

DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-4-138-145

УДК: 618.19-006.6:577. 2:615.357:615.015

Для цитирования: Эрдынеева Д.Б., Бабышкина Н.Н., Дронова Т.А., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Стегний В.Н., Чердынцева Н.В. Роль циклина D1 в механизмах резистентности к гормональной терапии тамоксифеном. Сибирский онкологический журнал. 2020; 19(4): 138–145. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-4-138-145.

For citation: Erdynееva D.B., Babysheina N.N., Dronova T.A., Vtorushin S.V., Slonimskaya E.M., Stegniy V.N., Cherdynitseva N.V. Role of cyclin D1 in the mechanisms of tamoxifen resistance. Siberian Journal of Oncology. 2020; 19(4): 138–145. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-4-138-145.

РОЛЬ ЦИКЛИНА D1 В МЕХАНИЗМАХ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ГОРМОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ

Д.Б. Эрдынеева¹, Н.Н. Бабышкина^{2,3}, Т.А. Дронова^{2,3}, С.В. Вторушин^{1,2}, Е.М. Слонимская⁴, В.Н. Стегний³, Н.В. Чердынцева^{1,2,3}

Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия¹

Россия, г. Томск, 634050, Московский тракт, 22. E-mail: daya-na@mail.ru¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Россия, г. Томск, 634009, пер. Кооперативный, 5²

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия³

Россия, г. Томск, 634050, пр. Ленина, 36³

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия⁴

Россия, г. Санкт-Петербург, 199034, Университетская наб., 13Б⁴

Аннотация

Рецептор-позитивные опухоли составляют 65–70 % от всех случаев рака молочной железы (РМЖ). Наличие экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в качестве молекулярных мишеней опухоли обуславливает назначение гормональной терапии больным с рецептор-позитивным РМЖ. При проведении гормонотерапии препаратом выбора на протяжении последних десятилетий остается тамоксифен, являющийся селективным модулятором эстрогеновых рецепторов. Однако развитие резистентности является одной из основных причин, ограничивающих эффективность данного препарата. В связи с этим активно изучаются механизмы лекарственной устойчивости и ведется поиск прогностических маркеров клинического течения РМЖ и эффективности тамоксифена. Одним из таких молекулярных маркеров является представитель семейства регуляторных белков – циклин D1, которому отводится центральная роль в регуляции клеточного цикла. В обзоре представлены данные о вовлечении циклина D1 в эстроген-зависимый сигнальный каскад, охарактеризован ген *CCND1* и его наиболее изученные полиморфные локусы, показана прогностическая значимость циклина D1 при рецептор-позитивном РМЖ. Проанализированы результаты экспериментальных и клинических исследований о взаимосвязи уровня экспрессии циклина D1 с эффективностью тамоксифена, рассмотрены современные подходы к преодолению гормонорезистентности на основе исследований циклина D1.

Ключевые слова: рецептор-позитивный рак молочной железы, циклин D1, тамоксифен, механизмы резистентности.

ROLE OF CYCLIN D1 IN THE MECHANISMS OF TAMOXIFEN RESISTANCE

D.B. Erdyneeva¹, N.N. Babyshkina^{2,3}, T.A. Dronova^{2,3}, S.V. Vtorushin^{1,2},
E.M. Slonimskaya⁴, V.N. Stegnyy³, N.V. Cherdyntseva^{1,2,3}

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia¹

2. Moskovsky tract, 634050-Tomsk, Russia. E-mail: daya-na@mail.ru¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia²

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia³

36, Lenina Avenue, 634050-Tomsk, Russia³

St. Petersburg University, St Petersburg, Russia⁴

13B, Universitetskaya Embankment, 199034-St Petersburg, Russia⁴

Abstract

Hormone-receptor positive breast cancer is the most common molecular subtype and represents 60–75 % of all breast cancers (BC). The presence of specific molecular targets such as the estrogen/progesterone receptor determines the use of hormone therapy for patients with this subtype. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, remains the first adjuvant treatment choice for the hormone-receptor positive BC patients. However, tamoxifen resistance is the major limitation of its efficacy. In this regard, the study of drug resistance mechanisms as well as search for biological prognostic markers of tamoxifen efficacy is very important. Cyclin D1 is a representative of the regulatory protein family, which plays a central role in the cell cycle regulation. The data on the association between cyclin D1 and estrogen-dependent signaling as well as the characteristics of *CCND1* gene and its most studied polymorphic loci, were presented. The prognostic significance of cyclin D1 in hormone-receptor positive BC receptor-positive breast cancer was described. The experimental and clinical studies data on the association between the cyclin D1 expression level and tamoxifen efficacy are analyzed. Current approaches to overcoming hormone resistance based on cyclin D1 studies were considered.

Key words: hormone-receptor positive breast cancer, cyclin D1, tamoxifen, resistance mechanisms.

В структуре заболеваемости и смертности женского населения рак молочной железы (РМЖ) остается ведущей онкологической патологией, как в России, так и в мире. По данным ВОЗ, в 2018 г. было зарегистрировано 2,09 млн новых случаев заболевания РМЖ [1]. В Российской Федерации РМЖ является самым распространенным злокачественным новообразованием у женщин, составляя 21,1 % [2].

Многообразие молекулярных нарушений в опухолевых клетках молочной железы определяет высокую клиническую и биологическую гетерогенность заболевания. Для наиболее эффективного подбора терапии принято классифицировать РМЖ на основе экспрессии маркеров: эстрогеновых рецепторов (ER), прогестероновых рецепторов (PR), рецепторной тирозинкиназы семейства эпидермального фактора роста (HER2), белка клеточной пролиферации Ki67, и выделять гормон-позитивные опухоли (люминальный А, люминальный В рак молочной железы, люминальный HER2-позитивный) и гормон-негативные (с гиперэкспрессией HER2 и тройной негативный РМЖ) (таблица).

Для рецептор-позитивного РМЖ применение тамоксифена (препарата класса селективных

модуляторов эстрогеновых рецепторов) остается «золотым» стандартом противоопухолевой гормонотерапии. Однако, несмотря на высокую чувствительность такого типа опухолей к гормонотерапии, использование данного терапевтического подхода не всегда демонстрирует ожидаемую эффективность. В этой связи все большее значение приобретает выявление дополнительных прогностических маркеров, которые определяют различное биологическое поведение опухолей молочной железы и ответ на проводимую терапию. Одним из таких молекулярных маркеров являются регуляторы циклин-зависимых киназ (Cdk) – белки-циклины, которые координируют различные внутриклеточные сигнальные каскады посредством контроля клеточного цикла.

Общие представления о циклине D1

Семейство циклинов (циклин А – циклин J) включает 14 белков с коротким временем полужизни, которые, как правило, отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности. Общей структурной особенностью всех циклинов является наличие гомологичной последовательности из 150 аминокислотных остатков, называемой

Биологические подтипы РМЖ [3, 4]
Biological subtypes of breast cancer [3, 4]

Молекулярный подтип/Molecular subtype	Параметры/Parameters
Тройной негативный/ Triple negative	Негативные ER, PR и HER2/ Negative ER, PR и HER2
Гормон-рецептор-негативный HER2-позитивный/ Hormone-receptor negative HER2-positive	Негативные ER, PR/Negative ER, PR Позитивные HER2/Positive HER2 (ER-/HER2+)
Гормон-рецептор-позитивный HER2-позитивный (люминальный HER2-позитивный)/ Hormone-receptor positive HER2-positive (luminal HER2-positive)	Позитивные ER, PR/Positive ER, PR Позитивные HER2/Positive HER2 (ER+/HER2+)
Гормон-рецептор-позитивный HER2-негативный/ Hormone-receptor positive HER2-negative	Высокая экспрессия ER/PR/High ER/PR expression Низкий уровень Ki67/Low Ki67
Люминальный-А подобный/ Luminal A-like	Низкая степень злокачественности/Low-grade cancer <i>Прогностически благоприятные мультипараметрические молекулярные маркеры/ Favorable multiparameter molecular markers</i>
Люминальный-В подобный/ Luminal B-like	Низкая экспрессия ER/PR/Low ER/PR expression Высокий уровень Ki67/High Ki67 Высокая степень злокачественности/ High-grade cancer <i>Неблагоприятные мультипараметрические молекулярные маркеры/ Unfavorable multiparameter molecular markers</i>

циклиновым боксом, который отвечает за связывание с Cdk. N-концевой участок циклинов (бокс деструкции) определяет внутриклеточный распад белков [5]. В зависимости от времени действия в клеточном цикле циклины подразделяются на два подсемейства: G1-циклины (C, D, E) и митотические циклины (циклины A и B). Циклины группы D (D1, D2, D3) являются основными белками, регулирующими фазовый переход G1/S в клеточном цикле, из всех циклинов этой группы наиболее изученными являются белки D1 [6]. Циклин D1 необходим для формирования долек и альвеол в процессе нормального развития молочной железы [7]. Показано, что aberrantная экспрессия циклина D1 стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы и способствует развитию опухоли в линиях трансгенных мышей [8]. Высокий уровень экспрессии циклина D1 обнаружен при доброкачественных пролиферативных заболеваниях молочной железы, что свидетельствует о его вовлечении в наиболее ранние молекулярные нарушения, ведущие к развитию злокачественной трансформации [9].

В ответ на разнообразные митогенные стимулы внутриклеточное содержание циклина D1 резко возрастает, что ведет к образованию комплекса циклин D1-Cdk4/6, который транспортируется из цитоплазмы в клеточное ядро белками p21waf1, p27Kip1 и p57Kip2. В середине G1-фазы циклин D1-Cdk4/6 и активированный комплекс циклин E-Cdk2 фосфорилируют белок pRb, что приводит к высвобождению транскрипционных факторов E2F-DP, регулирующих активность генов, продук-

ты которых необходимы для начала и прохождения S-фазы [10, 11].

Помимо важнейшей регуляторной роли в клеточном цикле, циклин D1 вовлечен в механизмы активации ERα, опосредуя взаимодействие ERα и SRC, что позволяет формировать транскрипционно активный тройной комплекс в отсутствие лиганда [12]. С другой стороны, ERα регулирует экспрессию гена циклина D1, формируя, таким образом, петлю положительной обратной связи – активация циклина D1 приводит к экспрессии ERα, что, в свою очередь, индуцирует увеличение продукции циклина D1 [13].

Ген циклина D1 и его полиморфные варианты

Циклин D1 кодируется геном *CCND1*, локализованным на хромосоме 11q13.3. Амплификация *CCND1* достигает 10–15 % случаев первичного рака молочной железы, причем наиболее характерна для рецептор-позитивных опухолей, в частности люминального В подтипа [14–16]. Однако гиперэкспрессия циклина D1 наблюдается в 50–70 % опухолей молочной железы, что свидетельствует о наличии регуляторных механизмов белковой экспрессии циклина D1, отличных от генной амплификации [17].

Согласно данным базы Gene Cards, известно около 4385 полиморфных вариантов гена *CCND1*. Наиболее хорошо охарактеризованным является полиморфизм в четвертом экзоне *CCND1* rs9344 G>A. В результате альтернативного сплайсинга

гена *CCND1* замена глицина на аланин в 870-м положении приводит к образованию двух транскриптов – изоформ а и b. Транскрипт b кодируется вариантным аллелем А, тогда как дикий тип *CCND1* кодирует транскрипт а; оба транскрипта имеют высокую степень гомологии. Вариант транскрипта b характеризуется коротким С-концевым доменом, который ответствен за процессы внутриклеточной протеосомной деградации, что определяет длительный период полураспада вариантного белка и высокий уровень экспрессии *CCND1* [18]. Представленные результаты данных проведенных метаанализов свидетельствуют о связи *CCND1* rs9344 G>A с риском развития РМЖ в различных популяционных выборках [19–23].

Помимо *CCND1* rs9344 G>A перспективным объектом исследования является полиморфный локус rs67865 в 3′ нетранслируемом участке (3′-UTR) гена *CCND1*, характеризующийся заменой С на G в 1722-м положении. Хотя роль данного полиморфизма в регуляции экспрессии гена *CCND1* остается неизвестной, показано, что мутации в 3′-UTR гена *CCND1* связаны с высокой стабильностью мРНК и гиперэкспрессией белка [24]. Метаанализ, представленный в 2016 г., не подтвердил ассоциативную связь полиморфизма rs67865 с риском развития злокачественных новообразований [25]. Однако более ранние данные, полученные в 2009 г. N. Mavaddat et al., свидетельствуют о том, что этот полиморфный локус гена *CCND1* ассоциирован с чувствительностью к рецептор-негативному раку молочной железы [26]. Интегративный геномный подход, включающий данные полногеномных исследований (GWAS) и экспрессионный анализ, показал, что экспрессия генов, ассоциированных с риском развития РМЖ, различна в рецептор-позитивных и рецептор-негативных опухолях. Используя такой подход, обнаружено 13 SNP (включая *CCND1* rs9344), связанных с дифференциальной экспрессией соответствующих им генов в рецептор-позитивном РМЖ [27]. Стоит отметить, что в современных литературных источниках не представлены исследования SNPs rs9344 и rs678653 во взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у больных РМЖ.

Прогностическая значимость циклина D1 при рецептор-позитивном раке молочной железы

Несмотря на достаточно широкий интерес исследователей к циклину D1, данные о его прогностической значимости при рецептор-позитивном РМЖ довольно противоречивы. Наибольшее количество работ посвящено иммуногистохимической оценке экспрессии белка, достаточно часто анализируются число копий гена *CCND1* и уровень его транскрипционной активности в аспекте факторов прогноза РМЖ [28]. Показана корреляция числа копий гена *CCND1* и/или гиперэкспрессии циклина D1 с высоким риском развития рецидива и неблагоприятным

исходом заболевания [29–35]. В ряде исследований связь циклина D1 с прогнозом у больных с эстроген-позитивным РМЖ не была подтверждена [36–38]. Согласно результатам TransATAC проекта, амплификация гена *CCND1* ассоциирована с низкими показателями безрецидивной выживаемости, в то время как ядерная экспрессия *CCND1*, напротив, – с высокими показателями для данной группы пациентов [39]. По данным A.B. Ortiz et al. [14], гиперэкспрессия циклина D1 ассоциирована с благоприятными прогностическими маркерами (экспрессией ER, PR, низким grade). Вместе с тем авторами показано, что число копий гена *CCND1* связано с коротким периодом выживаемости без прогрессирования у больных РМЖ. По-видимому, прогностическое значение амплификации гена *CCND1* и уровня его белковой продукции может иметь противоположную направленность, которая обусловлена различной функциональной активностью циклина D1 в разные фазы клеточного цикла и многообразными регуляторными механизмами, опосредованными различными сигнальными каскадами [14]. По данным Z. Li et al. [40], большинство опухолей с амплификацией *CCND1*/высоким уровнем экспрессии циклина D1 имеет люминальный В подтип РМЖ, тогда как опухоли базально-подобного типа характеризуются потерей экспрессии белка, что свидетельствует о важном вкладе экспрессионного статуса циклина D1 в развитие опухолей данного молекулярного варианта.

Взаимосвязь циклина D1 с эффективностью тамоксифена

Антиэстрогенные эффекты тамоксифена реализуются за счет конкурирующего с эстрадиолом связывания с цитоплазматическими ER α и/или ER β . В противоположность комплексу эстроген-рецептор комплекс рецептор-тамоксифен не стимулирует синтез ДНК в ядре, что приводит к аресту клеточного цикла [41]. Поскольку тамоксифен опосредованно вовлечен в регуляцию клеточного цикла, есть основания полагать, что гиперэкспрессия циклина D1 может определять рост рецептор-позитивных опухолей молочной железы, устойчивых к антиэстрогенам. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что индукция гиперэкспрессии циклина D1 в культурах эстроген-позитивных опухолевых клеток отменяет антионкогенный эффект антиэстрогенов, что является потенциальным механизмом резистентности [42, 43]. Для выявления потенциальных генов, ассоциированных с резистентностью к тамоксифену K.J. Huber-Keener et al. сравнили транскриптом тамоксифен-резистентных и тамоксифен-чувствительных клеточных линий РМЖ. Авторы показали, что тамоксифен-резистентные клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии гена *CCND1* [44].

Проведенные клинические исследования показали, что высокий уровень экспрессии циклина

D1 является маркером резистентности к тамоксифену [45, 46], что согласуется с данными экспериментальных работ. Ранее нами также был изучен уровень экспрессии циклина D1 у больных с рецептор-позитивным РМЖ, получавших терапию тамоксифеном, однако существенных корреляций с эффективностью лечения выявлено не было [47]. Вместе с тем было показано, что высокий уровень экспрессии циклина D1 ассоциирован с гетерогенным характером распределения ER α в опухолях [48].

Пути преодоления резистентности к тамоксифену на основе исследований циклина D1

В настоящее время активно ведется поиск новых подходов, направленных на преодоление резистентности к гормонотерапии, которые связаны с изучением циклинов и циклин-зависимых киназ как молекулярных мишеней противоопухолевого лечения. Так, в исследовании J. Xing et al. изучена роль митохондриального белка класса гистоновых деацетилаз сиртуина 4 (SIRT4) в MCF7 и T47D клеточных линиях РМЖ, леченных тамоксифеном. Авторы показали, что SIRT4 блокирует транскрипцию и трансляцию *MYC* и *CCND1* в опухолевых клетках посредством STAT3 сигнального пути. Полученные данные свидетельствуют о важной роли SIRT4 в механизмах чувствительности ER-позитивных опухолей к тамоксифену и необходимости его дальнейшего исследования [49].

Экспериментальные исследования последних лет показали, что тамоксифен в комбинации с нестероидными противовоспалительными препаратами (аспирин) ингибируют экспрессию регуляторных белков c-myc, рецептора прогестерона и циклина D1 и подавляют рост тамоксифен-резистентных MCF-7 клеточных линий РМЖ [50]. Полученные данные свидетельствуют о том, что аспирин обладает противоопухолевым эффектом, который реализуется посредством ингибирования активности циклинов и циклин-зависимых киназ. Авторы отмечают, что раскрытие возможных механизмов действия аспирина, определяющих чувствительность к тамоксифену, является одним из перспективных направлений исследования.

Интерес представляют данные о роли серинтреонин киназы Aurora-A (Aur-A) в механизмах чувствительности к тамоксифену. Показано, что истощение данного белка, который вовлечен в процессы регуляции митоза и клеточного цикла, повышает чувствительность эстроген-позитивных клеточных линий РМЖ к тамоксифену [51]. В работе продемонстрировано, что селективный ингибитор Aur-A MLN8237, который в настоящее время проходит клинические испытания, синергично взаимодействует с тамоксифеном и ингибирует рост тамоксифен-резистентных клеточных линий. Кроме того, Aur-A индуцирует активность ER α и *CCND1* посредством фосфорилирования эстроге-

нового рецептора по аминокислотным остаткам Ser167 и Ser305, что рассматривается в качестве Aur-A-опосредованного механизма развития резистентности к тамоксифену.

Наиболее перспективным подходом к преодолению гормональной резистентности является использование ингибиторов циклин-зависимых киназ, механизм действия которых обусловлен селективным подавлением комплекса циклин D1-Cdk4/6 [52, 53]. Палбоциклиб (palbociclib) представляет собой пероральный высокоселективный низкомолекулярный ингибитор циклин-зависимых киназ, один из первых Cdk4/6, для которого была доказана противоопухолевая активность *in vitro*. R.S. Finn et al. продемонстрировали синергичный механизм действия палбоциклиба и тамоксифена в эстроген-позитивных линиях клеток РМЖ [54]. Результаты рандомизированного, мультицентрового исследования III фазы PALOMA-3, представленного в 2016 г., показали, что применение фулвестранта в комбинации с палбоциклибом у больных с рецептор-позитивным HER2-негативным метастатическим РМЖ позволяет значительно увеличить показатели выживаемости без прогрессирования по сравнению со схемой фулвестрант плюс плацебо, причем независимо от степени гормональной резистентности, уровня экспрессии ER/PR и статуса мутаций *PIK3CA* [55]. По итогам успешных клинических исследований MONALEESA-2 и MONARCH-1 еще два ингибитора Cdk4/6 – рибоциклиб (ribociclib) и абемакиклиб (abemaciclib) – получили одобрение FDA в качестве препаратов первой линии для лечения пациенток с рецептор-позитивным HER2-негативным метастатическим РМЖ в комбинации с антиэстрогенной терапией [53]. Стоит отметить, что персонализированное назначение палбоциклиба и рибоциклиба и абемакиклиба для такой категории больных стало возможным при наличии амплификации *CCND1* в опухоли по результатам комплексного теста геномного профилирования FoundationOne CDx, одобренного FDA в 2017 г. [56]. В Российской Федерации стандарты лечения больных с рецептор-позитивным HER2-негативным метастатическим РМЖ включают палбоциклиб и рибоциклиб.

Новым витком этих исследований является поиск маркеров чувствительности и прогноза эффективности ингибиторов Cdk4/6 в сочетании с антиэстрогенными препаратами. Разрабатываются подходы, которые позволят одновременно блокировать Cdk2 и Cdk4/6 для повышения эффективности терапии ингибиторами циклин-зависимых киназ.

Заключение

Нарушение контроля над клеточным циклом является неотъемлемой частью развития опухолевого процесса. Поэтому факторы, вовлеченные в регуляцию контроля фазового перехода клетки – циклины и циклин-зависимые киназы, – рассматриваются в качестве перспективных терапевтических мише-

ней. Накопленные к настоящему времени данные экспериментальных и клинических исследований циклина D1, а также результаты собственных наблюдений диктуют необходимость дальнейшего

изучения этого молекулярного параметра на генетическом и фенотипическом уровне как маркера прогноза эффективности гормонотерапии.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Пак*. ВОЗ [Интернет]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (дата обращения: 28.01.2019). [*Cancer*. WHO [Internet]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (cited: 28.01.2019). (in Russian)].
2. *Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М., 2018. 250 с. [*Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow, 2018. 250 p. (in Russian)].
3. *Curigliano G., Burstein H.J., Winer E.P., Gnant M., Dubsy P., Loibl S., Colleoni M., Regan M.M., Piccart-Gebhart M., Senn H.-J., Thurlimann B.* De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol*. 2017 Jun; 28(8): 1700–12. doi: 10.1093/annonc/mdx308.
4. *Burstein H.J., Curigliano G., Loibl S., Dubsy P., Gnant M., Poortmans P., Colleoni M., Carsten D., Piccart-Gebhart M., Regan M., Senn H.-J., Winer E.P., Thurlimann B.* Estimating the Benefits of Therapy for Early Stage Breast Cancer The St Gallen International Consensus Guidelines for the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. *Ann Oncol*. 2019 Oct; 30(10): 1541–57. doi: 10.1093/annonc/mdz235.
5. *Hunt T.* Cell biology. Cell cycle gets more cyclins. *Nature*. 1991 Apr 11; 350(6318): 462–3. doi: 10.1038/350462a0.
6. *Sherr C.J., Roberts J.M.* Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995 May 15; 9(10): 114963. doi: 10.1101/gad.9.10.1149.
7. *Sicinski P., Donaher J.L., Parker S.B., Li T., Fazeli A., Gardner H., Haslam S.Z., Bronson R.T., Elledge S.J., Weinberg R.A.* Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*. 1995 Aug 25; 82(4): 621–30. doi: 10.1016/0092-8674(95)90034-9.
8. *Wang T.C., Cardiff R.D., Zukerberg L., Lees E., Arnold A., Schmidt E.V.* Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*. 1994 Jun 23; 369(6482): 669–71. doi: 10.1038/369669a0.
9. *Alle K.M., Henshall S.M., Field A.S., Sutherland R.L.* Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*. 1998 Apr; 4(4): 847–54.
10. *Kato J., Matsushime H., Hiebert S.W., Ewen M.E., Sherr C.J.* Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*. 1993 Mar; 7(3): 331–42. doi: 10.1101/gad.7.3.331.
11. *O'Leary B., Finn R.S., Turner N.C.* Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13(7): 41730. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.26.
12. *Zwijsen R.M., Buckle R.S., Hijmans E.M., Loomans C.J., Bernards R.* Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev*. 1998; 12(22): 3488–98. doi: 10.1101/gad.12.22.3488.
13. *Griekspoor A., Margarido T.C., Zwart W., Michalides R.* Review of: BRCA1 and cyclin D1: gate keepers in hormone responsive tissues? *Breast Cancer Online*. 2006 Mar 22; 9(4): 1–3. doi: 10.1017/S1470903106005098.
14. *Ortiz A.B., Garcia D., Vicente Y., Palka M., Bellas C., Martin P.* Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLoS One*. 2017 Nov 15; 12(11): e0188068. doi: 10.1371/journal.pone.0188068.
15. *Holm K., Staaf J., Jönsson G., Vallon-Christersson J., Gunnarsson H., Arason A., Magnusson L., Barkardottir R.B., Hegardt C., Ringnér M., Borg A.* Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in CCND1-amplified sporadic and familial breast tumours. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun; 133(2): 583–94. doi: 10.1007/s10549-011-1817-3.
16. *Roy P.G., Pratt N., Purdie C.A., Baker L., Ashfield A., Quinlan P., Thompson A.M.* High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *Int J Cancer*. 2010 Jul; 127(2): 355–60. doi: 10.1002/ijc.25034.
17. *Bartkova J., Lukas J., Muller H., Lutzhoft D., Strauss M., Bartek J.* Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1994 May; 57: 353–361. doi: 10.1002/ijc.2910570311.
18. *Solomon D.A., Wang Y., Fox S.R., Lambeck T.C., Giesting S., Lan Z., Senderowicz A.M., Conti C.J., Knudsen E.S.* Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*. 2003; 278(32): 30339–47. doi: 10.1074/jbc.M30396200.
19. *Thakur N., Kumari S., Mehrotra R.* Association between Cyclin D1 G870A (rs9344) polymorphism and cancer risk in Indian population: meta-analysis and trial sequential analysis. *Biosci Rep*. 2018 Nov 30; 38(6): BSR20180694. doi: 10.1042/BSR20180694.
20. *Sergentanis T.N., Economopoulos K.P.* Cyclin D1 G870A polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis comprising 9,911 cases and 11,171 controls. *Mol Biol Rep*. 2010 Dec; 38(8): 4955–63. doi: 10.1007/s11033-010-0639-4.
21. *Lu C., Dong J., Ma H., Jin G., Hu Z., Peng Y., Guo X., Wang X., Shen H.* CCND1 G870A polymorphism contributes to breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Sep 26; 116(3): 571–575. doi: 10.1007/s10549-008-0195-y 60.
22. *Cui J., Shen L., Wang Y.* Specific CCND1 G870A Alleles associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis of 5,528 cases and 5,353 controls. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(10): 5023–25. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.10.5023.
23. *Soleimani Z., Kheirkhah D., Sharif M.R., Sharif A., Karimian M., Aftabi Y.* Association of CCND1 gene c.870G>A polymorphism with breast cancer risk: a case-control study and a meta-analysis. *Pathol Oncol Res*. 2016 Dec 21; 23(3): 621–631. doi: 10.1007/s12253-016-0165-3.
24. *Hosokawa Y., Suzuki R., Joh T., Maeda Y., Nakamura S., Kodera Y., Arnold A., Seto M.* A small deletion in the 3'-untranslated region of the cyclin D1/PRAD1/bcl-1 oncogene in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 1998; 76(6): 791–796. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980610)76:6<791::aid-ijc4>3.0.co;2-t.
25. *Dai X., Zhang X., Wang B., Wang C., Jiang J., Wu C.* Association between polymorphism rs678653 in human Cyclin D1 gene (CCND1) and susceptibility to cancer: a meta-analysis. *Medical Science Monitor*. 2016 Mar 16; 22: 863–874. doi: 10.12659/msm.895237.
26. *Mavaddat N., Dunning A.M., Ponder B.A.J., Easton D.F., Pharoah P.D.* Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan; 18(1): 255–259. doi: 10.1158/1055-9965.epi-08-0704.
27. *Hicks C., Asfour R., Pannuti A., Miele L.* An Integrative genomics approach to biomarker discovery in breast cancer. *Cancer Inform*. 2011 Jul; 10: 185–204. doi: 10.4137/CIN.S6837.
28. *Ahlin C., Lundgren C., Embretsén-Varro E., Jirstrom K., Blomqvist C., Fjällskog M.* High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Aug; 164(3): 667–678. doi: 10.1007/s10549-017-4294-5.
29. *Kenny F.S., Hui R., Musgrove E.A., Gee J.M., Blamey R.W., Nicholson R.L., Sutherland R.L., Robertson J.F.* Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999 Aug; 5(8): 2069–2076.
30. *He Q., Wu J., Liu X.L., Ma Y.H., Wu X.T., Wang W.Y., An H.X.* Clinicopathological and prognostic significance of cyclin D1 amplification in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J BUON*. 2017; 22(5): 1209–16.
31. *Beca F., Pereira M., Cameselle-Teijeiro J.F., Martins D., Schmitt F.* Altered PPP2R2A and Cyclin D1 expression defines a subgroup of aggressive luminal-like breast cancer. *BMC Cancer*. 2015; 15: 285. doi: 10.1186/s12885-015-1266-1.
32. *Sun X., Zhangyuan G., Shi L., Wang Y., Sun B., Ding Q.* Prognostic and clinicopathological significance of cyclin B expression in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 May; 96(19): e6860. doi: 10.1097/MD.00000000000006860.
33. *Tobin N.P., Lundgren K.L., Conway C., Anagnostaki L., Costello S., Landberg G.* Automated image analysis of cyclin D1 protein expression in invasive lobular breast carcinoma provides independent prognostic information. *Hum Pathol*. 2012 Nov; 43(11): 2053–61. doi: 10.1016/j.humpath.2012.02.015.
34. *Elsheikh S., Green A.R., Aleskandarany M.A., Grainge M., Paish C.E., Lambros M.B., Reis-Filho J.S., Ellis I.O.* CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jul 26; 109(2): 325–335. doi: 10.1007/s10549-007-9659-8.
35. *Rudas M., Lehnert M., Huynh A., Jakesz R., Singer C., Lax S., Schipfinger W., Dietze O., Greil R., Stiglbauer W., Kwasny W., Grill R., Stierer M., Gnant M.F., Filipits M., Austrian Breast and Colorectal Cancer Study G.* Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 15; 14(6): 1767–74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4122.
36. *Aaltonen K., Amini R.M., Landberg G., Eerola H., Aittomaki K., Heikkilä P., Nevanlinna H., Blomqvist C.* Cyclin D1 expression is associ-

ated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 113(1): 75–82. doi: 10.1007/s10549-008-9908-5.

37. Choschzick M., Heilenkotter U., Lebeau A., Jaenicke F., Terracciano L., Bokemeyer C., Sauter G., Simon R. MDM2 amplification is an independent prognostic feature of node-negative, estrogen receptor-positive early-stage breast cancer. *Cancer Biomark.* 2010; 8(2): 53–60. doi: 10.3233/DMA-2011-0806.

38. Umekita Y., Ohi Y., Sagara Y., Yoshida H. Overexpression of cyclin D1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor negative breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2002; 98(3): 415–418. doi: 10.1002/ijc.10151.

39. Lundgren K., Brown M., Pineda S., Czuzick J., Salter J., Zabaglo L., Howell A., Dowsett M., Landberg G. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(2): R57. doi: 10.1186/bcr3161.

40. Li Z., Cui J., Yu Q., Wu X., Pan A., Li L. Evaluation of CCND1 amplification and CyclinD1 expression: diffuse and strong staining of ER positive breast cancers. *Am J Transl Res.* 2016 Jan 15; 8(1): 142–153.

41. Doisneau-Sixou S.F., Sergio C.M., Carroll J.S., Hui R., Musgrove E.A., Sutherland R.L. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2003 Jun; 10(2): 179–186. doi: 10.1677/erc.0.0100179.

42. Hui R., Finney G.L., Carroll J.S., Lee C.S., Musgrove E.A., Sutherland R.L. Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 6916–23.

43. Wilcken N.R., Prall O.W., Musgrove E.A., Sutherland R.L. Inducible overexpression of cyclin D1 in breast cancer cells reverses the growth-inhibitory effects of antiestrogens. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 849–854.

44. Huber-Keener K.J., Liu X., Wang Z., Wang Y., Freeman W., Wu S., Planas-Silva M.D., Ren X., Cheng Y., Zhang Y., Vrana K., Liu C.G., Yang J.M., Wu R. Differential gene expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells revealed by a new analytical model of RNA-Seq Data. *PLoS ONE.* 2012; 7(7): e41333. doi: 10.1371/journal.pone.0041333.

45. Ahnstrom M., Nordenskjold B., Rutqvist L.E., Skoog L., Stal O. Role of cyclin D1 in ErbB2-positive breast cancer and tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 91(2): 145–151. doi: 10.1007/s10549-004-6457-4.

46. Stendahl M., Kronblad A., Ryden L., Emdin S., Bengtsson N.O., Landberg G. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2004; 90(10): 1942–1948. doi: 10.1038/sj.bjc.6601831.

47. Babushkina N., Vtorushin S., Zavyalova M., Patalyak S., Dronova T., Litviakov N., Slonimskaya E., Kzhyskowska J., Cherdynseva N., Choyznov E. The distribution pattern of ERα expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Med.* 2017 Aug; 17(3): 383–393. doi: 10.1007/s10238-016-0428-z.

48. Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Бабышкина Н.Н., Паталяк С.В. Роль морфологических и генетических особенностей

строения рецепторов эстрогенов альфа в развитии резистентности к эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным раком молочной железы. *Сибирский онкологический журнал.* 2014; 3: 39–44. [Slonimskaya E.M., Vtorushin S.V., Babushkina N.N., Patalyak S.V. Role of morphological and genetic structural characteristics of estrogen receptor alpha in the development of resistance to endocrinotherapy with tamoxifen in patients with luminal breast cancer. *Siberian Journal of Oncology.* 2014; 3: 39–44. (in Russian)].

49. Xing J., Li J., Fu L., Gai J., Guan J., Li Q. SIRT4 enhances the sensitivity of ER-positive breast cancer to tamoxifen by inhibiting the IL-6/STAT3 signal pathway. *Cancer Med.* 2019 Nov; 8(16):7086–7097. doi: 10.1002/cam4.2557.

50. Cheng R., Liu Y.J., Cui J.W., Yang M., Liu X.L., Li P., Wang Z., Zhu L.Z., Lu S.Y., Zou L., Wu X.Q., Li Y.X., Zhou Y., Fang Z.Y., Wei W. Aspirin regulation of c-myc and cyclinD1 proteins to overcome tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Oncotarget.* 2017 May 2; 8(18): 30252–30264. doi: 10.18632/oncotarget.16325.

51. Zheng X.Q., Guo J.P., Yang H., Kanai M., He L.L., Li Y.Y., Koomen J.M., Minton S., Gao M., Ren X.B., Coppola D., Cheng J.Q. Aurora-A is a determinant of tamoxifen sensitivity through phosphorylation of ERα in breast cancer. *Oncogene.* 2014 Oct; 33(42): 4985–96. doi: 10.1038/onc.2013.444.

52. Кононенко И.Б., Снеговой А.В., Сельчук В.Ю. Ингибиторы циклин-зависимых киназ: эффективность и безопасность. *Медицинский Совет.* 2019; 10: 42–55. [Kononenko I.B., Snegovoi A.V., Selchuk V.Yu. Cyclin-dependent kinase inhibitors: efficacy and safety. *Medical Council.* 2019; (10): 42–55. (in Russian)]. doi: 10.21518/2079-701X-2019-10-42-55.

53. Sobhani N., D'Angelo A., Pittacolo M., Roviello G., Miccoli A., Corona S.P., Bernocchi O., Generali D., Otto T. Updates on the CDK4/6 inhibitory strategy and combinations in breast cancer. *Cells.* 2019 Apr 6; 8(4): pii: E321. doi: 10.3390/cells8040321.

54. Finn R.S., Dering J., Conklin D., Kalous O., Cohen D.J., Desai A.J., Ginther C., Atefi M., Chen I., Fowst C., Los G., Slamon D.J. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(5): R77. doi: 10.1186/bcr2419.

55. Cristofanilli M., Turner N.C., Bondarenko I., Ro J., Im S.A., Masuda N., Colleoni M., DeMichele A., Loi S., Verma S., Iwata H., Harbeck N., Zhang K., Theall K.P., Jiang Y., Bartlett C.H., Koehler M., Slamon D. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016 Apr; 17(4): 425–439. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00613-0.

56. *FoundationOne CDx-P170019* FDA [Internet]. URL: <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/foundationone-cdx-p170019>. (cited: 21.01.2020).

Поступила/Received 07.02.2020
Принята в печать/Accepted 25.05.2020

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Эрдынеева Даяна Батоевна, студент 5 курса медико-биологического факультета, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Россия). E-mail: daya-na@mail.ru.

Бабышкина Наталия Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nbabushkina@mail.ru. SPIN-код: 2738-9275. Author ID (Scopus): 26641099700. Researcher ID (WOS): A-7526-2012. ORCID: 0000-0002-0562-3878.

Дронова Татьяна Анатольевна, аспирант института биологии, Национальный исследовательский Томский государственный университет; младший научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 3516-2517. Author ID (Scopus): 6602971247. Researcher ID (WOS): R-5952-2016. ORCID: 0000-0003-3009-2404.

Вторушин Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2442-4720. Author ID (Scopus): 26654562300. Researcher ID (WOS): S-3789-2016. ORCID: 0000-0002-1195-4008.

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры онкологии медицинского факультета, Санкт-Петербургский государственный университет (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 7763-6417. Author ID (Scopus): 6603658443. Researcher ID (WOS): C-7405-2012. ORCID: 0000-0003-4382-5697.

Стегний Владимир Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экологии генетики и охраны окружающей среды, Национальный исследовательский Томский государственный университет (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5588-5450. Author ID (Scopus): 57207471480. Researcher ID (WOS): N-7656-2014.

Чердынцева Надежда Викторовна, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5344-0990. Author ID (Scopus): 6603911744. Researcher ID (WOS): C-7943-2012. ORCID: 0000-0003-1526-9013.

ВКЛАД АВТОРОВ

Эрдынеева Даяна Батовна: составление черновика рукописи, поиск и анализ публикаций по теме обзора.

Бабышкина Наталия Николаевна: разработка концепции обзора, написание текста рукописи, окончательное утверждение рукописи.

Дронова Татьяна Анатольевна: поиск и анализ публикаций по теме обзора, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи.

Вторушин Сергей Владимирович: разработка концепции обзора, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи.

Слонимская Елена Михайловна: разработка концепции обзора.

Стегний Владимир Николаевич: разработка концепции обзора.

Чердынцева Надежда Викторовна: разработка концепции обзора.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-29-06037 офи_м «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Daiana B. Erdyneeva, Student, Medical Biology Faculty, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: daya-na@mail.ru.

Nataliya N. Babyshkina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nbabyshkina@mail.ru. Author ID (Scopus): 26641099700. Researcher ID (WOS): A-7526-2012. ORCID: 0000-0002-0562-3878.

Tatyana A. Dronova, MD, Postgraduate, Institute of Biology, National Research Tomsk State University; Junior Researcher, Laboratory of Tumor Biology Progression, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Author ID (Scopus): 6602971247. Researcher ID (WOS): R-5952-2016. ORCID: 0000-0003-3009-2404

Sergey V. Vtorushin, MD, DSc, Professor, Head of the Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Author ID (Scopus): 26654562300. Researcher ID (WOS): S-3789-2016. ORCID: 0000-0002-1195-4008.

Elena M. Slonimskaya, MD, DSc, Professor of the Oncology Department, St Petersburg University (St Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 6603658443. Researcher ID (WOS): C-7405-2012. ORCID: 0000-0003-4382-5697.

Vladimir N. Stegnyy, DSc, Professor, Head of the Department of Ecology, Genetics and Environmental Protection National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). Author ID (Scopus): 57207471480. Researcher ID (WOS): N-7656-2014

Nadejda V. Cherdyntseva, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Author ID (Scopus): 6603911744. Researcher ID (WOS): C-7943-2012. ORCID: 0000-0003-1526-9013.

AUHOR CONTRIBUTION

Daiana B. Erdyneeva: drafting of the manuscript, literature rewire.

Nataliya N. Babyshkina: study conception, writing of the manuscript, final approval of the version of the manuscript for publication.

Tatyana A. Dronova: literature rewire, critical revision for the important intellectual content.

Sergey V. Vtorushin: study conception, verification of the critically important intellectual content of the manuscript.

Elena M. Slonimskaya: study conception.

Vladimir N. Stegnyy: study conception.

Nadejda V. Cherdyntseva: study conception.

Funding

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant № 17-29-06037 «Genomic regulation of the breast cancer progression during chemotherapy».

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.