

На правах рукописи



Дерябина Ольга Николаевна

**Пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в
коренной популяции жителей Республики Мордовия
(экспериментально-морфологическое и
молекулярно-генетическое исследование)**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.3.2. Патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

Демура Татьяна Александровна

Официальные оппоненты:

Шимановский Николай Львович – член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева, заведующий кафедрой

Покровский Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», кафедра фармакологии и клинической фармакологии, заведующий кафедрой

Андреева Юлия Юрьевна – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, профессор

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «25» апреля 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.20 на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования (ЗНО) занимают лидирующее положение в структуре причин смерти на планете. По данным ВОЗ, в 2015 году было зарегистрировано 8,8 млн. смертей от ЗНО, и, в соответствии со сформировавшимися закономерностями, к 2030 году ожидается рост показателя до 1,3 млн. случаев, при этом на долю развивающихся и бедных стран приходится до 70% всей онкологической смертности [Ferlay et al., 2015].

Рак молочной железы (РМЖ) находится на втором месте в структуре онкологической заболеваемости и поражает четверть женщин со ЗНО. Показатель заболеваемости РМЖ в женской популяции в мире колеблется между 27 на 100 тыс. человек женской популяции в Центральной Африке и Восточной Азии до 92 на 100 тыс. женщин в Северной Америке. В то же время смертность от заболевания существенно ниже в развитых странах, где наблюдается высокая выживаемость пациенток с этим заболеванием [WHO, 2017].

Тройной негативный (трижды-негативный, ТН) РМЖ представляет собой агрессивную форму заболевания с высокой частотой метастазирования и рецидивирования, известен крайне гетерогенным ответом на стандартную химиотерапию, при этом почти 50% впервые диагностированных неоплазий имеют неполный ответ на неоадьювантную химиотерапию. Вследствие потери клетками опухоли эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, а также отсутствия экспрессии человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2), эффективная терапия предполагает применение наиболее эффективных таргетных лекарственных препаратов [Foulkes et al., 2010; Howlader, 2014]. До 30-40% пациентов, находящихся на адьювантной химиотерапии с остаточной опухолью, имеют плохой прогноз с 40-80% риском рецидива и смерти в течение 2-3 лет после установления диагноза [Carey, 2017; Leitke, 2018; Minckewitz et al., 2019].

Несмотря на значительные достижения в области противоопухолевой фармакологии, химиотерапия, включающая различные комбинации лекарственных средств, повреждающих ДНК опухолевых клеток (антрациклиновые антибиотики, препараты платины, алкалоиды) и ингибиторы митоза (таксаны) остаются средствами выбора при первичном ТН РМЖ [Bianchini et al., 2016; Leitke, 2018; Minckewitz et al., 2019; O’Rielly et al., 2015]. У пациенток с прогрессией заболевания химиорезистентность формируется практически во всех случаях в течение нескольких месяцев. В настоящее время в мире нет ни одного зарегистрированного низкомолекулярного таргетного препарата, показавшего высокую эффективность и безопасность в терапии ТН РМЖ [Seashore et al., 2019].

Описанные обстоятельства диктуют необходимость разработки персонализированной стратегии в отношении каждого случая ТН РМЖ. Однако, в силу экономических обстоятельств научно-клиническое сообщество разрабатывает и изучает потенциал унифицированных скрининговых технологий, позволяющих проводить лабораторный скрининг чувствительности / резистентности клеток конкретной опухоли к отдельным лекарственным препаратам или их комбинациям. К таким технологиям относится лабораторный скрининг в культурах опухолевых клеток человека, применение высокопроизводительного секвенирования с определением экспрессии генов интереса и их мутаций, использование технологий создания гуманизированных *in vivo* платформ с применением трансгенных животных [Ben-David et al. 2019; Echevierra et al., 2019; Garrido-Castro et al., 2019; Niyomnaitham et al., 2019].

Вместе с тем, научно-практическая проблема преодоления первичной и вторичной химиорезистентности ТН РМЖ далека от своего разрешения. Возможные подходы к ее решению могут быть рассмотрены с позиций иерархической кластеризации, в соответствие с которой определение возможных оптимальных путей решения должно базироваться на доказательствах, полученных в отдельных кластерах, одним из которых, в контексте настоящего исследования, может выступать отдельная этническая группа. В этой связи проведение представленной диссертационной работы является несомненно актуальным и своевременным.

Степень разработанности темы исследования

В нашей лаборатории в течение многих лет ведутся исследования в области молекулярной фармакологии и патологии злокачественных новообразований из эпителиальных тканей. В работах Е.В. Блиновой и соавт. (2018), М.О. Дудиной (2019), Сусловой И.Р. (2021) были представлены результаты доклинического экспериментального изучения одного из представителей класса производных пиридинкарбоновых кислот – соединения 4Н-аминохромена АХ-554. Для обоснования спектра противоопухолевой активности и механизма действия впервые в стране была разработана ксенографтная модель аденокарциномы легкого человека.

В дальнейшем, в рамках изучения частных закономерностей влияния ингибиторов иммунных чекпойнтов на течение опухолевого процесса и ответ опухоли на терапию нами была разработана *in vivo* биологическая платформа ксенографтного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря различных молекулярных типов, определяемых по уровню экспрессии GATA3 и CRT5/6. Исследования в этом направлении позволили нам установить особенности опухолевого роста и потенциал химиорезистентности, ассоциированный с экспрессией маркера p53, гена *FGFR3* и ряда нерегуляторных микроРНК [Blinova et al., 2020; 2021], что составило значительный фундаментальный и прикладной задел для настоящего исследования.

Цель работы

На основании комплексного эпидемиологического, экспериментально-фармакологического и молекулярно-морфологического исследования обосновать перспективные направления преодоления химиорезистентности трижды-негативного рака молочной железы на примере коренной популяции Республики Мордовия.

Задачи исследования

1. Дать фармакоэпидемиологическую, фармакоэкономическую, патоморфологическую и молекулярно-генетическую характеристику рака молочной железы в Республике Мордовия на основе комплексного анализа структуры затрат на оказание медицинской помощи пациентам, динамики медико-социальных показателей и исходов заболевания в регионе.

2. Установить значение основных механизмов – активации обратного транспорта молекул лекарственного вещества, экспрессии и мутаций гена *BRCA1* и экспрессии микроРНК-218 и микроРНК *Let-7* – в формировании первичной резистентности клеток тройного негативного рака молочной железы к доксорубцину, цисплатину, паклитакселу и эрлотинибу.

3. Провести скрининг острой токсичности при внутрижелудочном, внутрибрюшинном и внутривенном путях введения серии из восьми новых отечественных соединений – производных пиридинкарбоновых кислот.

4. Изучить спектр противоопухолевой активности в ряду производных пиридинкарбоновых кислот с оптимальными токсикологическими характеристиками в культурах клеток эпителиальных опухолей человека с определением средних подавляющих концентраций. Установить эффективные терапевтические дозы наиболее активных молекул на модели сингенной опухоли у мышей.

5. Определить противоопухолевый потенциал соединений ЛХТ-13-19, ЛХТ-17-19 и АХ-554 в культурах клеток тройного негативного рака молочной железы человека.

6. Установить вероятность и механизмы развития первичной и вторичной резистентности к веществам культуральными, фармакокинетическими и молекулярно-генетическими методами с применением инновационной биологической платформы органоидов тройного негативного рака молочной железы.

7. Провести молекулярный докинг 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипутандиоата (соединение ЛХТ-17-19) с использованием кристаллографических структур потенциальных мишеней – макромолекул, участвующих в канцерогенезе.

8. На специально разработанной персонализированной платформе ксенографтного тройного негативного рака молочной железы представительницы коренной нации Республики Мордовия у гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu* установить противоопухолевое и

антиметастатическое действие ЛХТ-17-19 как кандидата в антибластомное лекарственное средство.

9. Изучить взаимосвязь между развитием противоопухолевого эффекта и подавлением экспрессии маркера канцерогенеза – *EGFR*, а также экспрессии некоторых микроРНК, для соединения ЛХТ-17-19 на ксенографтной модели ТН РМЖ.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное молекулярно-фармакологическое и патоморфологическое обоснование пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в популяции коренного этноса Республики Мордовия на основе кандидата в новое таргетное противоопухолевое лекарственное средство оригинального отечественного соединения – производного пиридинкарбоновой кислоты. Актуальность научной проблемы впервые установлена при проведении медико-социального, патоморфологического, молекулярно-генетического, фармакоэпидемиологического и фармакоэкономического анализа рака молочной железы в регионе. Впервые установлено, что опухолевые клетки представительниц коренного этноса региона экспрессируют *EGFR* с большей частотой мутаций в указанном гене.

При проведении культурального и молекулярно-генетического исследования показано значение основных внутриклеточных механизмов – активации обратного транспорта молекул лекарственного вещества, экспрессии и мутаций гена *BRCA1*, экспрессии микроРНК-218 и микроРНК *Let-7* – в формировании первичной резистентности клеток тройного негативного рака молочной железы к средствам стандартной противоопухолевой терапии заболевания – доксорубину, цисплатину, паклитакселу и эрлотинибу.

При проведении количественного математического анализа «структура – активность» в ряду производных пиридинкарбоновых кислот показан высокий потенциал ряда молекул в качестве перспективных кандидатов для поиска противоопухолевой активности. При сравнительном токсикологическом исследовании впервые показано, что при внутрижелудочном и парентеральных (внутривенном и внутривенном) путях введения показатели LD_{50} и LD_{100} для восьми новых отечественных соединений – производных пиридинкарбоновых кислот – колеблются в диапазоне от 150 до 900 мг/кг, что в целом позволяет отнести серию соединений к умеренно токсичным или нетоксичным веществам.

В культурах клеток рака молочной железы, колоректального рака и рака мочевого пузыря человека впервые изучен спектр противоопухолевой активности в ряду производных пиридинкарбоновых кислот с оптимальными токсикологическими характеристиками. Установлены оптимальные подавляющие концентрации, составившие в культуре эстроген-зависимого РМЖ MCF-7 для соединения ЛХТ-13-19 – $3,8 \times 10^{-5}$ М и для соединения ЛХТ-17-19

– $1,6 \times 10^{-5}$ М. На модели сингенного лейкоза у мышей впервые установлены эффективные терапевтические дозы наиболее активных молекул: для соединения ЛХТ-13-19 – 18,9 мг/кг при внутривнутрибрюшинном введении и для соединения ЛХТ-17-19 – 8,8 мг/кг при том же способе введения.

Впервые доказано, что соединение N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (ЛХТ-13-19) неэффективно в отношении культуры ТН РМЖ, экспрессирующей VSCR, следовательно, вещество подвергается первичному обратному транспорту из клеток опухоли. С применением аналитической методики определения концентрации производного 4Н-хромена – N-ацетиламиноэтаната 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила (соединение ЛХТ-16-19 или альтернативный шифр – АХ-554) было установлено, что после трех раундов культивации органоидной культуры ТН РМЖ с соединением активируется механизм вторичной резистентности, связанный с эффлюксом молекулы из клетки. Доказано, что клетки ТН РМЖ первично высокочувствительны к соединению ЛХТ-17-19, вторичная резистентность формируется слабо и она не связана с обратным транспортом молекулы и гиперэкспрессией мутантного гена *BRCA1*.

При проведении экспериментов по молекулярному докингу 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипутандиоата (соединение ЛХТ-17-19) с использованием кристаллографических структур потенциальных мишеней – макромолекул, участвующих в канцерогенезе – впервые установлено, что наиболее выраженный аффинитет молекулы вещества наблюдается относительно киназы C-ab1, рецептора CSF1 и киназного центра EGFR.

Впервые разработана воспроизводимая платформа ксенографтного тройного негативного рака молочной железы представительницы коренной нации Республики Мордовия, пригодная для персонализированной трансляционной медицины и фундаментальных патоморфологических и фармакологических исследований. С использованием платформы у гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu* установлено противоопухолевое и антиметастатическое действие ЛХТ-17-19 как кандидата в антибластомное лекарственное средство. Впервые показана взаимосвязь между развитием противоопухолевого эффекта и подавлением экспрессии маркера канцерогенеза – *EGFR*, а также экспрессии некоторых микроРНК для соединения ЛХТ-17-19 на ксенографтной модели ТН РМЖ.

Личный вклад автора

Личный вклад О. Н. Дерябиной состоит в формировании концептуального ядра диссертационного исследования, выработке дизайна, плана работы, проверке актуальности и новизны избранной темы и ее соответствия фронтальному направлению развития современной мировой медицинской науки, в выборе необходимых и адекватных поставленным цели и задачам методов и способов выполнения фармакологического, патологоанатомического,

токсикологического, молекулярного, фармакокинетического, докингового культурального разделов работы, ведении базы данных и документов исследования, непосредственном и включенном участии в выполнении всех экспериментов и лабораторных исследований, обработке результатов работы, написании публикаций по теме диссертации, личном написании автореферата и рукописи работы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования позволяют расширить современные представления о популяционных, патоморфологических и фармако-эпидемиологических особенностях тройного негативного рака молочной железы в Российской Федерации.

Полученные экспериментальные результаты, раскрывающие важнейшие механизмы формирования первичной и вторичной фармакорезистентности опухолевых клеток ТН РМЖ к средствам стандартной терапии, после соответствующей клинической валидации могут транслироваться в практику.

Разработанная и валидированная биологическая платформа ксенографтного тройного негативного рака молочной железы, экспрессирующего EGFR, может быть широко применена как *in vivo* патоморфологический эквивалент канцерогенеза для изучения биологии опухолевого роста и прогрессии, а также в качестве модели при проведении трансляционных исследований в онкофармакологии.

Полученные результаты, касающиеся острой токсичности, особенностей реализации антибластомной активности ряда соединений пиридинкарбоновых кислот, расширяют современные представления об этой группе веществ и могут быть использованы в дальнейшем как для поиска новых перспективных молекул, так и для более углубленного изучения уже существующих соединений – кандидатов в лекарственные средства.

Методология и методы исследования

Для реализации цели и задач настоящего междисциплинарного исследования, выполненного на стыке фундаментальной фармакологии и молекулярной патологии, мы следовали принципам комплексности при сохранении единства научного замысла. При определении актуальности и современного состояния развития науки в исследуемой области применяли метод критического анализа библиографических данных. При планировании работы пользовались методами расчета и обоснования объема совокупностей, планирования и категоризации регистрируемых переменных, сообразно с чем были выбраны методы статистического анализа. В первом разделе работы использовали методы медико-социологического наблюдения и анализа. При определении механизмов формирования химиорезистентности применяли культуральный метод, аналитический метод определения концентрации действующего вещества в жидкой среде посредством высокоэффективной

газожидкостной хроматографии, секвенирования. Использовали методы фармакологического моделирования, аналитические методы программного прогнозирования структура – активность, метод молекулярного докинга, методы светооптической микроскопии, иммуногистохимии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фармакоэкономический анализ лечения пациенток – представительниц коренных этнических групп Республики Мордовия, страдающих раком молочной железы, выявил низкую экономическую эффективность терапии рецидивных форм и высоких стадий развития заболеваний вследствие нерационального применения лекарственных препаратов без учета молекулярного и иммунофенотипа опухоли.

2. В основе формирования первичной и вторичной резистентности к средствам стандартной противоопухолевой адъювантной и неадъювантной терапии заболевания лежат такие молекулярные механизмы как активация обратного транспорта молекул действующего вещества (в отношении доксорубина и паклитаксела), экспрессия гена *BRCA1* и функционально связанных генов (для препаратов платиновой группы), гиперэкспрессия регуляторной микроРНК Let-7.

3. Соединения пиридинкарбоновых кислот представляют собой большой класс умеренно-токсичных или нетоксичных веществ при внутрижелудочном и парентеральных путях введения, обладающих высоким противоопухолевым потенциалом в отношении клеточных линий эпителиальных злокачественных неоплазий человека и сингенных гемобластозов животных. Наиболее перспективным соединением по результатам количественного анализа «структура – активность», острого токсикологического исследования и комплексного изучения в условиях *in vitro*, в том числе на высокотехнологичной персонализированной трехмерной микромодеи органоидов ТН РМЖ человека, является 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипутандиоат.

4. У 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидрокси-бутандиоат (соединение ЛХТ-17-19) по результатам молекулярного докинга установлена высокая афинность и энергия связывания с каталитическим центром киназы EGFR; в экспериментах в культурах опухолевых клеток BT20 и MDA-MB-231, а также HCC1937/^{WT}BRCA1 доказано отсутствие первичной резистентности к соединению ТН РМЖ, обусловленной активацией обратного транспорта молекул, активацией экспрессии мутантного гена *BRCA1*.

5. Вследствие преобладания в структуре заболевания представительниц коренных этнических групп Республики Мордовия, страдающих раком молочной железы, протоковой карциномы трижды негативного молекулярного типа, с высокой экспрессией гена *EGFR* и высокой мутационной нагрузкой в указанном гене, разработана, воспроизведена в лабораторных условиях и валидирована персонализированная этноориентированная

ксенографтная патоморфологическая модель EGFR-экспрессирующего трижды-негативного рака молочной железы, пригодная для проведения трансляционных и фундаментальных исследований. В эксперименте на ксенографтной модели установлено, что 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипропаноат (соединение ЛХТ-17-19) подавляет опухолевый рост и прогрессию, обладает антиметастатическим эффектом, обусловленным подавлением клеточной экспрессии *EGFR*, следовательно, кандидат в лекарственное средство ЛХТ-17-19 может рассматриваться как возможный путь преодоления фармакорезистентности ТН РМЖ в исследуемой этнической популяции.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертационная работа «Пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в коренной популяции жителей Республики Мордовия (экспериментально-морфологическое и молекулярно-генетическое исследование)» соответствует Паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, областям исследования: п. 2 «Разработка и фармакологическая валидация экспериментальных моделей патологических состояний», п. 3 «Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*», п. 5 «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток», п. 18 «Фармакоэпидемиологические (ретроспективные и проспективные) исследования, включая изучение структуры назначения лекарственных средств при профилактике и лечении различных заболеваний»; Паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, областям исследования: п. 1 «Распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных патологоанатомических исследований клеток, тканей, органов и организма при использовании современных методических и технологических возможностей морфологии в сочетании с молекулярной биологией, молекулярной генетикой и эпигенетикой», п. 3 «Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность выводов и основных положений диссертационной работы подтверждается неукоснительным следованием принципам биомедицинской этики при

проведении исследований с участием человека, его биологического материала, человека, лабораторных животных; соблюдением требований к формированию экспериментальных групп, тщательно разработанным дизайном и статистическим планом работы; использованием современных международно признанных стандартов, методов и способов фармакологического, патологоанатомического, молекулярно-генетического, медико-социологического исследования; применением сертифицированных культур клеток и лабораторных животных, современного оборудования, расходных материалов и реактивов, лицензионного программного обеспечения и адекватных методов анализа и статистической обработки полученных данных.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном межучрежденческом расширенном заседании кафедр онкологии с курсом лучевой диагностики и лучевой терапии, фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, педиатрии, госпитальной терапии медицинского института ФГБУ ВО МГУ им. Н.П. Огарева», кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней и оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедры фундаментальной медицины ИФИБ ФГАОУ ВО НИЯУ МИФИ.

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертация подготовлена при частичной финансовой и методической поддержке Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (проект № 14.N08.11.084 «Доклинические исследования лекарственного средства, действующего на рецепторные тирозинкиназы ALK (киназа анапластической лимфомы) и Met, Бета-тубулин класс 3 (TUBB3), для лечения рака лёгких»), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3 «Разработка биологических *in vivo* платформ для изучения новых подходов к персонализированной терапии рака мочевого пузыря и немелкоклеточного рака легких».

Основные научные положения диссертационной работы используются в учебной работе кафедр клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования, Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), в учебной и исследовательской работе кафедры нормальной и патологической анатомии

Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева» (г. Саранск), внедрены в научно-исследовательскую работу отдела химии, технологии и аналитического контроля синтетических лекарственных средств АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области), Института биомедицины ФГАОУ ВО НИЯУ МИФИ (г. Москва).

Результаты настоящего диссертационного проекта обсуждались и докладывались на XXVI и XXVIII Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2019, 2020), конференции «Исследования молодых ученых в решении актуальных проблем медицинской науки и практики» (Самара, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2019), International Congress of Anatomy (London, 2019). Четвертый международный форум онкологии и радиологии (Москва, 2022).

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 23 научные работы, в том числе 7 научных статей в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук; 8 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer, 3 иные публикации по результатам исследования, 5 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура работы

Диссертационное исследование имеет традиционную структуру, состоит из введения, главы 1 (литературного обзора), главы 2 с описанием материалов и методов исследования, шести глав с изложением полученных результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций.

Работа изложена на 287 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 77 рисунками, 12 таблицами. Библиографический список состоит из 336 литературных источников, из которых 225 – иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», регламентирующими доклинические лабораторные исследования, основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными.

Дизайн исследования

Построение настоящего диссертационного проекта осуществлялось, с одной стороны, в соответствии с логикой выполнения доклинического экспериментального исследования, а, с другой, - было подчинено современным требованиям нормативно-правового и этического характера, предъявляемым к исследованиям с участием животных и с использованием человеческого биологического материала. Схема дизайна работы представлена на рисунке 1.

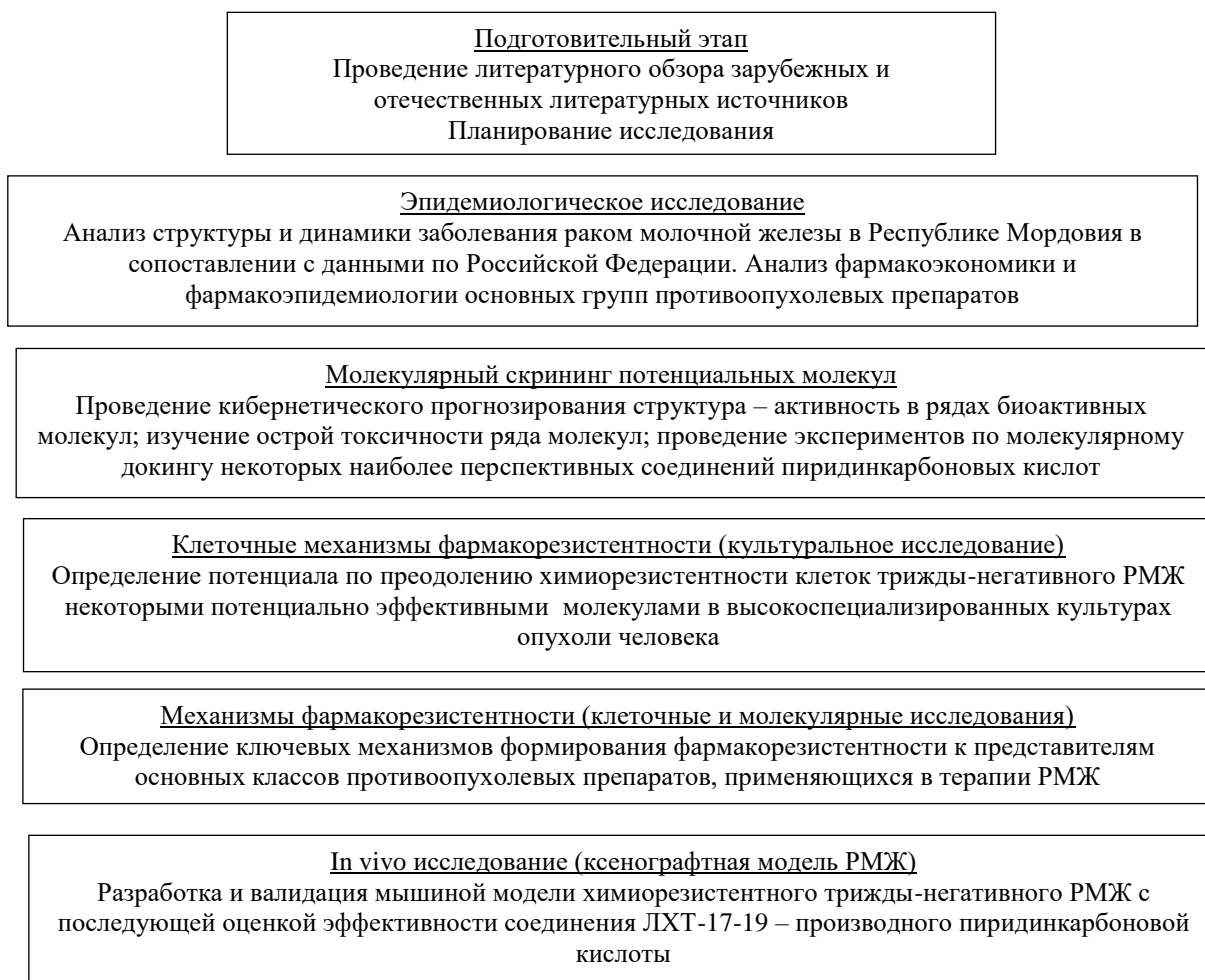


Рисунок 1 - Схематизированный дизайн исследования

Первый этап исследования – эпидемиологическое наблюдение. Методом сплошного наблюдения был проведен ретроспективный анализ базы данных 584 медицинских карт стационарного больного пациенток с раком молочной железы, обращавшихся за медицинской помощью в Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республики Мордовия «Мордовский республиканский онкологический диспансер» за период времени с 2010 по 2020 годы, а также ежегодные данные о результатах статистического наблюдения Росстата (открытые источники).

В рамках данного этапа была дана медико-социальная характеристика населения региона и эпидемиологическая картина РМЖ в Республике Мордовия. Были рассчитаны интенсивные коэффициенты, характеризующие клинические, патоморфологические, молекулярно-генетические, интервенционные, химиотерапевтические особенности патологии, а также в структуре сопутствующей заболеваемости у данной категории пациенток, проанализирована структура исходов применения хирургических, лучевых, химиотерапевтических и комбинированных методов лечения в зависимости от основной онкологической патологии. Для решения поставленных в работе задач на 1 этапе были выделены следующие исследовательские приоритеты: 1) Оценка медико-демографических закономерностей развития региона за период с 2011 по 2020 годы. 2) Определение структуры, динамики онкологической заболеваемости в Республике Мордовия, структуры и динамики рака молочной железы в регионе в зависимости от этнической, клинической, морфологической характеристики пациентов. 3) Определение основных закономерностей фармакоэпидемиологии рака молочной железы в регионе в сравнении с данными по Российской Федерации, определение затрат на лечение основного заболевания с учетом стоимости групп лекарственных препаратов.

Для получения корректных результатов и выполнения одного из фундаментальных принципов математической логики – принципа сравнения сравнимого, при составлении групп учитывали этническую и возрастную характеристику всех клинических групп.

Реализация мероприятий исследования на втором – молекулярно-фармакологическом и экспериментально-патологоанатомическом этапе – включала прогностический, скрининговый, *in vitro* и *in vivo* разделы.

Фармакологические вещества, изученные в работе

В работе на различных этапах ее проведения изучили особенности фармакологической активности и механизма действия соединений – производных пиридинкарбоновых кислот и 2-аминохромена, синтезированных в отделе химии, технологии лекарственных средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (Россия). В таблице 1 представлена краткая характеристика соединений – производных пиридинкарбоновых кислот. В качестве препаратов сравнения использовали доксорубицин, цисплатин, эрлотиниб, паклитаксел. Все вещества были изучены в виде чистых субстанций, производства Merck Sigma-Aldrich (Германия). При выборе доз исследуемых веществ и препаратов сравнения руководствовались международными документами по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Руководством по доклиническому изучению лекарственных средств, результатами проведения экспериментов по изучению острой токсичности исследуемых соединений и литературными данными о токсичности препаратов сравнения [Гуськова, 2008; Арзамасцев и соавт., 2012].

Таблица 1 - Краткая характеристика производных пиридинкарбоновых кислот, изученных в работе

№ п/п	Шифр соединения	pH, растворимость	Молекулярный вес	Химическая структура
1.	ЛХТ-5-16	8,5 Растворим в воде	301,33	5-этил-3-гидрокси-6-метил пиридиния 2,6-диаминогексаноат
2.	ЛХТ-5-18	7,0 Растворим в воде	524,97	бис-(N-2-амино-этансульфоноат магния) дипропил-2-этанамид
3.	ЛХТ-13-19	6,5 Мало растворим в воде, суспензия в твине 80	213,24	3-пиридинкарбамид 2-амино-5 метилпиридин
4.	ЛХТ-14-19	6,0 Мало растворим в воде, суспензия в твине 80	659,34	3-(N-ацетил-6-аминогексаноат) церия
5.	ЛХТ-15-19	6,0 Мало растворим в воде, суспензия в твине 80	315,26	5-метил-2,4(1H,3H)-пиридиндиона N-ацетилпентанодиоат
6.	ЛХТ-16-19 (АХ-554)	6,5 Мало растворим в воде, суспензия в твине 80	667,41	2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо [d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрил 4-нитробенз-амидо-2-аминоэтансульфоновой кислоты
7.	ЛХТ-17-19	6,5 Мало растворим в воде, суспензия в твине 80	374,38	9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипентандиоата
8.	ЛХТ-18-19	6,5 Растворим в воде	275,49	дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,O цинка

Лабораторные животные и клеточные культуры

В работе использовали 200 самок потомства первой линии (F1) линейных мышей DBA₂ × C57Bl/6j 4-6 недель, а также 46 самок 4-6 недельных мышей BALB/c *nu/nu*, приобретенных в специализированном питомнике животных «Пушино» – филиале ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков Шемякина и Овчинникова Российской академии наук. Для проведения токсикологического эксперимента использовали беспородных белых мышей обоего пола весом 18-22 г, полученных в питомнике «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались или в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) или в учебном виварии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» в строгом соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Лабораторные животные находились в естественном световом режиме в

полипропиленовых клетках, снабженных устройствами для питья и кормления при стандартных показателях влажности и температуры воздуха. Для подстилки использовалась стружка деревьев лиственных пород, для кормления – гранулированный корм производства АО «Лабораторкорм» (Москва). Гуманизированные животные содержались в изолированных клетках с системой индивидуальной вентиляции Центра биомедицинских исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), получали стерильную питьевую воду и стерильный корм.

Для изучения механизмов фармакорезистентности и определения роли обратного транспорта молекул противоопухолевых препаратов – цисплатина, доксорубицина, паклитаксела и эрлотиниба, а также исследуемых соединений использовали две клеточные линии трижды-негативного РМЖ человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (НТВ-26), АТСС, США) и не экспрессирующую протеин обратного транспорта рака молочной железы VCRP (BT20, АТСС, США), чувствительную ко всем описанным выше веществам.

Для проведения скрининговых исследований соединений пиридинкарбоновых кислот использовали три культуры человеческих эпителиальных опухолей – культуру рака толстого кишечника HT29, культуру рака инвазивного рака мочевого пузыря EJ и клеточную культуру эстроген-чувствительного рака молочной железы MCF-7. Все клеточные культуры были получены нами из коллекции опухолевых культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточные культуры культивировали в среде ДМЕМ с прибавлением 2 мМ глутамина и 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием углекислого газа при температуре 37⁰С. Первоначально клетки каждой опухолевой линии рассеивались в количестве 8×10^3 штук на лунку в 96-ячеечный планшет. Фармакологическое воздействие на культуру проводили в экспоненциальной фазе роста клеток. Для этого водные растворы соединений (в ряде случаев содержащие диметилсульфоксид) добавляли в среду культивирования спустя 24 часа после начала культивации в эффективной противоопухолевой концентрации. Вещество в каждой изученной концентрации вносили в 5 лунок. Культуры инкубировали в CO₂-инкубаторе в затемненных условиях в течение 24 часов. Оценку выживаемости клеток проводили с помощью колориметрического теста с трифенилтетразолия хлоридом (МТТ-тест).

Метод определения острой токсичности

При изучении токсичности при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении фиксированные дозы каждого соединения вводились группе из не менее 5 и не более 7 животных либо внутрижелудочно в 2% крахмальном клейстере в объеме не более 0,7 мл при помощи специальной иглы для кормления (World Precision Instruments), либо внутрибрюшинно

стерильным шприцем в растворе в объеме, не превышающем 0,5 мл, соответственно. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток. Рассчитывался показатель ЛД₅₀ методом Личфилда-Уилкоксона. При определении острой токсичности при внутривенном введении соединение вводилось в вену хвоста животного, у которого регистрировали ЭКГ (Kent Scientific Inc., США). Количество подаваемого вещества регулировалось при помощи двухканального программируемого инфузomата (Kent Scientific Inc., США). Регистрировали дозу, вызывающую гибель животного. Рассчитывали показатель ЛД₁₀₀.

Методы молекулярного докинга

Для рецепторно-ориентированного гибкого докинга использовали пакет программ Autodock 4.2. Подготовка лигандов проводилась с помощью программы MGL Tools 1.5.6. Оптимизация лигандов проводилась с помощью программы Avogadro. Для проведения расчетов в программе Autodock 4.2. исходные форматы данных рецептора и лигандов конвертировались в специальный формат PDBQT. В качестве мишеней для докинга использовали активные центры макромолекул из Protein Data Bank киназы C-abl (PDB ID: 6NPE), дезоксицитидинкиназы (dCK) (PDB ID: 5MQT), рецептора CSF1 (PDB ID: 4R7I), рецептора EGFRK (PDB ID: 1M17), рецептора FOLR2 (PDB ID: 4KN2), домена 4-G-квадруплексной ДНК (PDB ID: 6KN4). Карты рецепторов готовили в программах MGL Tools и AutoGrid. С PDB файлов ID: 6NPE, 5MQT, 4R7I, 1M17, 4KN2, 6KN4 были удалены молекулы воды, ионы и лиганды.

Для докинга использовались следующие параметры: шаг поступательного движения равен 2 Å, коэффициент торсионной свободы 0,2983, толерантность кластера - 2 Å, внешняя энергия решетки - 1000, максимальная начальная энергия - 0, максимальное число попыток – 10000, количество структур в популяции - 150, максимальное число этапов оценки энергии - 2500000, максимальное число генераций - 27000, количество структур, переходящих в следующее поколение - 1, уровень генной мутации - 0,02, уровень кроссовера - 0,8, способ кроссовера – арифметический, α -Параметр распределения Гаусса - 0, β -параметр распределения Гаусса - 1. Визуальный анализ комплексов тестируемых молекул в активных сайтах пептидов проводили с помощью программы Discovery Studio Visualizer.

Методы экспериментального туморигенеза

Использовали три метода экспериментального туморигенеза: сингенную модель у мышей, ксенографтную модель у гуманизированных мышей и инновационную платформу – органоидную модель трижды-негативного рака молочной железы человека.

Для предварительного обоснования противоопухолевой активности у отобранных на скрининговом культуральном этапе нашего исследования соединений и определения диапазона терапевтических доз была выбрана модель сингенной опухоли мышей – лимфолейкоза P388 из

коллекции обособленного подразделения МНИОИ им. П.А. Герцена ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Для воспроизведения модели использовали самок потомства первой линии (F1) линейных мышей DBA₂ × C57Bl/6j, которым подкожно в область наружной поверхности верхней трети левого бедра вводили взвесь опухолевых клеток в количестве 1×10^6 клеток в среде.

Для формирования базовой ксенографтной модели воспользовались методом, описанным Powell с соавторами (2020) в нашей модификации. Образцы опухоли были получены при выполнении трепанобиопсии молочной железы пациенток – представительниц коренного этноса Республики Мордовия (мокша и эрзя) с рецидивом рака молочной железы в ГБУЗ РМ Республиканский клинический онкологический диспансер (г. Саранск) после получения добровольного информированного согласия каждого пациента на использование биологического материала в исследовательских целях. Для моделирования ксенографтного туморигенеза использовали 4-6 недельных самок иммунодефицитных мышей BALB/c *nu/nu*, полученных из специального питомника «Пушино» – филиала ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков Щемякина и Овчинникова Российской академии наук. В целях гуманизации каждое животное подвергалось однократному рентгеновскому облучению (в суммарной дозе 3,12 Гр), после чего внутрибрюшинно трансплантировались 1×10^6 лимфоцитов субпопуляции CD8⁺, полученных методом градиентного осаждения и последующего цитофлуориметрического подтверждения из пакетов с лейкоцитарной массой здоровых доноров. Через трое суток после трансплантации лимфоцитов подкожно в область проекции бедра слева производили инокуляцию фрагментов свежих образцов опухолевой ткани, механически размельченных до размера 0,5-1 мм³ в матрикеле. Для финальной инокуляции группе из 30 животных использовали опухолевую ткань третьей генерации.

Для изучения специфической активности наиболее перспективного соединения в ряду производных пиридинкарбоновых кислот использовали также трехмерную органоидную модель рака молочной железы человека, полученную из криобиблиотеки ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России¹. Наблюдение за растущими органоидными структурами проводили на инвертированном микроскопе производства Carl Zeiss (Германия). Рекультивацию органоидов проводили каждые 2 недели.

Методы морфологического исследования

В рамках исследований на лабораторных животных, а также органоидных культурах опухоли человека проводили морфологическую валидацию опухолевых образцов согласно

¹ Автор выражает большую благодарность зав. лабораторией прикладной и фундаментальной фармакологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России А.И. Осипьянцу за предоставленную органоидную культуру и безмерную помощь при проведении экспериментов

стратификации «базальноподобного» или «небазальноподобного» тройного негативного рака молочной железы методом ИГХ (определение HER2, рецепторов эстрогенов, прогестерона, маркера Ki-67), а также определение приоритетного пути внутриклеточной сигнализации, особенно принимающего участие в экспрессии указанных выше рецепторов (HER2, рецепторов эстрогенов, прогестерона и андрогенов, маркера Ki-67) или формировании резистентности к лекарственным средствам. Биологический материал для проведения иммуногистохимического или молекулярно-генетического исследования получали либо при проведении пункционной биопсии, либо интраоперационно. Для морфологического исследования биоптаты затем фиксировали в 10% растворе забуференного формалина и доставляли в патологоанатомическую лабораторию. Весь первичный опухолевый материал, а также ткани опухоли на этапах перевивки ксенографтного трижды-негативного рака молочной железы изучали светооптическим методом при окрашивании гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили в автоматическом режиме на аппарате типа Karusel (Германия) в ступенчатых парафиновых срезах пероксидазно-антипероксидазным методом с демаскировкой антигенов в СВЧ-печи. Для визуализации реакций применяли универсальный пероксидазный набор LSAB+kit («Dako», США). Использовали кроличьи моноклональные антитела к человеческим рецепторам эстрогена, прогестерона, HER2 и Ki-67 (Dako, США). Криостатные срезы толщиной 4-5 мкм наносили на предметные стекла, предварительно обработанные адгезивной жидкостью (poly"L"lysine), затем депарафинировали и дегидрировали согласно принятым стандартам последующей тепловой индукцией (HIER) в восстанавливающем буфере на водяной бане при температуре 90–95 °C в течение 20–30 мин (с целью обновления структур антигенов перед иммуно-окраской). Дальнейший протокол исследования включал ингибирование эндогенной пероксидазы и трехэтапную иммуоферментную реакцию. На втором этапе – антитела, связывающие вторичные биотиновые мишени, затем – стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Активность пероксидазы определяли с помощью гистохимической реакции с диаминобензидином. Докрашивание препаратов (ядра) проводили рабочим раствором гематоксилина Маейра. Весь ход иммуногистохимического исследования контролировали экспозиционно после каждого этапа реакции. Оценку иммуногистохимической метки производили по двум параметрам: доля (%) позитивно окрашенных клеток и интенсивность окраски. Просмотр изображений проводили на микроскопе Olympus (Япония), снабженном цифровой фотокамерой. Анализ иммуногистохимических реакций осуществляли с использованием специальных морфометрических программ.

Молекулярно-генетические методы

Методы молекулярно-генетического исследования применяли для молекулярного профилирования опухолевых биологических систем, в частности, для определения уровня экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*), гена *BRCA1* и функционально-связанных генов, тканевой экспрессию некоторых микроРНК, в частности, микроРНК-200а, микроРНК-Let7 и микроРНК-145. Кроме того, определяли точечные мутации гена рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*) методами, применяемыми в нашей лаборатории и описанными ранее в диссертационных работах П.Н. Жданова (2021), М.Ю. Кудрявцева (2022) и Е.А. Самышиной (2022).

Для изоляции нуклеиновых кислот из свежих или замороженных образцов опухолевых тканей применяли специальный набор «All Prep DNA / RNA / miRNA Universal Kit» производства компании «Qiagen» (Германия). Измерение концентраций нуклеиновых кислот проводили с помощью флуориметра марки «Qubit 4» (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и диагностических наборов «Qubit RNA BR Assay» и «Qubit dsDNA HS Assay» того же производителя. С помощью лабораторного набора марки «MMLV RT» (Евроген, Россия) на протяжении 30 минут проводили реакцию обратной транскрипции при температуре 42⁰С. Комплементарную ДНК (кДНК), полученную при проведении реакции обратной транскрипции, разводили десятикратно и применяли в последующем для изучения уровня экспрессии РНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием амплификатора DTPPrime (DNA technology, Россия). Диагностические наборы «qPCRmix-HS SYBR» (Eurogen, Россия) применяли для детекции уровня экспрессии генов *EGFR*, *BRCA1* и гена *ACTB*

Реакционные продукты полимеразной цепной реакции подвергались очистке методом электрофореза в агарозном геле с применением специальной колонки марки «Cleanup Standard» производства компании «Eurogen» (Россия). Очищенные таким образом реакционные продукты проходили секвенирование по методу Sanger. Анализ сиквенсов (результаты секвенирования) проводили с использованием специального программного продукта «Chromas 2.6.6 software» производства «Technelysium» (Австралия).

Методы статистического анализа полученных данных

Результаты исследования представлены в виде количественных и качественных переменных. Характеристика количественных переменных включала среднюю величину, медиану, среднюю ошибку средней величины, среднеквадратическое отклонение; характеристика качественных переменных включала частоту развития события. Результаты, выраженные количественными величинами проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова или Шапиро-Уилка. При нормальном

распределении признака для сравнения двух групп использовали t-критерий Стьюдента, при сравнении более двух совокупностей – ANOVA с последующим применением критерия Тьюки или Ньюмена-Кейлса. При ненормальном распределении признака применяли критерий Манна-Уитни для сравнения двух совокупностей и критерий Крускала-Уолиса при сравнении более двух совокупностей. Сопоставление качественных признаков проводили с помощью точного критерия Фишера. Анализ выживаемости осуществляли при помощи построения кривых выживаемости Каплана-Майера с применением критерия log-rank теста при сравнении нескольких кривых выживаемости. В анализе использован пакет программ по статистике STATA (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для комплексного рассмотрения эпидемиологии рака молочной железы в популяции, населяющей Республику Мордовия, в первую очередь было необходимо провести детальный анализ параметров общественного здоровья, среди которых важнейшее место занимают медико-демографические показатели, наиболее полно отражающие диапазон воздействующих на популяционное здоровье факторов социально-экономического, политического, поведенческого, природно-климатического и экологического генеза, и в силу этого являются максимально адекватными измерителями народного благополучия. Проведенный анализ динамики демографических процессов в Республике Мордовия показал, что за последние годы демографическая ситуация характеризуется снижением численности населения республики, перераспределением численности городского и сельского населения с преобладанием удельного веса жителей городских поселений, снижением смертности. Естественная убыль населения также сокращается, но пока смертность превышает рождаемость [Дерябина и соавт., 2021].

На протяжении последних десяти лет в популяции, населяющей Республику Мордовия, наблюдаются положительная динамика как заболеваемости онкологическими болезнями, так и смертности от злокачественных новообразований, характеризующаяся неуклонным ростом интенсивных показателей. При этом, описанные негативные тенденции опережают средние показатели, регистрируемые по Российской Федерации в целом: в регионе первичная заболеваемость онкологическими болезнями выросла с 419,9 на 100 тыс. населения в 2011 году до 528,9 на 100 тыс. населения в 2020 году, при этом в Российской Федерации за этот же период отмечался рост показателя с 336,7 до 376,3 на 100 тыс. населения. Также наблюдается и значительное ускорение как темпов роста, так и прироста показателя за период с 2015 по 2020 годы [Дерябина и соавт., 2021]. Полученные результаты могут говорить о том, что при неизменном уровне общей заболеваемости онкологическими болезнями произошел

существенный рост первичной заболеваемости, свидетельствующий не столько о истинном росте случаев возникновения неоплазий, сколько об успехе мероприятий по выявлению злокачественных новообразований в популяции, в том числе за счет внедрения скрининговых программ, повышения качества и точности диагностики.

Мы также изучили динамику заболеваемости раком молочной железы в популяции Российской Федерации и Республики Мордовия: на фоне в целом несколько больших показателей уровня заболеваемости изучаемой патологией, коэффициенты, характеризующие динамику явления, соответствуют общероссийским закономерностям [Дерябина и соавт., 2021]. В национальной структуре среднегодовой выявляемости рака молочной железы преобладали представительницы русской национальной группы, на втором месте – представительницы мордовской национальной группы, на третьем месте – татарской группы. На долю представительниц прочих национальностей и народностей приходилось 13,9%, что соотносится с общей национальной структурой популяции Республики Мордовия [Дерябина и соавт., 2021]. В структуре патоморфологической формы рака молочной железы представительниц коренных национальных групп установлено следующее соотношение: на долю инвазивной неспецифированной (протоковой) карциномы приходится 8,7%, инвазивной лобулярной карциномы – 17%, инвазивной неспецифированной карциномы люминального В-типа Her(-) – 58,8%, инвазивной неспецифированной (протоковой) карциномы с медулярными чертами – 5,4%, медулярной карциномы – 2,8%, рака молочной железы с признаками воспаления – 15,5%. Показатели рассчитаны как усредненные за период с 2011 по 2020 годы (рисунок 2).

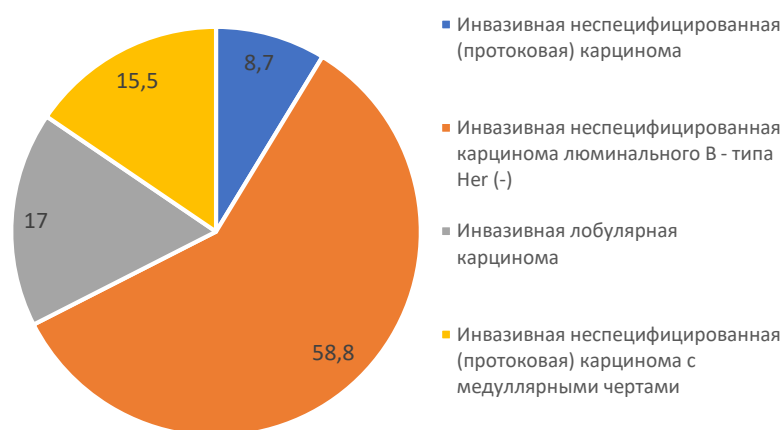


Рисунок 2 - Патоморфологическая структура выявляемого рака молочной железы (в виде среднегодовых показателей за период 2011-2020 гг.) в Республике Мордовия

Также мы проанализировали структуру затрат на лекарственное лечение рака молочной железы в зависимости от стадий и фармакологических групп лекарственных средств,

применяемых для терапии заболевания. В зависимости от стадии заболевания национальным регулятором предусмотрено использование 11, 14 и 14 фармакотерапевтических групп для лечения пациенток с I-II стадиями, с III и IV стадиями болезни соответственно. Группы представлены 47, 87 и 91 наименованиями лекарственных препаратов, что говорит о существенном расширении спектра в первую очередь противоопухолевых агентов при переходе от I-II к III и IV стадиям рака молочной железы [Дерябина и соавт., 2021].

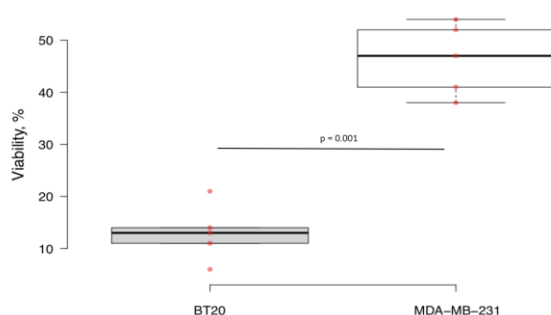
Полногеномное секвенирование образцов ТН РМЖ пациенток – жительниц региона за период с 2019 по 2022 годы продемонстрировало значимое преобладание умеренной и высокой экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста *EGFR* у представительниц коренных этносов с низкой мутационной нагрузкой.

Таким образом, проведенный анализ показал, что рак молочной железы является серьезной медико-социальной проблемой, а эффективное лечение заболевания требует проведения затратного лечения в условиях специализированного стационара, причем стоимость лекарственной терапии болезни существенно растет на запущенных стадиях. Указанные обстоятельства требуют дательной проработки вопроса чувствительности отдельных наиболее прогрессивных форм опухоли к цитостатическим / цитотоксическим лекарственным средствам и выработки путей преодоления фармакорезистентности в регионе.

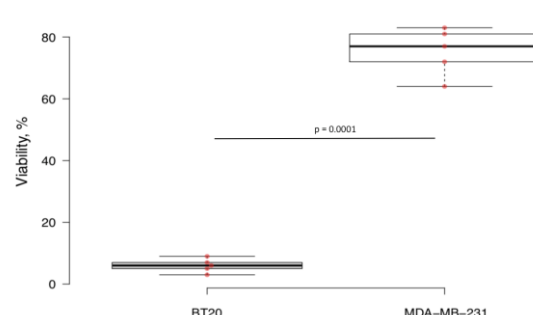
Понимание взаимосвязи между прогрессированием опухоли и химиорезистентностью в ответ на химиотерапию имеет важное значение для успешной разработки новых противоопухолевых терапевтических средств. В рамках второго этапа нашего исследования мы поставили перед собой задачу изучить некоторые механизмы формирования химиорезистентности клеток трижды-негативного РМЖ к представителям основных классов лекарственных веществ, применяющихся для лечения – адъювантной и неoadъювантной терапии заболевания в клинической практике: представителю препаратов платины – цисплатину, антрациклиновых антибиотиков – доксорубицину, алкалоидов – паклитакселу, таргетных препаратов – эрлотинибу (рисунок 3).

Для определения роли обратного транспорта молекул противоопухолевых препаратов – цисплатина, доксорубицина, тамоксифена и эрлотиниба использовали две клеточные линии трижды-негативного РМЖ человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (НТВ-26), АТСС, США) и не экспрессирующую протеин обратного транспорта рака молочной железы BCRP (BT20, АТСС, США), чувствительную ко всем описанным выше веществам. При анализе результатов тестирования мы установили, что сила цитотоксического действия исследуемых веществ на молекулярно-подобных культурах трижды-негативного РМЖ человека, имеющих различия, обусловленные экспрессией BCRP протеина, способствующего обратному транспорту молекул из опухолевой клетки, может быть расценена

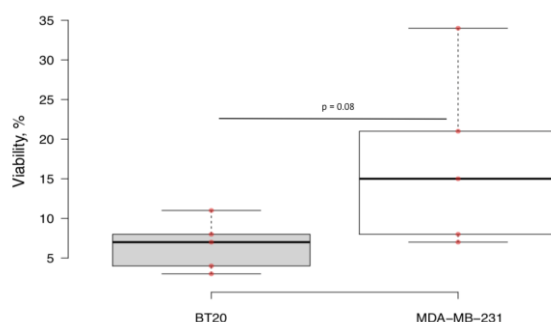
в аспекте возможного механизма резистентности опухоли. Так, нами показано, что резистентность к доксорубину и паклитакселу трижды-негативного РМЖ может быть обусловлена обратным VCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества.



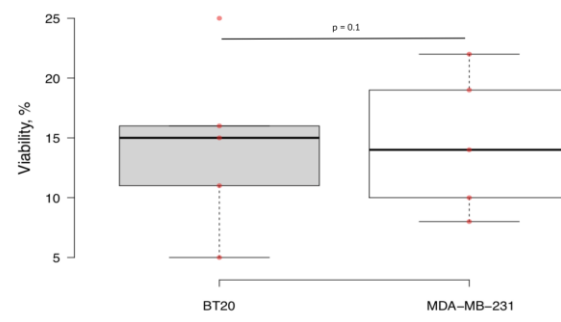
Доксорубин в концентрации 6,73 мкмоль/л



Паклитаксел в концентрации 4,27 мкмоль/л



Цисплатин в концентрации 4,7 мкмоль/л



Эрлотиниб в концентрации 2,67 мкмоль/л

Рисунок 3 - Зависимость цитотоксического действия ряда противоопухолевых средств в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231 (одномерный дисперсионный анализ и критерий t Стьюдента)

В многочисленных исследованиях было установлено, что мутации гена *BRCA1* встречаются в до 80% случаев химиорезистентного РМЖ и рака яичников [Pierfrancesco et al., 2009]. *BRCA1* взаимодействует как с активаторами, так и ингибиторами киназ, регулирующих клеточный цикл. Делеции в домене связывания *BRCA1* сопровождаются потерей этих взаимодействий и нарушениями в S и G₂ / M фазах клеточного цикла, что приводит к запуску клеточного цикла даже на фоне имеющегося повреждения клеточной ДНК [Silva et al., 2010]. Указанные особенности регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках могут быть источником их резистентности к химиопрепаратам, вызывающим повреждение ДНК, в частности, к препаратам платины.

Для проверки этой гипотезы в отношении цисплатина провели серию исследований на двух специально созданных культурах клеток рака молочной железы, воспроизводящих мутации в гене *BRCA1* и РМЖ с интактным геном *BRCA1*: HCC1937 (ATCC, США) и соответственно HCC1937/^{WT}BRCA1. Мы установили, что подавление роста опухолевых клеток в указанных культурах статистически значимо отличалось: если в культуре мутантной опухоли

по гену *BRCA1* наблюдали практически полное ингибирование роста, то в реконститутивном штамме культуры РМЖ HCC1937/^{WT}*BRCA1* было отмечено лишь частичное подавление роста опухолевых клеток.

Для доказательства роли гена *BRCA1* в формировании резистентности РМЖ к препаратам платины и молекулярного профилирования провели полногеномное секвенирование ДНК клеток культур, подвергшихся терапевтическому воздействию цисплатином. Мы установили, что между исследуемыми образцами установлены различия в экспрессии 172 генов. Мы также установили, что большее число генов, по литературным данным, участвующее в формировании химиорезистентности РМЖ к препаратам платины, модулируются геном *BRCA1*. В частности, мутантная линия РМЖ HCC1937 отличаются гиперэкспрессией *RAD52* и *XRCC4* мРНК, и подавлением экспрессии *ERCC1* и *RRM1* при сравнении с линией HCC1937/^{WT}*BRCA1*. Таким образом, на основании сопоставления цитотоксического действия цисплатина в специфических культурах РМЖ и проведения генетического профилирования клеток данных культур, подвергшихся химиотерапевтическому воздействию, мы установили, что мутации *BRCA1* и регулируемых генов ассоциированы с формированием химиорезистентности трижды-негативного РМЖ к препаратам платиновой группы (рисунок 4).

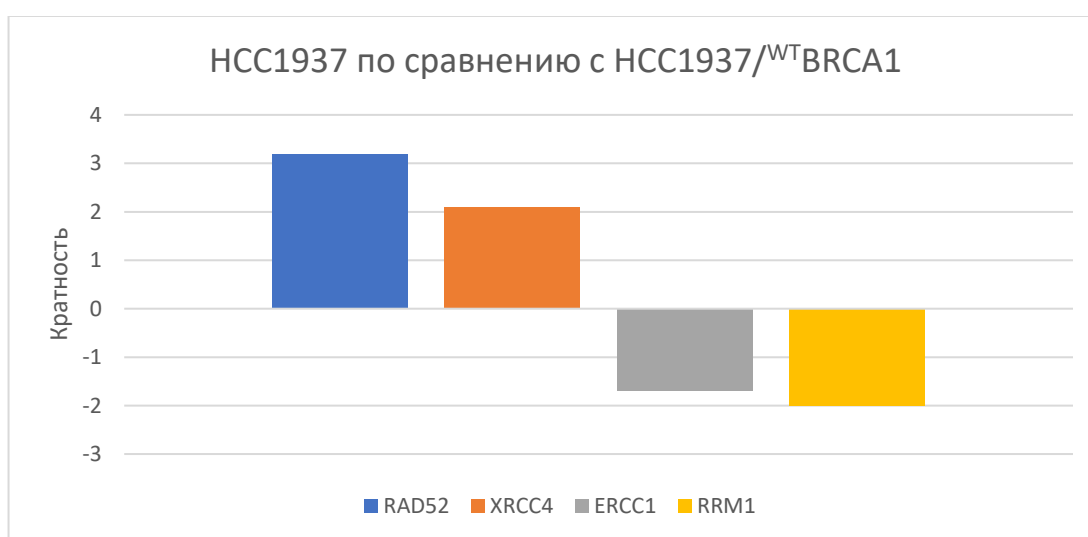


Рисунок 4 - Сравнительная экспрессия генов, регулируемых *BRCA1* и связанных с формированием резистентности к цисплатину, в культурах РМЖ HCC1937 и HCC1937/^{WT}*BRCA1*

В исследованиях последних лет было показано, что микроРНК играют значимую роль в формировании химиорезистентности клеток РМЖ к химиотерапевтическим воздействиям. Также в последнее время в литературе обсуждается возможность участия некоторых регуляторных микроРНК в формировании резистентности злокачественных опухолей к таргетному воздействию [He et al., 2015]. Для проверки данной гипотезы изучили экспрессию

опухолевыми клетками линии MDA-MB-231, с приобретенной резистентностью к эрлотинибу микроРНК-218 и микроРНК Let-7. Резистентность культуры трижды-негативного РМЖ MDA-MB-231 формировали последовательными сериями культивирования (12 серий) клеток в присутствии возрастающих концентраций эрлотиниба с селекцией выживших клеток после каждой серии инкубации.

Нами показано, что экспрессия микроРНК-218 не отличалась в клетках чувствительной к эрлотинибу (Native) и резистентной к эрлотинибу MDA-MB-231 (ER), следовательно, данный вид кодирующей микроРНК не был ассоциирован с формированием резистентности опухолевых клеток к таргетному препарату. Напротив, экспрессия микроРНК Let-7 в культуре трижды-негативного РМЖ MDA-MB-231, нечувствительной к эрлотинибу была значительно выше таковой для культуры сравнения. Таким образом, можно заключить, что в формировании резистентности трижды-негативного РМЖ к таргетному препарату эрлотинибу задействован микроРНК Let-7 опосредованный сигнальный путь.

Подводя итог описанному разделу работы, можно с уверенностью утверждать, что в формировании химиорезистентности трижды-негативного РМЖ могут быть задействованы различные механизмы. В частности, мы установили, что нечувствительность опухолевых клеток к антрациклиновому антибиотику доксорубину и алкилирующему агенту паклитакселу обусловлена активацией обратного транспорта действующего вещества. Химиорезистентность к цисплатину – есть результат мутантной трансформации гена *BRCA1*, а к таргетному препарату эрлотинибу – связана с активацией микроРНК Let-7 опосредованного сигнального пути.

В настоящем исследовании, исходя из главной цели по разработке стратегии преодоления первичной и вторичной химиорезистентности рецидивной и метастатической трижды негативной карциномы молочной железы, производные пиридинкарбоновых кислот могут выступать как потенциальная фармакотерапевтическая альтернатива для существующих в настоящее время подходов к консервативному лечению заболевания [Кудрявцев, 2022; Самышина, 2022].

В этой связи для нас чрезвычайный интерес представляла комплексная оценка токсикологического потенциала группы производных, синтезированных в лаборатории химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ». Исследование включало изучение острой токсичности производных при различных путях введения – внутривенном, внутрибрюшинном и пероральном их введении лабораторным мышам, а также анализ специфической цитотоксичности *in vitro* в культурах опухолевых клеток – сингенных (мышинных) и человеческих культурах карциномы молочной железы. Все исследуемые соединения – производные пиридинкарбоновых кислот по показателям

токсичности при внутривенном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении относятся к умеренно или малотоксичным соединениям (таблица 2). В зависимости от химической структуры и растворимости в воде или липидных эмульсиях, им присуща различная биодоступность при введении внутрь, что находит отражение на значениях показателя ЛД₅₀ при данном пути введения. Оптимальными по сочетанию показателей ЛД₅₀ при внутрижелудочном и внутривенном/внутрибрюшинном путях введения являются молекулы ЛХТ-17-19 (9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2Н)-он 2-гидроксисукцината), ЛХТ-15-19 (5-метил-2,4 (1Н,3Н)-пиридиндиона N-ацетилпентанодиоата) и вещества ЛХТ-13-19 (N-(5-метилпиридин-2-ил)-3- пиридинкарбоксамид). В соответствии с полученными данными, острая токсичность изученных соединений, представителей группы производных пиридинкарбоновых кислот варьирует в довольно широком диапазоне, не выходящем за пределы 3-4 классов по градации ГОСТ. Это говорит в целом о достаточной безопасности представителей класса.

Вместе с тем, соединения ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 наиболее токсичны. Оба вещества хорошо растворимы в липидных эмульсиях, что повышает их биодоступность при внутрижелудочном введении и дает основание предполагать возможность для обоих использование в том числе и этого пути введения в эксперименте на животных.

Токсикологический скрининг охватывает не только общую токсичность в отношении целостного организма и ряд аспектов специфической токсичности. Если речь идет о потенциальных противобластомных клетках, то закономерен интерес исследователя к вопросу о диапазоне токсического потенциала новых веществ, направленного на опухолевые клетки, поскольку в данном случае цитотоксичность рассматривается не в аспекте общетоксического действия, а с точки зрения возможностей реализации терапевтического потенциала. С этой целью в фармакологической науке и практике используются культуры человеческих опухолевых клеток, позволяющие определить эффективные подавляющие концентрации соединений.

С учетом полученных данных о растворимости производных пиридинкарбоновых кислот, для проведения культуральных исследований были отобраны следующие молекулы: ЛХТ-5-16, ЛХТ-13-19, ЛХТ-15-19, ЛХТ-17-19 и ЛХТ-18-19. В качестве *in vitro* моделей использовали три культуры человеческих эпителиальных опухолей – культуру рака толстого кишечника HT29, культуру рака инвазивного рака мочевого пузыря EJ и клеточную культуру эстроген-чувствительного рака молочной железы MCF-7. Соединения ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 продемонстрировали наибольший цитостатический потенциал при введении в меньших концентрациях, в связи с чем для последующего исследования на животной модели сингенной

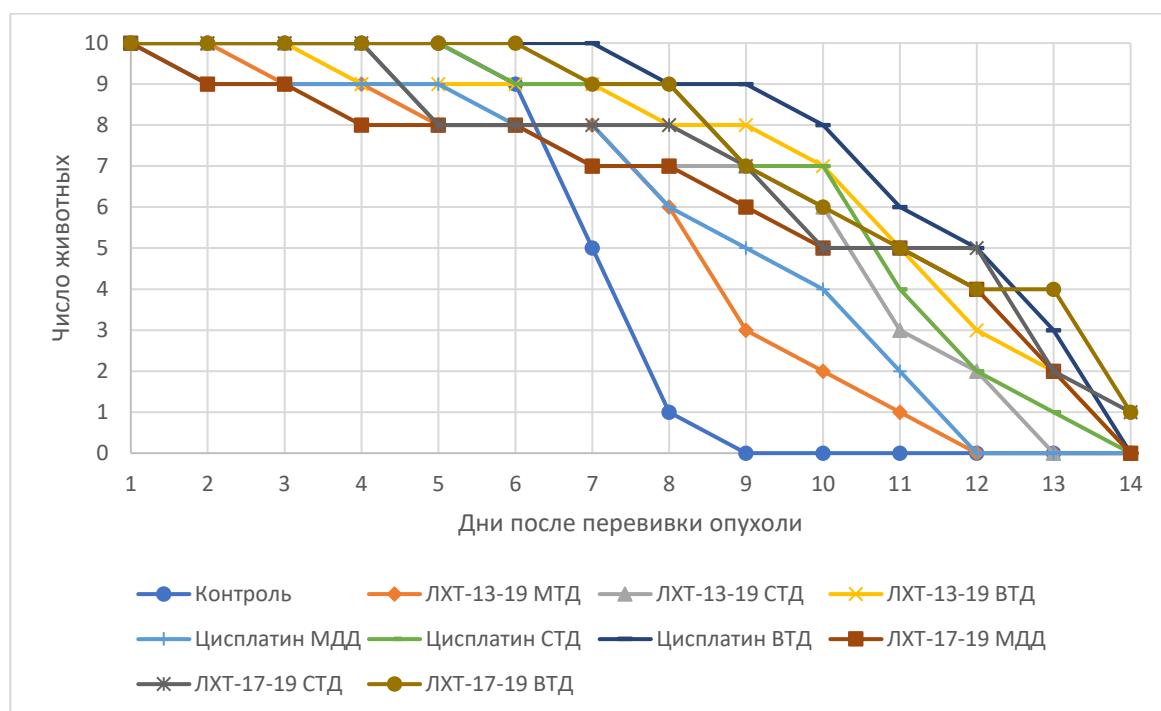
Таблица 2 - Острая токсичность производных пиридинкарбоновых кислот при внутрибрюшинном пути введения лабораторным мышам

№ п/п	Шифр	Химическая структура	n	ЛД ₅₀ / ЛД ₁₀₀ * М±m		СИ при 95%
1.	ЛХТ-5-16	5-этил-3-гидрокси-6-метилпиридиния 2,6-диаминогексаноат	65	в/б	785±21	[743÷827]
			80	в/ж	1024±24 ^B	[976÷1072]
			7	в/в	1378±17 ^A	[1334÷1412]
2.	ЛХТ-5-18	бис-(N-2-амино-этансульфоноат магния) дипропил-2-этанамида	70	в/б	674±37	[600÷748]
			65	в/ж	1257±32 ^B	[1193÷1321]
			12	в/в	994±20 ^A	[954÷1134]
3.	ЛХТ-13-19	3-пиридинкарбамид 2-амино-5 метилпиридин	45	в/б	146±6	[134÷158]
			55	в/ж	189±4 ^B	[181÷197]
			6	в/в	254±11 ^A	[232÷276]
4.	ЛХТ-14-19	3-(N-ацетил-6-аминогексаноат) церия	50	в/б	358±12	[344÷382]
			60	в/ж	1768±35 ^B	[1698÷1838]
			7	в/в	399±10 ^B	[379÷419]
5.	ЛХТ-15-19	5-метил-2,4(1H,3H)-пиридиндиона N-ацетилпентаноидиоата	55	в/б	584±13	[558÷610]
			55	в/ж	827±18 ^B	[791÷913]
			6	в/в	994±17 ^A	[960÷1028]
6.	ЛХТ-16-19	2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4H-хромен-3-карбонитрил 4-нитробенз-амидо-2-аминоэтансульфоновой к-ты	125	в/б	2564±38	[2488÷2644]
			75	в/ж	3585±35 ^B	[3515÷3655]
			8	в/в	2996±54 ^A	[2888÷3104]
7.	ЛХТ-17-19	9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипентандиоата	65	в/б	160±8	[144÷176]
			70	в/ж	176±10	[156÷196]
			7	в/в	207±11 ^A	[276÷319]
8.	ЛХТ-18-19	дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,O цинка	55	в/б	231±12	[206÷255]
			65	в/ж	354±16 ^B	[322÷386]
			6	в/в	424±12 ^A	[400÷448]

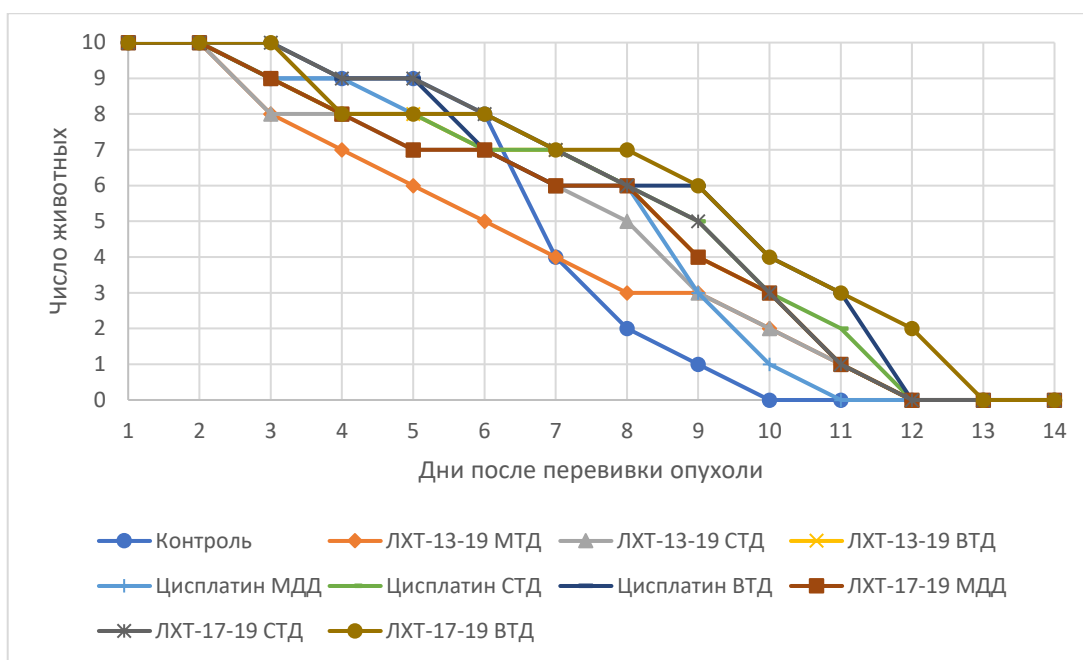
Примечания: * при внутривенном введении; ^A различия от показателя ЛД₅₀ при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении достоверны при p<0,05; ^B различия от показателя ЛД₅₀ при внутрижелудочном введении достоверны при p<0,05; ^B различия от показателя ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении и показателя ЛД₁₀₀ при внутривенном введении достоверны при p<0,05 (одномерный дисперсионный анализ, критерий Тьюки)

опухоли с целью определения противоопухолевого потенциала были отобраны именно эти вещества как наиболее перспективные – проявляющие активность в отношении широкого спектра клеточных линий человеческих опухолей, в том числе линии эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7.

Для предварительного обоснования противоопухолевой активности у отобранных на предыдущем этапе нашего исследования соединений, и определения диапазона терапевтических доз была выбрана модель сингенной опухоли мышей – лимфолейкоза Р388. В исследовании на мышах DBA₂ × C57Bl/6j с перевитым сингенным лимфолейкозом Р388 мы установили, что соединения N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамида (ЛХТ-13-19) и 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2H)-он 2-гидроксисукцината (ЛХТ-17-19) обладают выраженным противоопухолевым эффектом, сопоставимым с таковым препарата сравнения цисплатина. В частности, медиана выживаемости животных – носителей экспериментальной неоплазии превышала контрольные значения при внутривенном введении соединений пиридинкарбоновой кислоты в средне-терапевтической дозе, а при внутривенном введении – в высшей терапевтической дозе (рисунок 5).



А



Б

Рисунок 5 - Продолжительность жизни животных с лимфолейкозом Р388 мышей на фоне экспериментальной терапии некоторыми производными пиридинкарбоновых кислот (А – внутривенное, Б – внутрижелудочное введение)

Основной задачей, которая стояла перед нами при выполнении следующего этапа диссертационной работы, было изложение концепции и результатов *in vitro* исследования потенциальных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства в рамках альтернативной стратегии преодоления первичной и возникшей в результате предшествующего лечения (вторичной) химио- и таргетной резистентности субстрата трижды негативного рака молочной железы.

Сила цитотоксического действия исследуемых веществ на молекулярно-подобных культурах трижды-негативного РМЖ человека, имеющих различия, обусловленные экспрессией BCRP протеина, способствующего обратному транспорту молекул из опухолевой клетки, позволила выделить две потенциальные молекулы – кандидата и исключить одну молекулу, с точки зрения первичной резистентности опухоли.

Так, нами показано наличие первичной резистентности к веществу ЛХТ-13-17, и отсутствие резистентности трижды-негативного РМЖ к соединениям ЛХТ-17-19 и АХ-554, обусловленной обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества (рисунок 6). При этом, необходимо подчеркнуть, что на данном этапе работы мы не случайно включили соединение АХ-554 в линейку молекул – потенциальных кандидатов. Ранее нами было обосновано мощное противоопухолевое действие соединения на ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого, показаны некоторые механизмы действия вещества, в частности по подавлению синтеза тубулина-бета 3, активации апоптоза и аутофагии

опухолевых клеток, ингибированию активации ALK-зависимого сигнального пути [Самышина и соавт, 2019; Блинова и соавт., 2020].

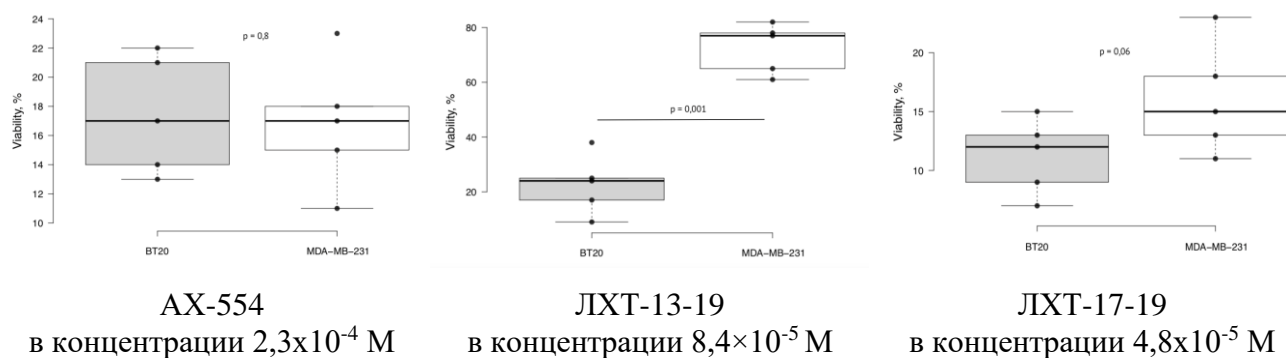
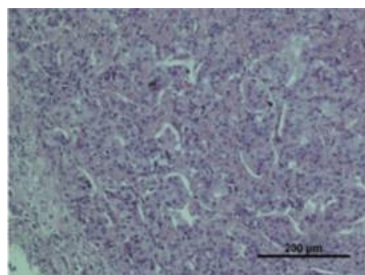
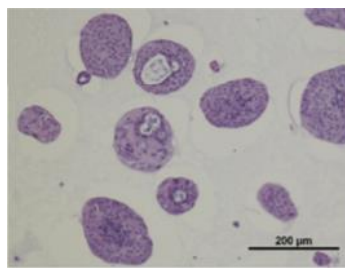


Рисунок 6 - Зависимость цитотоксического действия AX-554 в концентрации $2,3 \times 10^{-4}$ М в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – % выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием критерия Манна-Уитни

Одним из методов изучения обратного транспорта молекул лекарственных веществ, описанных в доступной научной периодике, является метод сопоставления концентраций действующего вещества в среде культивирования до и после инкубации опухолевых клеток с исследуемым лекарственным соединением. В нашей работе для изучения этого механизма резистентности использовали трехмерную высокотехнологичную инновационную органоидную модель трижды-негативного рака молочной железы, любезно предоставленную нам учеными лаборатории прикладной и фундаментальной фармакологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Выбор органоидной модели был обусловлен тем, что она позволяет воспроизводить в режиме реального времени объемную структуру субстрата опухоли, происходящего либо из клеток одного клона, либо воспроизводящего все клональное разнообразие материнской неоплазии (рисунок 7). Также выбор метода был обусловлен тем, что ранее в нашей лаборатории была разработана аналитическая методика определения действующего вещества AX-554 в плазме крови [Самышина, 2022]. При этом, в процессе формирования вторичной резистентности клеток трижды-негативного РМЖ к AX-554 происходит активация обратного транспорта молекул соединения, о чем свидетельствует рост концентрации вещества в среде культивирования после отмытки трехмерной культуры. В тех же экспериментальных условиях вторичная резистентность к LXT-17-19 хотя и формируется, но при этом не наблюдается эффлюкс молекул в среду, что говорит о том, что в данном случае могут быть задействованы иные механизмы, не связанные с обратным транспортом.

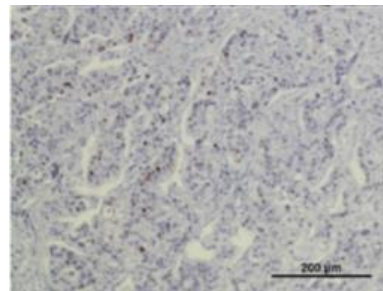
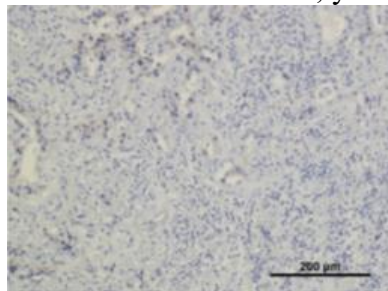
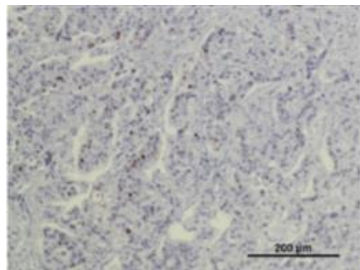


Субстрат опухоли

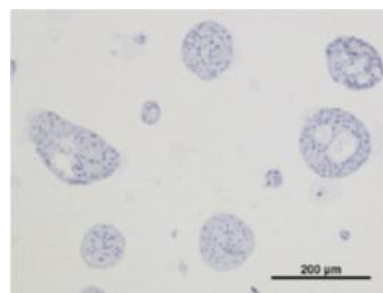
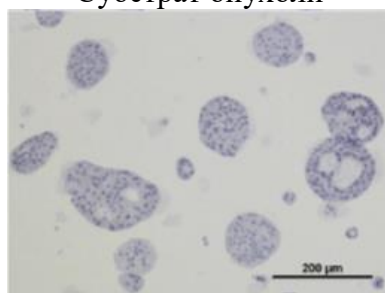
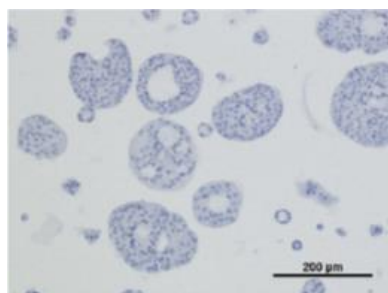


Органоидная культура

А. Гематоксилин и эозин, ув. 200



Субстрат опухоли



Органоидная культура

Б. Иммунофенотип, ув. 200

Рисунок 7- Гистологическая и иммунофенотипическая характеристика трехмерных органоидных конструкторов трижды негативного рака молочной железы и исходной опухоли: А – гематоксилином и эозин; Б – иммунофенотипирование с анти-эстрогеновыми, анти-прогестероновыми антителами и анти-Her2, ув. 200

Таким образом, на основании сопоставления цитотоксического действия соединения 4Н-аминохромена АХ-554, производных пиридинкарбоновых кислот ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 в специфических культурах РМЖ и проведения генетического профилирования клеток данных культур, подвергшихся химиотерапевтическому воздействию, мы установили существование первичной резистентности субстрата опухоли к соединению пиридина ЛХТ-13-19, основанной на активации обратного эффлюкса молекулы вещества вследствие активации механизма, обусловленного экспрессией BCRP протеина. Это послужило основанием для прекращения дальнейших исследований соединения как фармакологического источника преодоления фармакорезистентности.

При формировании вторичной резистентности органоидных культур к производному АХ-554 формируется вторичная резистентность клеток трижды-негативного рака молочной железы, что также связано с активацией обратного транспорта молекулы вещества. Данные

были получены на основе определения действующего вещества в среде культивирования опухоли после ее трехкратной отмывки. При этом, инкубация органоидной культуры РМЖ с соединением ЛХТ-17-19 хотя и приводила к селекции резистентных клеток, тем не менее не сопровождалась обратным транспортом молекул и не была связана с мутациями гена *BRCA1* и регулируемых генов, ассоциированных с формированием химиорезистентности трижды-негативного РМЖ.

Это позволяет рассматривать именно соединение ЛХТ-17-19 как наиболее перспективный кандидат в лекарственное средство и продолжить его изучение в опытах на ксенографтной модели опухоли у гуманизированных животных.

Для определения потенциальной мишени для воздействия соединения ЛХТ-17-19 совместно с к.м.н. М.Ю. Кудрявцевым и д.м.н. Е.А. Самышиной провели эксперименты по молекулярному докингу. В соответствии с данными кибернетического анализа был спрогнозирован перечень потенциальных макромолекул, к которым у вещества может быть высокое сродство.

Согласно полученным результатам докинговых исследований молекула ЛХТ-17-19 обладает выраженным аффинитетом к выбранным противоопухолевым мишеням. Все вычисленные значения превышают либо соответствуют значения для препаратов сравнения (иматиниб, эрлотиниб, пеметрексед, доксорубин). Наиболее выраженный аффинитет молекулы ЛХТ-17-19 наблюдается относительно киназы C-abl (PDB ID: 6NPE) со значениями Affinity DG -8.3 kcal/mol, EDoc -6.01 kcal/mol, Ki 39.14 uM; рецептора CSF1 (PDB ID: 4R7I) со значениями Affinity DG -8.20 kcal/mol, EDoc -5.51 kcal/mol, Ki 91.29 uM; рецептора EGFRK (PDB ID: 4KN2) со значениями Affinity DG -9.0 kcal/mol, EDoc -6.23 kcal/mol, Ki 27.27 uM. Следовательно, с учетом данных эпидемиологического исследования об экспрессии *EGFR* ТН РМЖ представителей коренной популяции Республики Мордовия, именно эта молекула может служить наиболее вероятной мишенью для фармакологического таргетирования (рисунок 8,9).

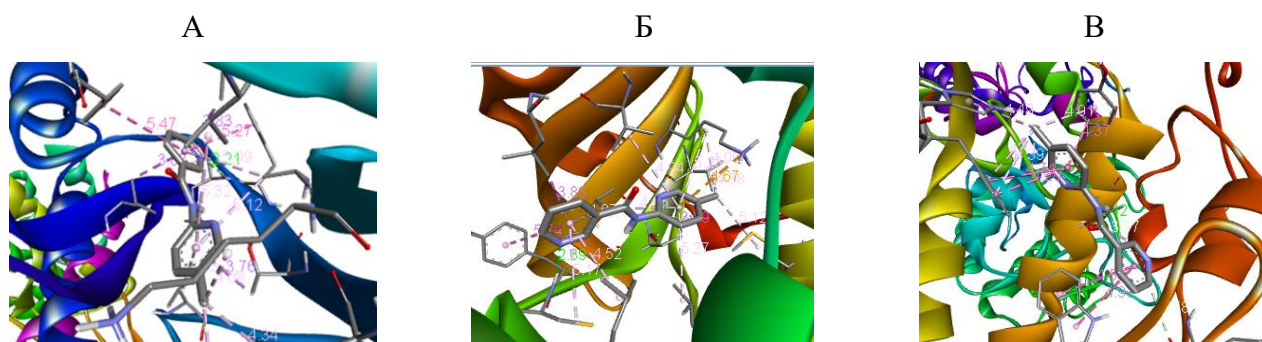


Рисунок 8 - Суперпозиция молекулы ЛХТ-17-19 в комплексе: А - с киназой C-abl (PDB ID: 6NPE), Б- с рецептором CSF1 (PDB ID: 4R7I), В - с рецептором фолатов человека EGFRK (PDB ID: 4KN2)

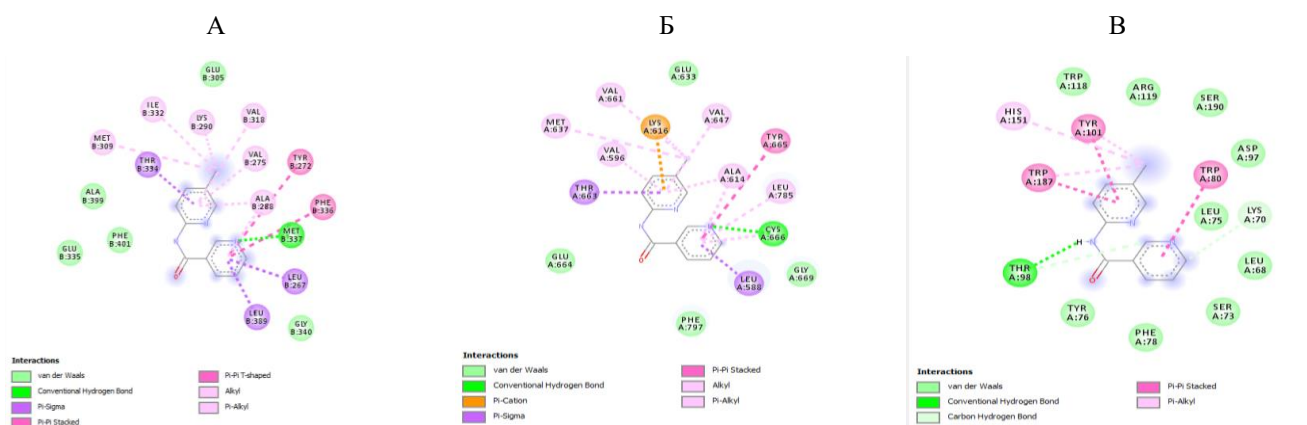


Рисунок 9 - Диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы ЛХТ-17-19 в комплексе с активными центрами: А - киназой C-abl (PDB ID: 6NPE), Б- CSF1 (PDB ID: 4R7I), В - EGFRK (PDB ID: 4KN2)

На предыдущих этапах нашего исследования мы установили, что производные пиридинкарбоновых кислот, и, в частности, соединение дигидроакридина ЛХТ-17-19 в экспериментах по молекулярному докингу продемонстрировало высокое ингибиторное сродство к активному сайту связывания EGFR; в культурах клеток трижды-негативного рака молочной железы инкубирование вещества с опухолевыми клетками выявило ряд особенностей, которые позволяют рассматривать молекулу в качестве кандидата для создания таргетного лекарственного средства. В этой связи на заключительном этапе нашей работы для подтверждения наших предположения, а также получения доказательств эффективности ЛХТ-17-19 мы провели исследование вещества при курсовом внутривенном введении на ксенографтной модели рецидивного трижды-негативного рака молочной железы представительницы коренного этноса Республики Мордовия.

Для получения объективных результатов ксенографтная модель требовала иммунофенотипической валидации. Для этого провели комплексное ИГХ сопоставление экспрессии молекулярных маркеров клетками донорской опухолевой ткани и ксенографтной опухоли (рисунок 10). «Материнский» и ксенографтный опухолевые образцы не экспрессировали эстрогеновые, прогестероновые рецепторы, человеческий эпидермальный фактор роста, но, при этом отличались высокой экспрессией фактора пролиферации Ki-67. В рамках молекулярно-генетического анализа установлена гиперэкспрессия *EGFR* с высокой идентичной мутационной нагрузкой, что подтверждало полное соответствие ксенографтного образца исходной донорской ткани.

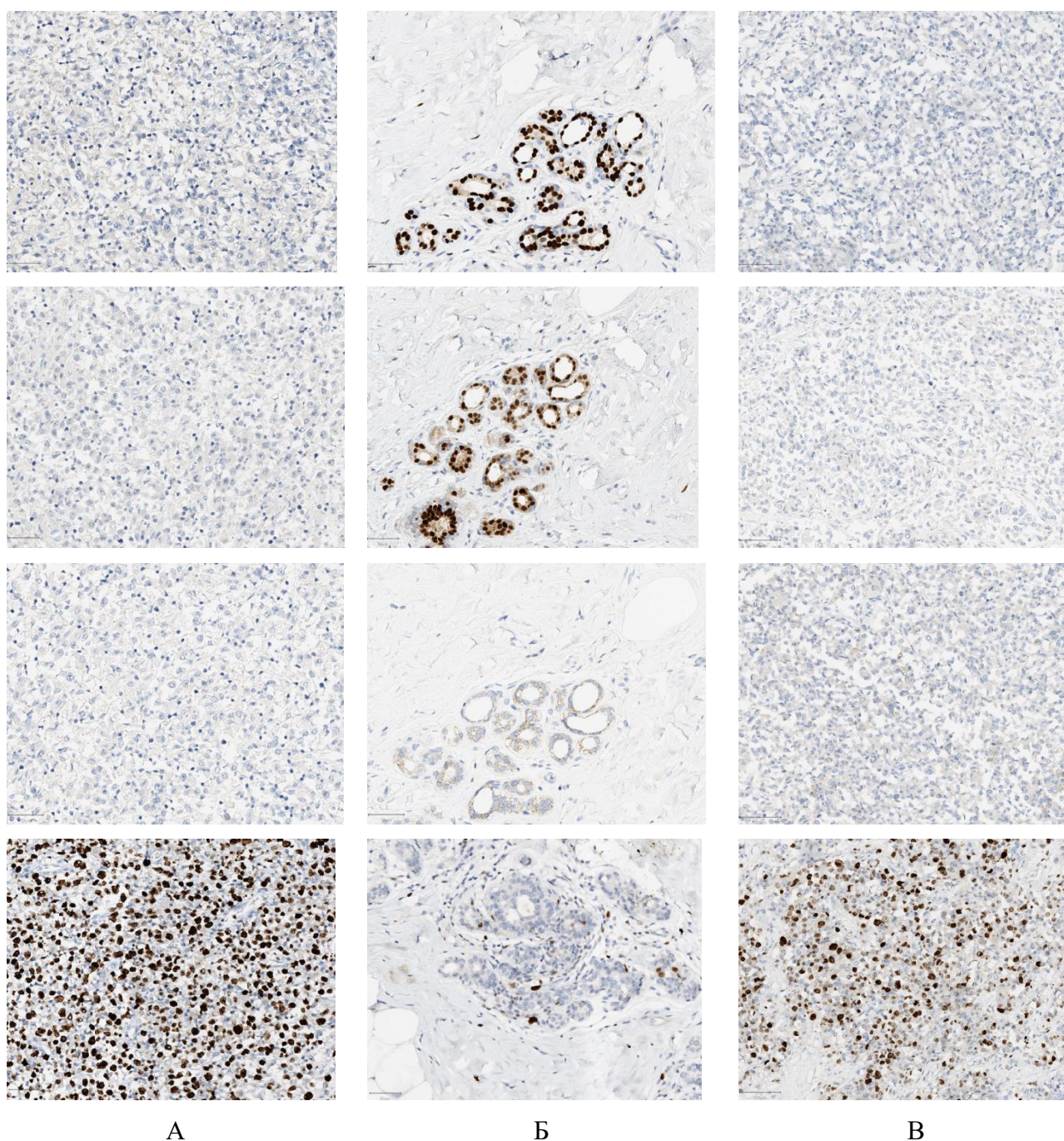
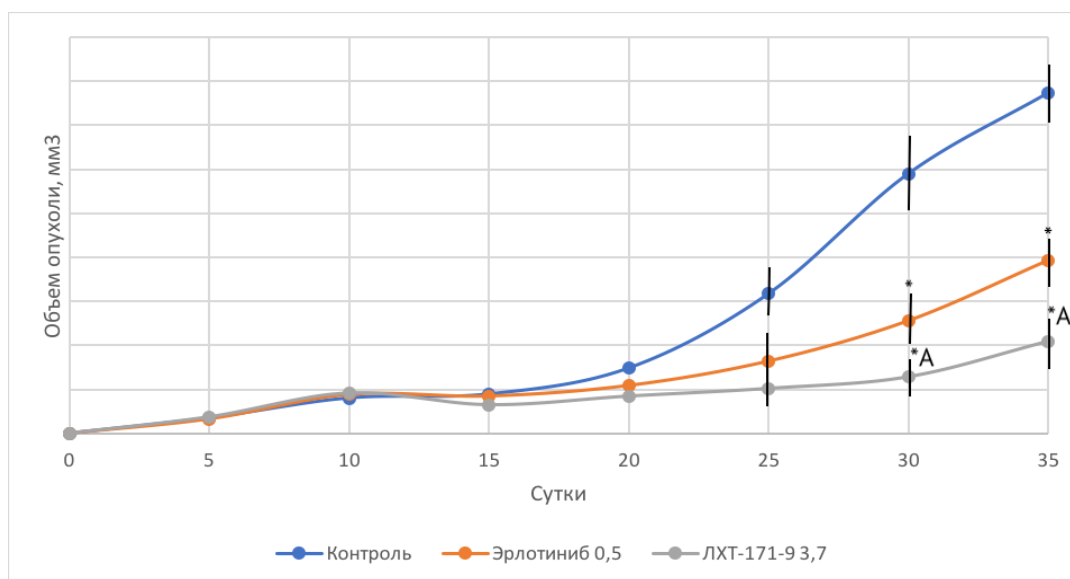


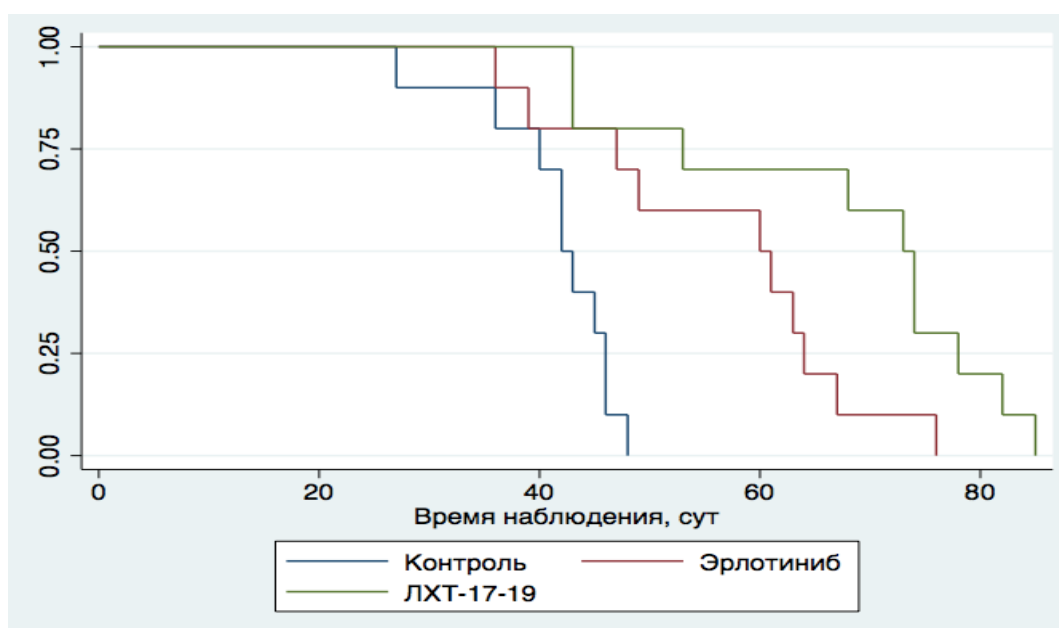
Рисунок 10 - Иммуногистохимическая характеристика образцов опухолей. Окрашивание с анти-ER1, анти-PR, анти-HER-2/neu и анти-Ki-67 антителами (снизу вверх): А – материнская опухоль, Б – положительный внешний контроль (потовые железы), В – ксенографтная опухоль, увеличение 200

На фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 мы установили, что противоопухолевый эффект в виде редукции опухолевого узла, подавления метастазирования сопровождается ростом выживаемости животных: медиана выживаемости мышей – носителей опухоли в контрольной группе без лечения составила в среднем 42 суток, в группе животных, получавших в качестве экспериментальной терапии таргетный препарат эрлотиниб – 60 суток, в группе животных с терапией ЛХТ-17-19 – 73 суток (рисунок 11). Полученные результаты

свидетельствуют о том, что таргетирование *EGFR*-зависимого сигнального пути в клетках ксенографтной опухоли может рассматриваться как эффективная стратегия повышения выживаемости.



А



Б

Рисунок 11 - Динамика объема опухолевого узла (А) ксенографтного рака молочной железы и выживаемость мышей (Б) BALB/c *nu/nu* мышей на фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 и препаратом сравнения. Значимость различий оценивали при помощи ANOVA с последующим межгрупповым анализом по Тьюки: * $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля без лечения; A $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля эрлотиниб ($n = 10$ в каждой экспериментальной группе)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, комплексное мультидисциплинарное изучение проблемы фармакорезистентности трижды-негативного рака молочной железы позволило сделать следующие обобщения: в коренной популяции Республики Мордовия наблюдается рост заболеваемости ТН РМЖ, при этом опухоль, представленная, как правило, протоковой карциномой, преимущественно экспрессирует *EGFR* с высоким уровнем мутационной нагрузки; в основе первичной химиорезистентности ТН РМЖ к стандартным препаратам неоадьювантной и адьювантной терапии лежат активация обратного транспорта молекул, мутации генов, кодирующих молекулы-мишени, а также изменения внутриклеточной сигнализации, опосредованные специфическими микроРНК.

Соединения пиридинкарбоновых кислот представляют собой перспективный класс соединений, обладающих высоким противоопухолевым потенциалом, наибольшее научно-практическое значение имеет соединение дигидроакридина с лабораторным шифром ЛХТ-17-19, продемонстрировавшее высокий цитостатический потенциал в опытах на двухмерных и трехмерных опухолевых культурах, при курсовом внутривентральном введении показало противоопухолевую активность на ксенографтной модели трижды-негативного рака молочной железы: подавляло рост опухолевого узла как при сравнении с контролем, так и с таргетным препаратом эрлотинибом, повышало выживаемость животных и ограничивало метастатический процесс. К соединению отсутствует первичная фармакорезистентность клеток ТН РМЖ, медленно формируется вторичная резистентность, не связанная с обратным транспортом молекулы из клеток, по силе сродства ЛХТ-17-19 к активному центру макромолекулы рецептора эпидермального фактора роста вещество превосходит таргетный препарат эрлотиниб. Следовательно, вещество может рассматриваться как кандидат в таргетный противоопухолевый препарат с высоким прогнозируемым потенциалом эффективности в отношении ТН РМЖ у представителей коренного этноса Республики Мордовия.

Практические рекомендации

1. Результаты исследования должны учитываться при анализе популяционных, патоморфологических и фармако-эпидемиологических особенностях трижды-негативного рака молочной железы в Российской Федерации.

2. Полученные экспериментальные результаты, раскрывающие важнейшие механизмы формирования первичной и вторичной фармакорезистентности опухолевых клеток ТН РМЖ к средствам стандартной терапии, после соответствующей клинической валидации могут транслироваться в онкологическую практику.

3. Разработанная и валидированная биологическая платформа ксенографтного трижды-негативного рака молочной железы, экспрессирующего EGFR, может быть широко применена как *in vivo* патоморфологический эквивалент канцерогенеза для изучения биологии опухолевого роста и прогрессии, а также в качестве модели при проведении трансляционных исследований в онкофармакологии.

4. Полученные результаты об острой токсичности, особенностях реализации антибластной активности ряда соединений пиридинкарбоновых кислот расширяет современные представления об этой группе веществ и может быть использована в дальнейшем как для поиска новых перспективных молекул, так и для более углубленного изучения уже существующих соединений – кандидатов в лекарственные средства.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в работе результаты открывают широкие горизонты для развития темы исследования как в области фундаментальной, так и клинической медицины. Данные о молекулярных механизмах формирования химиорезистентности клеток ТН РМЖ нуждаются в дальнейшей проверке на примере тех этнических групп, для которых заболевание представляет медико-социальную проблему. Также требуют продолжения исследования в области идентификации новых внутриклеточных сигнальных механизмов, вовлеченных в формирование нечувствительности опухолевых клеток к лекарственному воздействию, в том числе таргетному. Большую научную перспективу представляет использование в последующем научном поиске новых биологических платформ, впервые описанных в настоящей работе: органоидной и животной модели ТН РМЖ, для которых приведены детальные морфологические и молекулярные характеристики. Несомненную перспективу для проведения прикладных научных исследований представляют также описанные свойства новых молекул лекарственных веществ – производных пиридинкарбоновых кислот. В этом направлении возможно глубленное проведение доклинических исследований, разработка приемлемой лекарственной формы, аналитической методики определения действующего вещества в плазме крови, других биологических жидкостях и тканях.

ВЫВОДЫ

1. При проведении медико-социального, патоморфологического, молекулярно-генетического, фармакоэпидемиологического и фармакоэкономического анализа рака молочной железы в Республике Мордовия установлено, что опухолевые клетки представительниц коренного этноса региона экспрессируют *EGFR* с большей частотой мутаций в указанном гене.

2. При проведении культурального и молекулярно-генетического исследования показано, что в формировании первичной резистентности клеток трижды-негативного рака молочной железы к средства стандартной противоопухолевой терапии заболевания – доксорубицину, цисплатину, паклитакселу и эрлотинибу задействованы активация обратного транспорта молекул лекарственного вещества, экспрессия и мутации гена *BRCA1* и экспрессия микроРНК-218 и микроРНК Let-7 –.

3. При проведении количественного математического анализа структура – активность в ряду производных пиридинкарбоновых кислот показан высокий потенциал ряда молекул в качестве перспективных кандидатов для поиска противоопухолевой активности, при этом наиболее перспективными молекулами являются ЛХТ-13-19, ЛХТ-16-19 и ЛХТ-17-19.

4. При сравнительном токсикологическом исследовании установлено, что при внутрижелудочном и парентеральных (внутривенном и внутривнутрибрюшинном) путях введения показатели ЛД₅₀ и ЛД₁₀₀ для восьми новых отечественных соединений – производных пиридинкарбоновых кислот – колеблются в диапазоне от 150 до 900 мг/кг, что в целом позволяет отнести серию соединений к умереннотоксичным или нетоксичным веществам.

5. В культурах клеток рака молочной железы, колоректального рака и рака мочевого пузыря человека впервые изучен спектр противоопухолевой активности в ряду производных пиридинкарбоновых кислот с оптимальными токсикологическими характеристиками. Установлена оптимальные подавляющие концентрации, составившие в культуре эстроген-зависимого РМЖ MCF-7 для соединения ЛХТ-13-19 – $3,8 \times 10^{-5}$ М и для соединения ЛХТ-17-19 – $1,6 \times 10^{-5}$ М.

6. На модели сингенного лейкоза у мышей P388 установлены эффективные терапевтические дозы наиболее активных молекул: для соединения ЛХТ-13-19 – 18,9 мг/кг при внутривнутрибрюшинном введении и для соединения ЛХТ-17-19 – 8,8 мг/кг при том же способе введения.

7. Соединение N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (ЛХТ-13-19) неэффективно в отношении культуры ТН РМЖ, экспрессирующей VSCR, следовательно вещество подвергается первичному обратному транспорту из клеток опухоли. С применением аналитической методики определения концентрации производного 4Н-хромена – N-ацетиламиноэтаноата 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила (соединение ЛХТ-16-19) показано, что после трех раундов культивации органоидной культуры ТН РМЖ с соединением активируется механизм вторичной резистентности, связанный с эффлюксом молекулы из клетки. Доказано, что клетки ТН РМЖ первично высокочувствительны к соединению ЛХТ-17-19, вторичная резистентность

формируется слабо и она не связана с обратным транспортом молекулы и гиперэкспрессией мутантного гена *BRCA1*.

8. При проведении экспериментов по молекулярному докингу 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипутандиоата (соединение ЛХТ-17-19) с использованием кристаллографических структур потенциальных мишеней – макромолекул, участвующих в канцерогенезе – впервые установлено, что наиболее выраженный аффинитет молекулы вещества наблюдается относительно киназы C-abl, рецептора CSF1 и киназного центра EGFR.

9. Впервые разработана воспроизводимая платформа ксенографтного трижды-негативного рака молочной железы представительницы коренной нации Республики Мордовия, пригодная для персонализированной трансляционной медицины и фундаментальных патоморфологических и фармакологических исследований. С использованием платформы у гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu* установлено противоопухолевое и антиметастатическое действие ЛХТ-17-19 как кандидата в антибластномное лекарственное средство. Впервые показана взаимосвязь между развитием противоопухолевого эффекта и подавлением экспрессии маркера канцерогенеза – *EGFR*, а также экспрессией некоторых микроРНК, для соединения ЛХТ-17-19 на ксенографтной модели ТН РМЖ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительный морфологический анализ нефротоксичности доксорубина и наноструктурированного доксорубина в условиях перевиваемого канцерогенеза / Чаиркин И.Н., Чаиркина Н.В., Дерябина О.Н., Медвежонков В.Ю., Калмин О.В. // **Морфологические ведомости**. 2018. Т. 26. № 2. С. 45-48.
2. 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена подавляет рост и метастазирование ксенографтной аденокарциномы легкого / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Р. Сулова, **О.Н. Дерябина**, Д.С. Блинов, П.Н. Жданов, В.И. Шаробаро // *Сеченовский Вестник*. – 2019. – Т. 2(2). – С. 15-20.
3. Изучение безопасности производного аминохромена, обладающего противоопухолевой активностью / Е.В. Блинова, М.О. Дудина, И.Р. Сулова, М.О. Краско, **О.Н. Дерябина**, Д.С. Блинов, С.Я. Скачилова, Е.А. Самышина // *Мат. XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»*. – М., 2020. – С. 5.
4. Programmed death-ligand 1 signaling pathway involves in bladder cancer growth and progression/ Е.А. Samishina, E.V. Blinova, D.A. Roshchin, I.A. Suslova, D.S. Blinov, P.N. Zhdanov,

O.N. Deryabina, O.V. Kit'ko // Journal of Carcinogenesis. – 2019. – Vol. 18(1). – P. 3-10. [Scopus, WoS]

5. Patient-Derived Non-Muscular Invasive Bladder Cancer Xenografts of Main Molecular Subtypes of the Tumor for Anti-Pd-11 Treatment Assessment / E. Blinova, D. Roshchin, E. Kogan, E. Samishina, T. Demura, **O. Deryabina**, I. Suslova, D. Blinov, P. Zhdanov, U. Osmanov, M. Nelipa, A. Kaprin // **Cells.** – 2019. – Vol. 8(6). – P. 1-17. [Scopus, WoS]

6. Development of patient-derived PD-L1-expressing grade 2 non-muscular invasive bladder cancer in NOG/SCID female mice / E. Blinova, D. Roshchin, E.Samishina, I. Suslova, **O. Deryabina**, P. Zhdanov, D. Blinov, A. Chudaikin, T. Bogoyavlenskay, Yu. Vasiliev // **Journal of anatomy.** – 2020. – Vol. 236, Suppl. 1. – P. 139-140. [WoS]

7. Prognostic Role of FGFR3 Expression Status and Tumor-Related MicroRNAs Level in Association with PD-L1 Expression in Primary Luminal Non-M. uscular Invasive Bladder Carcinoma / E. Blinova, A. Buzdin, D. Enikeev, **O. Deryabina** et al. // **Life.** – 2020. – Vol. – 10. – P. 305. [Scopus, WoS]

8. Relapse-free survival and pd-11 expression in first high-and low-grade relapsed luminal, basal and double-negative p53-mutant non-muscular invasive bladder cancer depending on previous chemo-and immunotherapy / Blinova E., Enikeev, D., Roshchin, D., Samyshina, E., **Deryabina, O.**, Tertychnyy, A., Blinov, D., Kogan, E., Dudina, M., Barakat, H., Merinov, D., Kachmazov, A., Serebrianyi, S., Potoldykova, N., Perepechin, D. // **Cancers.** - 2020. - Vol. 12(5). – P. 1-16. [Scopus, WoS]

9. Молекулярный докинг потенциальных мишеней перспективного отечественного противоопухолевого соединения ЛХТ-13-19 / Самышина Е. А., **Дерябина О. Н.**, Кудрявцев М. Ю., Тумутолова О. М., Блинова Е. В. // **Вестник «Биомедицина и Социология»:** - 2021. - Т. 6, № 4. - С. 91-96.

10. К вопросу о противоопухолевой активности нового соединения– производного пиридина / Кудрявцев М. Ю., **Дерябина О. Н.**, Самышина Е. А., Арутюнян К. К., Епишкина А. А. // **Вестник «Биомедицина и Социология»:** - 2021. – Т. 6, № 4. - С. 52-59.

11. Изучение фармакологической активности производного аминокромена при лечении рака молочной железы (экспериментальное исследование) / **Дерябина О. Н.**, Блинова Е. В., Самышина Е. А., Демур Т. А., Епишкина А. А., Дудина М. О., Тумутолова О. М. // **Вестник «Биомедицина и социология»:** - 2021. – Т. 6, № 2. - С. 12-19.

12. Expression of p53 protein associates with anti-pd-11 treatment response on human-derived xenograft model of gata3/cr5/6-negative recurrent nonmuscular invasive bladder urothelial carcinoma / Blinova E., Samishina E., **Deryabina O.**, Blinov D. Roshchin D., Shich E, Tumutolova O., [et al.] // **Molecular Sciences.** - 2021. - Vol. 2(11). - P. 1-18. [Scopus, WoS]

13. Противоопухолевое действие нового производного дигидроакридина на экспериментальной модели рака мочевого пузыря / Е. В. Блинова, **О. Н. Дерябина**, М. Ю. Кудрявцев, О. М.

- Тумутолова, А. А. Махрова, Д. С. Блинов, А. А. Епишкина, Ю. С. Гилевская, Е. А. Самышина, С. Я. Скачилова, К. К. Арутюнян. // **Экспериментальная и клиническая фармакология**: - 2022. – Т. 83, № 9. – С. 8-12. [Scopus]
14. Изучение фармакологической активности ЛХТ-17-19 в культурах клеток эпителиальных опухолей, экспрессирующих EGFR / Кудрявцев М. Ю., Тумутолова О. М., **Дерябина О. Н.**, Епишкина А. А., Вавилова О. С., Гилевская Ю. С., Блинова Е. В. // **Вестник «Биомедицина и социология»**: 2022. – Т.7, № 3. – С. 70-74.
15. Получение и механизм противоопухолевого действия соединения 4Н-аминохромена / Е. А. Самышина, Е. В. Блинова, М. Ю. Кудрявцев, Д. Н. Шимановский, С. Я. Скачилова, А. А. Епишкина, Д. С. Блинов, О. М. Тумутолова, Е. А. Симакина, Ю. А. Шифрин, **О. Н. Дерябина**, Е. В. Шилова, А. А. Махрова, К. К. Арутюнян. // **Химико-фармацевтический журнал**: 2022. - Т. 56, № 1. – С. 15-18. [Scopus]
16. Эпидемиологическая характеристика рака молочной железы в Республике Мордовия / **Дерябина О.Н.**, Блинова Е.В., Дагар Е.А., Тумутолова О.М. // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**: 2021. – Т. 23, № 3. – С. 6-12.
17. Подавление роста и метастазирования ксенографтной аденокарциномы легкого 4-алкилзамещенным производным 2-аминохромена / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Р. Сулова, **О.Н. Дерябина**, Д.С. Блинов, П.И. Жданов // **Сеченовский вестник**: 2019. – Т. 10, № 2. – С. 5-11
18. Внеэкспериментальный поиск молекул с противоопухолевой активностью и молекулярный докинг в ряду производных пиридинкарбоновых кислот / **Дерябина О.Н.**, Кудрявцев М.Ю., Тумутолова О.М., Блинова Е.В., Епишкина А.А., Скачилова С.Я., Махрова А.А., Блинов Д.С. // **Вестник «Биомедицина и социология»**: 2022. – Т. 7, № 3. – С. 37-42.
19. Новое соединения пиридина обладает противоопухолевым эффектом in vivo / Шимановский Д.Н., Кудрявцев М.Ю., **Дерябина О.Н.**, Самышина Е.А. // Тезисы «Здоровье и образование в 21 веке»: 2021. – Т. 2, № 2. – С. 58-61.
20. Пути экспрессии FGFR3 для безрецидивной выживаемости пациентов с первичным мышечно-неинвазивным раком мочевого пузыря / Блинова Е.В., Жданов П.Н., Рощин Д.А., Епишкина А.А., Самышина Е.А., **Дерябина О.Н.**, Блинов Д.С., Демура Т.А., Шимановский Д.Н. // Тезисы «Четвертый международный форум онкологии и радиологии»: 2021. – С.77-78.
21. Antitumor activity of the pyridine derivative/ E.V. Blinova, A.A Epishkina, O.M. Tumutolova, **O.N. Deryabina**, S.Ya. Skachilova, M. Yu. Kudriavtsev, E.V. Shikh, O.S. Vavilova, Y. S. Gilevskaya, G.V. Brykin, A.A. Makhrova, D.S. Blinov // **Research Result in Pharmacology**: 2022. – Т. 8, № 3. – С. 81-86. [Scopus]

22. Прогнозирование противоопухолевого действия нового соединения пиридинкарбоновой кислоты Блинова Е.В., **Дерябина О.Н.**, Самышина Е.А., Кудрявцев М.Ю., Епишкина А.А., Скачилова С.Я., Блинов Д.С. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022. Т. 21. № S2. С. 80.
23. Морфологическая иммуногистохимическая валидация персонализированной биологической *in vivo* платформы немелкоклеточного рака легкого человека / Епишкина А.А., **Дерябина О.Н.**, Тумутолова О.Н., Блинов Д.С., Махрова А.А., Брыкин Г.В., Шимановский Д.Н., Блинова Е.В. // **Журнал анатомии и гистопатологии**. 2022. Т. 4. С. 27-29.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВТД – высшая терапевтическая доза
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ИГХ – иммуногистохимия
ЛД₅₀ – среднетоксическая доза
МДД – минимально-действующая доза
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СТД – средне-терапевтическая доза
ТРО – торможение роста опухоли
ACTB – ген бета-актина
ALK – киназа анапластической лимфомы
EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
IC₅₀ – эффективная подавляющая концентрация
M – средняя арифметическая
МТТ – тест с трифенилтетразолием хлоридом
SD – среднее квадратическое отклонение