N. Imyaninov: research concept, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.А. Майдин / M.A. Maydin: <https://orcid.org/0000-0002-2264-4857>
 М.Н. Юрова / M.N. Yurova: <https://orcid.org/0000-0003-3589-5871>
 Е.И. Федорос / E.I. Fedoros: <https://orcid.org/0000-0002-2426-9843>
 П.В. Сергиев / P.V. Sergiev: <https://orcid.org/0000-0001-8866-1863>
 С.Н. Алексахина / S.N. Aleksakhina: <https://orcid.org/0000-0002-2149-7728>
 Е.А. Отраднова / E.A. Otradnova: <https://orcid.org/0009-0003-0158-1820>
 С.С. Круглов / S.S. Kruglov: <https://orcid.org/0000-0003-1214-4637>
 Е.Н. Имянитов / E.N. Imyaninov: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>

Соблюдение правил биоэтики. Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с требованиями документа «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. СЕД 123». Протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» (протокол № 1249 от 10.11.2020).

Statement of the welfare of animals. Ethical principles for the handling of laboratory animals were followed in accordance with the requirements of the document “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. ETS No 123”. The study protocol was reviewed and approved by the local ethical committee of the N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (protocol No 1249, 10.11.2020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-25-00569).

Funding. The research was supported by Russian Scientific Fund (project No 22-25-00569).

Статья поступила: 04.09.2023. Принята в печать: 15.11.2023.

Article received: 04.09.2023. Accepted for publication: 15.11.2023.