

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МОРДОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.П. ОГАРЕВА»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЯДЕРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ «МИФИ»

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

Диссертация на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

доктор медицинских наук, доцент

Демура Татьяна Александровна

Саранск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВАХ ФОРМИРОВАНИЯ, ПРОГРЕССИИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	21
1.1 Молекулярные маркеры РМЖ.....	22
1.2 Классические молекулярные маркеры прогноза течения рака молочной железы и ответа опухоли на фармакотерапию.....	23
1.2.1 Рецепторы гормонов	23
1.2.2 Рецептор 2-го типа человеческого эпидермального фактора роста	24
1.2.3 Патогенетическое значение маркера Ki-67 антигена при раке молочной железы.....	27
1.2.4 Прогностическая и клиническая значимость опухолевого протеина p53 и мутаций его гена TP53	28
1.2.5 Карбогидрат 15-3 и карциноэмбриональные антигены (CA 15-3 и CEA).....	29
1.2.6 Значение генов <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> в патогенезе и прогнозе течения рака молочной железы.....	31
1.3 Возможные молекулярные кандидаты в предикторы клинического течения рака молочной железы.....	34
1.3.1 Ядерный антиген клеточной пролиферации (PCNA).....	34
1.3.2 Кавеолин.....	34
1.3.3 С-Х-С - рецептор хемокина 4-го типа (CXCR4)	35
1.3.4 Лиганды С-С - фрагмента хемокина 2 и 5 (CCL2, CCL5).....	37
1.3.5 Факторы роста как прогностические маркеры при раке молочной железы	38
1.3.6 V-MYC Онкогенный гомолог вируса миелоцитоматоза (Avian, MYC).....	40

1.3.7 Foxp3 как прогностический и диагностический маркер при раке молочной железы.....	41
1.3.8 Патогенетическое и предиктивное значение микроРНК у пациенток с раком молочной железы	43
1.4 Прогнозирование терапевтического ответа при раке молочной железы: молекулярные и клинические маркеры	45
1.5 Молекулярная характеристика тройного негативного рака молочной железы	50
1.5.1 Молекулярная гетерогенность тройного негативного рака молочной железы	55
1.6 Белковые маркеры тройного негативного рака молочной железы как потенциальные мишени для конъюгатов антитело – лекарство	60
1.7 Соматические генетические повреждения при тройном негативном раке молочной железы	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	64
2.1 Дизайн исследования	65
2.2 Этические, регуляторные и нормативные процедуры при проведении исследования.....	70
2.3 Методы проведения эпидемиологического раздела исследования. Математические методы обработки информации	71
2.4 Фармакологические вещества и лекарственные препараты, изученные в диссертационной работе	72
2.5 Лабораторные животные и культуры клеток, использованные в диссертационной работе	74
2.6 Методика изучения острой токсичности.....	76
2.7 Метод проведения экспериментов по молекулярному докингу	77
2.8 Методы экспериментального туморигенеза.....	82
2.8.1 Модель сингенной опухоли у мышей	82
2.8.2 Модель ксенографтного тройного негативного рака молочной железы у гуманизированных мышей	83

2.8.3 Органоидная модель экспериментального туморигенеза	88
2.9 Методы морфологического исследования.....	90
2.9.1 Методы иммуногистохимического исследования.....	92
2.10 Молекулярно-генетические методы исследования, используемые в работе.....	93
2.10.1 Способ изоляции ДНК и РНК.....	93
2.10.2 Способ проведения обратной транскрипции	94
2.10.3 Метод проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.....	94
2.10.4 Метод определения точечных мутаций гена EGFR	97
2.11 Методы статистического анализа полученных данных	99
ГЛАВА 3. ФАРМАКОЭПИДЕМИОЛОГИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ.....	100
3.1 Медико-демографическая характеристика популяции Республики Мордовия.....	100
3.2 Общая эпидемиология рака молочной железы в Республике Мордовия.....	109
3.3 Фармакоэпидемиология и фармакоэкономика рака молочной железы в Республике Мордовия.....	116
ГЛАВА 4. НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	120
4.1 Роль эффлюкса молекул в формировании противоопухолевой химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы.....	128
4.2 Мутации гена BRCA1 как механизм формирования резистентности тройного негативного рака молочной железы к цисплатину	133
4.3 Вовлеченность некоторых микроРНК в формирование резистентности к средствам лекарственного лечения тройного негативного рака молочной железы	137

ГЛАВА 5. СКРИНИНГ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ.....	141
5.1 Острая токсичность производных пиридинкарбонových кислот при различных путях введения	142
5.2 Скрининг противоопухолевой цитотоксичности производных пиридинкарбонových кислот в культуре клеток человеческих эпителиальных опухолей.....	149
5.3 Определение эффективных противоопухолевых доз некоторых соединений пиридинкарбонových кислот	157
ГЛАВА 6. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМЕНА И ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРАХ РЕЗИСТЕНТНОГО ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	166
6.1 Пути преодоления первичного молекулярного эффлюкса в модельной системе тройного негативного рака молочной железы.....	167
6.2 Изучение роли обратного транспорта АХ-554 и ЛХТ-17-19 в формировании вторичной резистентности на инновационной органоидной модели тройного негативного рака молочной железы.....	172
6.3 Мутации гена BRCA1 клеток тройного негативного рака молочной железы на фоне инкубации с производным пиридинкарбоновой кислоты ЛХТ-17-19 как возможный механизм формирования вторичной фармакорезистентности.....	176
ГЛАВА 7. ДОКИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИШЕНЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	180
7.1 Краткая характеристика объекта докинговых исследований	180
7.2 Органайзер кристаллографических моделей сокристаллизованных с препаратами сравнения.....	180

7.3 Молекулярный докинг молекулы ЛХТ-17-19	194
ГЛАВА 8. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИДИНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА КСЕНОГРАФТНОЙ МОДЕЛИ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ЭПИГЕНОМНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ	205
8.1 Разработка ксенографтной модели рецидивного тройного негативного рака молочной железы	206
8.2 Противоопухолевое действие ЛХТ-17-19 на модели ксенографтного тройного негативного рака молочной железы у гуманизированных мышей	210
8.3 Некоторые генетические и эпигенетические механизмы действия ЛХТ-17-19 на ксенографтной модели тройного негативного рака молочной железы	216
8.3.1 Экспрессия гена EGFR и частота мутаций в нем на фоне курсового введения ЛХТ-17-19 мышам с ксенографтной моделью опухоли	217
8.3.2 Результаты эпигеномных исследований механизма действия соединения ЛХТ-17-19	221
ГЛАВА 9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	223
9.1 Итоги выполнения диссертационного исследования	237
9.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования	238
ВЫВОДЫ	240
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	243
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	244
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	245

ВВЕДЕНИЕ

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 [1].

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 [2].

Тройной 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 неoadьювантную химиотерапию. Вследствие потери клетками опухоли эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, а также отсутствия экспрессии человеческого эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) эффективная терапия предполагает применение наиболее эффективных таргетных лекарственных препаратов [3, 4]. 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 [5 – 7].

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), остается средством выбора при первичном ТН РМЖ [6, 8, 9]. 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 [10].

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 относятся 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 [11 – 15].

Вместе с тем научно-практическая проблема преодоления первичной и вторичной химиорезистентности ТН РМЖ далека от разрешения. Возможные подходы к ее решению могут быть рассмотрены с позиций иерархической кластеризации, в соответствии с которой определение возможных оптимальных путей решения должно базироваться на доказательствах, полученных в отдельных кластерах, одним из которых в контексте настоящей работы может выступать отдельная этническая группа. В этой связи представленное диссертационное исследование 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), И. Р. Суловой (2021) были представлены результаты доклинического экспериментального изучения одного из представителей класса производных пиридинкарбоновых кислот – соединения 4Н-аминохромена АХ-554 [16 – 18]. Для обоснования спектра противоопухолевой активности и механизма действия впервые в стране была разработана ксенографтная модель аденокарциномы легкого человека [16 – 18].

В дальнейшем в рамках изучения частных закономерностей влияния ингибиторов иммунных чекпоинтов 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 [19, 20], 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 тройного 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 доксорубицину, цисплатину, паклитакселу и эрлотинибу.

3. Провести скрининг острой токсичности при внутрижелудочном, внутривенном 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 – доксорубицину, 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 внутрибрюшинном) 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 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 внутрибрюшинном 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-ацетиламиноэтаноата 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[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(2*H*)-она 2-гидроксибутандиоата (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.

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 классической 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 неoadъювантной 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 микромодели 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-гидроксипутандиоат (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-гидроксипутандиоат (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 пропедевтики внутренних болезней и клинической фармакологии, патологической анатомии им. академика А. И. Струкова, оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского, фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), нормальной и патологической анатомии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева».

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 пропедевтики внутренних болезней и клинической фармакологии, патологической анатомии им. академика А. И. Струкова, оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского, кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва), 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 «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области), Института биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»» (г. Москва).

Результаты настоящего диссертационного проекта обсуждались и докладывались на XXVI и XXVII 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).

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.

Объём 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВАХ ФОРМИРОВАНИЯ, ПРОГРЕССИИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Актуальность изучения онкологических заболеваний в глобальном масштабе не вызывает никаких вопросов ввиду того, что они являются второй по значимости причиной смертности населения на Земле. Онкологическая заболеваемость растет в течение последних десятилетий как в экономически развитых, так и в развивающихся странах вследствие главным образом повышения воздействия различных факторов риска, а также увеличения продолжительности жизни [21]. Рак молочной железы является одной из наиболее часто выявляемых форм злокачественных заболеваний (занимает первое место по распространенности у женщин): ежегодно в мире регистрируется около 1,3 млн новых случаев заболевания и более 450 тыс. смертей от него [22,276]. В России новых случаев зарегистрировано в 2019 году, что составляет 52 случая на 100 тыс. женщин [23].

Гистологическая классификация РМЖ основывается на происхождении и локализации. Так, протоковые опухоли встречаются почти в 80 % случаев, лобулярные, формирующиеся в железистых дольках, занимают от 10 до 15 % в структуре опухолей. Другие формы встречаются гораздо реже и в совокупности не превышают 10 – 15 % в структуре заболеваемости [24]. При этом у пациенток с инвазивной протоковой опухолью наблюдаются высокая вовлеченность лимфатической системы в прогрессию заболеваемости и неблагоприятный прогноз по сравнению с менее часто встречающимися формами заболевания [25]. При стадировании опухоли широко используется система TNM, рекомендованная UICC и базирующаяся на анатомической распространенности первичного опухолевого узла, поражении лимфатического аппарата и наличии или отсутствии метастатического поражения. Оценка указанных параметров позволяет выделить 4 стадии развития заболевания [26].

Формирование РМЖ включает последовательную прогрессию через прохождение ряда промежуточных патологических процессов, начиная с дуктальной гиперпролиферации, эволюции в carcinoma in situ (CIS), инвазивную карциному и, наконец, метастазирующую опухоль [27]. Учитывая широкую вариабельность клинического течения и прогрессии РМЖ, определение маркеров, которые бы могли надежно отражать клиническое течение опухоли, представляется чрезвычайно важным обстоятельством при изучении природы РМЖ. Кроме того, идентификация молекулярных механизмов прогрессии РМЖ лежит в основе построения современных лечебных технологий, выработки химиотерапевтических стратегий, детекции рецидивирования и метастазирования опухоли, прогнозирования выживаемости [28, 29].

1.1 Молекулярные маркеры РМЖ

В соответствии с определением US National Institutes of Health's (NIH) Working Group and Biomarkers Consortium молекулярный маркер – это характеристика, которая объективно измеряет нормальный или патологический биологический процесс или фармакологический ответ на терапевтическое воздействие [30]. Несмотря на то, что большинство известных молекулярных маркеров имеет белковое происхождение, идентифицированные в последние годы участки гипо- или гиперэкспрессированных генов, поврежденные фрагменты ДНК, микроРНК также обладают большим прогностическим значением [31].

Сейчас хорошо известно, что РМЖ является крайне гетерогенным заболеванием, характеризующимся совокупностью патологических процессов, гистологических черт и клинической картиной. Также на основе анализа экспрессии генов известно, что заболевание подразделяется на молекулярные подгруппы, определяющие в том числе клиническое течение РМЖ. С. Sotiriou и Z. Pusztai [32] показали, что анализ экспрессии генов изменил взгляды на природу заболевания и вооружил исследователей новым надежным инструментом в области молекулярной диагностики неоплазий молочной железы (МЖ). Так,

экспрессия эстрогеновых (ЭР), прогестероновых рецепторов (ПР) и рецепторов человеческого эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) использовалась как наиболее надежный фактор прогнозирования и идентификации фенотипов высокого риска заболевания и выбора наиболее эффективных средств химиотерапии [33].

Гетерогенность РМЖ была показана на основе сравнительной геномной гибридизации в ряде обзорных публикаций и так или иначе ассоциировалась с субтипами опухоли [34]. После проведения секвенирования человеческого генома и прогресса в идентификации белков стало очевидно, что для создания наиболее эффективных фармакотерапевтических подходов к лечению заболевания молекулярное прогнозирование должно выстраиваться на границе между современными геномикой и протеомикой [35].

1.2 Классические молекулярные маркеры прогноза течения рака молочной железы и ответа опухоли на фармакотерапию

1.2.1 Рецепторы гормонов

Приблизительно 1 млн новых случаев рака молочной железы диагностируется ежегодно, и у 700 000 женщин с установленным диагнозом выявляется экспрессия рецепторов гормонов [36]. Описываемые рецепторы представляют собой экспрессированные белки в железистом и стромальном компонентах железы, с которыми связываются циркулирующие гормоны и через которые осуществляется медиация их биологического эффекта [37, 38].

Наиболее изученными гормональными рецепторами при РМЖ являются рецепторы эстрогенов и прогестерона. В частности, РМЖ с позитивной экспрессией ЭР и ПР имеет особенные клинические, патологические, прогностические и молекулярные характеристики [39]. Постулируется, что факторы риска высоко ассоциированы с ЭР- и ПР-позитивными формами заболевания и могут вовлекать в патогенез РМЖ механизмы, связанные с

биологической ролью указанных гормонов, тогда как этиология гормон-негативного рака не связана с уровнем эстрогенов и гестагенов в крови женщин [40, 41]. Установлена прямая связь между уровнем гормонов и возрастом первичного диагноза, причем сила этой связи растет с возрастом первичной диагностики РМЖ.

В 80-е годы двадцатого столетия тамоксифен стал первым таргетным антиэстрогенным препаратом для адъювантной терапии ЭР-позитивного РМЖ [42]. Антагонистический эффект препарата в отношении ткани молочной железы основан на его способности связываться с доменом ЭР для прикрепления лиганда, блокируя при этом стимуляцию рецептора. Связывание тамоксифена предотвращало конформационную трансформацию рецептора, необходимую для последующего связывания с коактиваторами [43]. Терапия тамоксифеном сопровождалась индукцией ремиссии ЭР-позитивного РМЖ в отличие от слабоэкспрессирующих или неэкспрессирующих ЭР форм опухоли [24]. Кроме того, опухолевые клетки, экспрессирующие рецепторы половых гормонов, демонстрируют высокий ответ на гормонотерапию, а у пациенток доказан рост как общей, так и болезнь-специфической выживаемости [45, 46] на фоне лучшего прогноза [47]. И хотя гормонотерапия явилась революционным прорывом в терапии РМЖ, тем не менее не решила проблем оптимального лечения заболевания.

1.2.2 Рецептор 2-го типа человеческого эпидермального фактора роста

Большое разнообразие синонимов молекулы – c-erb-2, cerbB-2, C-erbB-2, HER-2, HER-2/neu, ERBB2, erbB2, erbB-2, neu/c-erbB-2/oncogene neu, neuprotein, and neu [47] свидетельствует о существенной роли рецептора в патогенезе и прогнозе заболевания.

Биологическое значение HER-2 широко изучается с того самого момента, как D. Z. Slamon и соавт. [48] показали взаимосвязь между экспрессией рецептора и плохим прогнозом течения РМЖ [49].

HER-2 – это трансмембранный тирозинкиназный рецептор, принадлежащий к семейству рецепторов факторов роста, структурно относящихся к рецепторам эпидермального фактора роста (EGFR), кодируемых онкогеном, локализованным в 17q21 хромосоме [50]. Указанный онкоген определяется у 20 – 30 % женщин с РМЖ и рассматривается как маркер плохого прогноза. Гиперэкспрессия маркера ассоциирована с агрессивным фенотипом опухоли, резистентной к антигормональной и цитотоксической терапии, а также низкой выживаемостью.

В процессе внутриклеточной сигнализации гомо- или гетеродимеризация HER-семейства рецепторов активизирует внутриклеточный домен тирозинкиназы, что в свою очередь запускает фосфорилирование тирозиновых остатков цитоплазматических фрагментов молекулы, регулирующих выживание клеток и их пролиферацию [51]. Однако в соответствии с данными кристаллографического анализа HER-2 способен менять конформацию без воздействия лиганда, что объясняет в том числе отсутствие природного лиганда у указанного рецептора [52]. Первым клинически разрешенным к использованию моноклональным антителом к экстрацеллюлярному фрагменту HER-2 рецептора стал трастузумаб, показанный для лечения HER-позитивного РМЖ. Эффективность препарата была продемонстрирована в нескольких клинических исследованиях, в которых введение антител приводило к ингибированию роста опухоли и повышению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим лекарственным средствам [53].

Несмотря на то, что до настоящего времени механизм действия препарата целиком не вполне ясен, существуют доказательства, что противоопухолевый эффект обусловлен нарушением рецептор-рецепторного взаимодействия, уменьшением популяции рецепторов посредством эндоцитоза, блокадой очистки экстрацеллюлярного фрагмента рецептора и активацией антитело-зависимой цитотоксичности [54, 55]. Помимо трастузумаба, были предложены и другие терапевтические стратегии, направленные на подавление рецептора фактора роста эпидермиса 2-го типа, в частности ингибитор тирозинкиназы лапатиниб, показавший эффективность на фоне снижения активности трастузумаба [56].

Экспрессия HER-2 в опухолевой ткани при РМЖ определяется либо иммуногистохимически (ИГХ), либо *in situ* флуоресцентным гибридизационным определением копий генов в первичных образцах опухолевой ткани. Было показано, что экстрацеллюлярный домен рецептора может попадать в циркуляцию посредством протеолитического отщепления и определяться в плазме крови женщин с доброкачественными процессами МЖ, первичным и метастатическим РМЖ [57]. Этот так называемый растворимый фрагмент рецептора количественно можно определить с использованием ИФА метода [58]. Tan и соавт. [59] разработали Dotblot метод для определения плазменного уровня рецептора, являющийся чувствительным и сравнительно недорогим методом диагностики, имеющим большое практическое значение для оценки прогрессии и клинической картины РМЖ.

Несмотря на ассоциацию с агрессивными формами РМЖ, специфическая подгруппа в структуре патологии, названная тройным негативным РМЖ, вызывает наибольший интерес в последние годы, поскольку не поддается традиционным терапевтическим протоколам. Тройная негативная неоплазия молочной железы характеризуется отсутствием экспрессии гормональных рецепторов и HER-2 и диагностируется, как правило, в более молодом возрасте [60].

Усилия исследователей в последнее время направлены на идентификацию молекулярных триггеров и маркеров формирования тройного негативного рака, что связано с неэффективностью как антиэстрогенных и антипрогестероновых лекарственных средств, анти-HER-2 таргетных препаратов, так и средств традиционной химиотерапии [61]. Агрессивное клиническое течение заболевания, плохой прогноз и отсутствие специфических и направленных терапевтических средств, безусловно, бросают вызов современным исследователям в рассматриваемой области [62]. В частности, с точки зрения клинического прогноза и течения опухоли в сравнении с люминальными А и В молекулярными подтипами, тройной негативный рак более агрессивен [63].

1.2.3 Патогенетическое значение маркера Ki-67 антигена при раке молочной железы

Ki-67 антиген, впервые описанный в 1983 году, представляет собой неустойчивый ядерный протеин из группы негистоновых белков, принимающий участие в регуляции деления клетки и экспрессирующийся в середине G1, S, G2 и M фазах пролиферирующей клетки. Экспрессии фактора не наблюдается в покоящихся клетках – в фазе G0 и на начальном этапе фазы G1 клеточного цикла. Рутинным способом оценки экспрессии фактора является иммуногистохимическое окрашивание срезов и вычисление доли (в процентах) окрашенных клеток инвазивной карциномы [64, 65]. P. Vielh и соавт. [66] показали сильную корреляционную связь между уровнем экспрессии фактора и S - фазой клеточного цикла и таким образом доказали, что количественное определение экспрессии Ki-67 может рассматриваться как надежный показатель индекса клеточной пролиферации. В соответствии со St. Gallen Consensus 2011 года индекс пролиферации считается низким или отрицательным, если позитивно окрасилось менее 14 % ядер клеток, тогда как положительные или высокие значения индекса соответствуют более 14 % окрашивания ядер опухолевых клеток [67].

В настоящее время очевидно, что выявление биологических маркеров, позволяющих прогнозировать клинический и патологический ответ опухоли на первичную системную антибластомную химиотерапию на ранних этапах лечения, имеет огромное практическое значение. A. V. Patil с соавт. [68] оценивали Ki-67 индекс и апоптотический индекс до, во время и после неoadьювантной химиотерапии антрациклиновыми антибиотиками у женщин с РМЖ, но не установили значимых различий.

K. Tawfik с коллегами [69] впервые описали прямую сильную связь между высокой экспрессией Ki-67 в подмышечных лимфатических узлах (но не в ткани МЖ) и низкой выживаемостью пациенток с РМЖ. Основываясь на этих результатах, пациенты с высокой пролиферативной активностью клеток

метастазов опухоли в лимфатические узлы требуют более агрессивной химиотерапии и более пристального мониторинга клинического состояния и эффективности лечения.

Большой обзор, посвященный прогностической роли Ki-67, вышел из-под пера E. Luporsi с соавт. [70]. В частности, они показали, что описываемый биомаркер может рассматриваться как прогностический фактор при проведении терапевтических мероприятий у женщин с РМЖ. Однако для того чтобы сделать использование оценки фактора повсеместным, необходимы валидация методики его определения и интеграция технологии оценки в рутинную клиническую практику.

1.2.4 Прогностическая и клиническая значимость опухолевого протеина p53 и мутаций его гена TP53

Протеин p53 принимает участие во многих важнейших клеточных процессах, таких как торможение клеточного цикла, программируемая гибель клеток (апоптоз), восстановление ДНК и клеточное старение, имеющих фундаментальное значение для поддержания естественного клеточного гомеостаза и целостности генома. Повреждение гена *TP53* или посттрансплантационные изменения протеина p53 приводят к нарушению p53-ответа на клеточный стресс. Молекулярная археология спектра мутаций гена *TP53* явилась источником гипотезы об участии мутантного p53 в этиологии и патогенезе человеческих опухолей [71]. Среди всех пациенток с РМЖ приблизительно у 30 % найдены мутации гена *TP53*, однако это значение колеблется от почти 80 % у пациенток с базальной формой до менее чем 15 % у пациенток с подтипом А люминальной формы опухоли [72].

По данным D. S. Allred с соавт. [73], экспрессия мутантного протеина p53 ассоциирована с высокой пролиферативной активностью опухолевой ткани, ранним рецидивированием заболевания и ранней гибелью пациенток с РМЖ без поражения лимфатических узлов. Исследовательский коллектив под

руководством А. Dumay [74] изучил мутации гена *TP53* в опухолях молочных желез люминального, базального и апокринного молекулярных типов. Установлено, что в подгруппах существуют различия не только в частоте мутаций описываемого гена, но также в их количестве, типе и последовательности. Авторы показали превалирование точечных выпадений при люминальном типе опухоли и усеченных мутаций при базальном молекулярном варианте РМЖ. У пациенток с апокринным типом опухоли на фоне превалирования инсерций и делеций *p53* усечения не возрастали. Ученые обратили также внимание на различные механизмы мутаций, функциональные последствия мутационных изменений при различных молекулярных подтипах РМЖ.

Мутации в гене *TP53* влекут конформационные нарушения молекулярной структуры кодируемого белка, увеличение периода его полужизни и аккумуляции *p53* протеина в ядрах клеток. Иммуногистохимическое исследование позволяет идентифицировать накопление *p53*-мутантного белка в ядрах клеток и, таким образом, может рассматриваться как непрямой метод оценки уровня мутаций кодирующего гена [75].

Накопление *p53*-мутантного протеина в ядре опухолевой клетки рассматривается в настоящее время как индикатор неблагоприятного клинического прогноза для пациенток с РМЖ. Однако, несмотря на очевидное прогностическое значение, до настоящего времени не предложено доказанного терапевтического метода, селективно воздействующего на описанный молекулярный маркер.

1.2.5 Карбогидрат 15-3 и карциноэмбриональные антигены (СА 15-3 и СЕА)

В современном понимании курабельность РМЖ драматически снижается на фоне метастазирования опухоли, выявляемого классическими методами диагностики распространения процесса: клиническая манифестация метастазирования, визуализация метастазов, положительные результаты анализа

онкомаркеров, в частности таких как опухолевый антиген СА 15-3 или опухолево-эмбриональный антиген СЕА [76].

СF 15-2 в комбинации с СЕА также является релевантным опухолевым маркером при РМЖ [77]. По данным J. G. Geraghty с соавт. [78], СА 15-3 имеет большее прогностическое значение, чем СЕА. Однако с коллегами не согласен F. G. Ebeling с соавт. [79], по мнению которых прогностическая ценность СЕА выше, чем СА 15-3, что указывает, безусловно, на противоречивое значение СЕА при карциногенезе опухолей молочных желез.

СЕА – это гликопротеин, экспрессия которого показана при довольно обширном спектре опухолей, таких, в частности, как рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак желудка, а также при РМЖ и немелкоклеточном раке легких [80]. Определение СЕА при РМЖ указывает на размер опухоли и вовлечение лимфатических узлов в патологический процесс. Так, концентрация СЕА выше чем 7,5 мкг/л является индикатором высокой вероятности субклинических метастазов опухоли [81]. Клинический прогноз у пациентов с РМЖ, у которых концентрация СЕА находилась в диапазоне ниже релевантных значений на момент постановки диагноза, значимо лучше, чем у женщин с повышенными уровнями маркера [82].

СА 15-3 – это маскированные или растворимые формы MUC-1, который существует в форме стабильного димера, состоящего из двух трансмембранных субъединиц. Выработка протеина опосредуется двумя протеазами: ADAM17 и МТ-ММР1 [83, 84]. Белок неоднородно экспрессируется на апикальной поверхности различных нормальных эпителиальных клеток, но aberrантно гиперэкспрессируется в 90 % случаев РМЖ [85].

М. Т. Sandri с соавт. [86] описали прогностическое значение СА 15-3 у пациенток с люминальной В - и HER-2 - положительной молекулярными формами РМЖ. По их данным, исходное определение СА 15-3 может играть большую роль при идентификации высокого риска рецидива заболевания, при котором требуется назначение адъювантной химиотерапии. Другими словами,

исследование доказало, что ненормально высокий уровень СА 15-3 перед оперативным лечением РМЖ ассоциирован с высоким риском рецидива и смерти.

Как бы то ни было, но необходимо проведение последующих проспективных исследований или работ, выполненных с использованием баз данных, для более строгой оценки изложенных выводов. В случае обнаружения такой доказательности СА 15-3 должен быть включен в панель онкомаркеров как фактор, значение которого должно учитываться при выборе терапевтической стратегии.

По мнению G. A. Mendes с соавт. [87], измерение опухолевых маркеров – это способ обнаружения отдаленных метастазов, и маркер СА 15-3 является более точным и чувствительным, чем СЕА, поскольку мониторинг пациенток с РМЖ после проведенного оперативного лечения с использованием лишь СЕА представляется авторам несущественным, тогда как одновременное применение обоих маркеров (СА 15-3 и СЕА) позволяет проводить раннюю диагностику метастазов примерно у 60 – 80 % пациенток с РМЖ [88].

1.2.6 Значение генов *BRCA1* и *BRCA2* в патогенезе и прогнозе течения рака молочной железы

Около 80 % всех случаев семейного РМЖ ассоциировано с экспрессией одного из наследуемых генов предрасположенности к РМЖ или раку яичников – *BRCA1*, *BRCA2*. Гены семейства *BRCA* были классифицированы как гены-супрессоры опухоли, поскольку у гетерозиготных носителей гена в опухолевых клетках наблюдалась потеря аллеля дикого типа гена. Белки, кодируемые представителями генов семейства *BRC*, играют важную роль в регуляции различных внутриклеточных процессов, включая клеточную активацию, регуляцию транскрипции, восстановление поврежденной ДНК, контроль клеточного цикла, клеточную пролиферацию и дифференцировку [89, 90].

Помимо опухолей молочных желез, повышенная экспрессия генов *BRCA* ассоциирована с высоким риском развития рака яичников, предстательной железы

и поджелудочной железы. Однако, несмотря на наследственную предрасположенность, соматические мутации *BRCA* в рамках развивающегося заболевания чрезвычайно редки у пациентов со спорадическим РМЖ [91, 92].

Частота и спектр мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* заметно варьируют в зависимости от этнической принадлежности пациентки, географического региона, очевидно, вследствие влияния на этот процесс взаимодействия с другими генетическими характеристиками, а также факторов образа жизни. В многочисленных исследованиях дискутировался вопрос значимости наследования мутаций *BRCA* по материнской или отцовской линии с точки зрения риска развития РМЖ. В частности, J. Sharira с соавт. [93] показали, что наследование мутаций *BRCA* по отцовской линии в большей степени сказывается на продолжительности жизни пациенток с РМЖ, чем наследование мутаций по материнской линии. Тогда как по данным N. Senst с коллегами [94], хотя и имелось некоторое превалирование риска развития РМЖ у женщин с унаследованными от отца мутациями гена *BRCA1*, показатели не достигали статистической значимости. Таким образом, полученные к настоящему времени результаты не позволяют сформулировать однозначные рекомендации относительно этих групп пациентов. Более того, показано, что мутации гена *BRCA2*, унаследованные по отцовской линии, не влияют на риск развития РМЖ у женщин.

Анализ семейного анамнеза помогает прогнозировать мутации *BRCA1* и *BRCA2*, главным образом у родственников первой линии с раком яичников или РМЖ на фоне раннего развития заболевания, двустороннего поражения молочных желез и большого числа родственников с упомянутыми злокачественными процессами. Эти прогностические факторы имели бы высокое клиническое значение при проведении генетического консультирования, при принятии решений о терапевтических стратегиях, если бы не достаточно высокая регистрация мутаций *BRCA1* и *BRCA2* у пациенток с РМЖ, среди родственников которых не регистрируются описываемые факторы семейного риска. Требуются дальнейшие исследования прогностической роли факторов риска [95].

Генетическое консультирование и тестирование для выявления генных мутаций *BRCA* у пациенток высокого риска широко доступны и часто проводятся в клиниках США и стран Европейского Союза [96, 97]. У лиц, прошедших генетическое секвенирование специфических участков ДНК, у которых выявлено носительство мутаций генов *BRCA*, проводятся мероприятия по повышению уровня мониторинга РМЖ и принимаются специальные превентивные меры. В частности, если высокий риск у данной категории женщин установлен, пациентки могут выбирать между генетическим консультированием, генетическим тестированием, более эффективным онкологическим наблюдением и даже проведением превентивного хирургического вмешательства или химиотерапевтической профилактики [98]. Среди указанных возможностей двухсторонняя мастэктомия, несмотря на свою инвалидизирующую природу, позволяет на 90 % снизить риск развития РМЖ у женщин с *BRCA1/2* мутациями [99].

По данным Р. Apostolou and F. Fostira [100], определены более специфичные генные мутации, влияющие на риск развития РМЖ, в рамках которых *BRCA* мутации рассматриваются как составляющая часть. Новые находки включают редкие эмбриональные мутации в других генах с высокой частотой пенетрации. Среди них наиболее значимые мутации *TP53* гена у пациентов с синдромом Ли - Фраументи, *STK11* мутации (серин-треонин киназа 11) при синдроме Peutz - Jeghers и *PTEN* (фосфатаза и тензин-гомолог 10-й хромосомы) мутации при Cowden синдроме. Среди генов с меньшей пенетрантностью установлено значение для развития и прогноза РМЖ в семьях с высокой концентрацией заболевания мутаций *CHEK2* (киназа чекпоинта 2), *ATM* (мутантная атаксия – телеангиэктазия), *PALB2* (партнер и локализатор *BRCA2*) и *BRIP1* (С-конечная геликаза 1 *BRCA*-взаимодействующего протеина).

1.3 Возможные молекулярные кандидаты в предикторы клинического течения рака молочной железы

1.3.1 Ядерный антиген клеточной пролиферации (PCNA)

G. L. Moldovan с соавт. [101] впервые описали ядерный антиген клеточной пролиферации (PCNA) как негистоновый белок, образующий гомотримерное кольцо, в которое заключена двойная петля ДНК, и являющийся своеобразной молекулярной платформой для протеинов, участвующих в синтезе ДНК (ДНК-полимераза дельта), контроле клеточного цикла, восстановлении поврежденной ДНК. PCNA существует в двух основных формах: ответственной за процесс репликации хроматин-связанной форме и не связанной с хроматином форме, не вовлеченной в синтез ДНК [102].

До настоящего времени нет единого мнения о регуляции этих двух популяций молекулярного маркера. При многочисленных типах опухолевого роста измерение экспрессии PCNA фактора ассоциируется с митотической активностью и стадией опухоли [103]. PCNA-опосредованный сигнальный путь имеет большое значение в регуляции роста опухолевых клеток при РМЖ и свидетельствует о плохой средневзвешенной выживаемости пациенток с опухолью [104]. В исследованиях последних лет установлено, что фосфорилирование тирозина в 211-м положении в молекуле PCNA представляет собой многообещающий терапевтический таргет при раке предстательной железы [105]. Результаты, полученные Н. Zhao с соавт. [104], позволяют предполагать большое терапевтическое значение PCNA с фосфорилированным тирозином в 211-м положении и для пациенток с РМЖ в будущем.

1.3.2 Кавеолин

В сравнительно недавно опубликованных работах показано, что кавеолы и кавеолин 1 играют главную роль во многих молекулярных, клеточных и физиологических процессах [106]. Кавеолы – это специфические инвагинационные

микродомены плазматической мембраны, идентифицированные для большинства клеток млекопитающих, которые служат центрами сборки компонентов клеточной мембраны. Были выделены три представителя семейства (CAV1, CAV2 и CAV3), ответственные за внутриклеточный транспорт клеточных компонентов и передачу сигналов [107].

Была установлена значимая связь между экспрессией CAV1 и CAV2 и высоким гистологическим грейдом, потерей экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов при базальном подтипе РМЖ [108], что явилось доказательством онкогенных свойств кавеолинов. Помимо молочной железы, ассоциация между экспрессией кавеолинов и неблагоприятным клиническим прогнозом доказана и для опухолей другой локализации, в частности таких как предстательная железа [109], легкие [110] и ЦНС [111].

Кавеолин 1 индуцирует канцерогенез, влияет на опухолевую прогрессию и прогноз развития заболевания, однако описываемое влияние далеко от строго неблагоприятного, даже несмотря на многочисленные исследования, продемонстрировавшие описываемые свойства молекулы. Роль кавеолина 1 как онкопротеина или, напротив, опухолевого ингибитора может определяться особенностями взаимодействия с другими сигнальными молекулами, быть органо- или тканеспецифичной, изменяться под действием генетических модификаций, трансформаций экспрессии специфических белков и мРНК [106].

1.3.3 C-X-C - рецептор хемокина 4-го типа (CXCR4)

CXCR4 – это трансмембранный G-белок-связанный протеиновый рецептор, идентифицированный как со-рецептор Т-лимфотропных штаммов ВИЧ [112]. Впервые роль этого рецептора в формировании метастазов РМЖ была документирована в 2001 году [113].

Присутствие и экспрессия этого фактора необходимы для миграции опухолевых клеток РМЖ из первичной опухоли в легкие, кости и лимфатические узлы – в те органы, в которых установлен наивысший уровень секреции хемокина

CXCR12. В этой связи CXCR4 отводится роль прогностического маркера при РМЖ [114].

Учеными под руководством Т. Schioppa [115] были сделаны важные наблюдения и установлено, что повышение экспрессии CXCR4 в опухолевых клетках может быть результатом изменений в опухолевом микроокружении. Культивирование опухолевых клеток в гипоксических условиях сопровождалось гиперэкспрессией CXCR4.

Уровень экспрессии рецептора значимо связан с метастазами опухоли в лимфатические узлы [116]. Было доказано, что гиперпродукция CXCR4 сопровождается большим риском рецидивирования опухоли и снижением опухолеспецифической выживаемости по сравнению с пациентами с низкой экспрессией CXCR4 [117]. Также уровень экспрессии молекулярного маркера определяет размер опухоли, стадию заболевания по градации TNM и меньшую продолжительность жизни пациенток. Вместе с тем подобных закономерностей не установлено в группе женщин с люминальным и HER-2–позитивным РМЖ. Эта закономерность имеет радикальное значение у женщин с тройным негативным РМЖ, экспрессирующим CXCR4, у которых доказан более неблагоприятный прогноз общей и опухолеспецифической выживаемости, нежели у пациенток с тройным негативным раком и низкой экспрессией маркера CXCR4 [118]. Эти находки могут указывать на то, что высокая экспрессия CXCR4 при трижды негативном РМЖ свидетельствует о более агрессивном фенотипе опухоли.

Следовательно, описываемый рецептор может быть и потенциальным терапевтическим таргетом для разработки химиотерапевтических подходов при РМЖ. Более того, в проведенных исследованиях показано, что использование антагониста взаимодействия CXCR4 – CXCR12 молекул AMD3100 сопровождается ингибированием инвазивности и метастатической активности опухолевых клеток РМЖ [119].

1.3.4 Лиганды С-С - фрагмента хемокина 2 и 5 (CCL2, CCL5)

Во многих исследованиях изучалась роль факторов воспаления, таких как хемокин 2 (CCL2, MCP-1, протеин 1 мембранного кофактора) и хемокин 5 (CCL5, RANTES, регулятор активации, экспрессирующийся и секретирующийся нормальными Т-лимфоцитами), в развитии и прогрессировании неоплазий молочной железы. CCL2 и CCL5 принадлежат к суперсемейству хемокинов. Их биологическая роль хорошо известна благодаря участию в иммунных реакциях, в частности в активации направленной двигательной активности лейкоцитов. Участвуя главным образом, в воспалительных реакциях, эти два хемокина обеспечивают миграцию в первую очередь моноцитов и Т-лимфоцитов к месту повреждения или инфекционного процесса [120 - 122].

В ряду работ отмечалось, что экспрессия CCL2 и CCL5 в опухолевой ткани молочной железы выше, чем в здоровой железистой ткани [123, 124]. CCL2 коррелировал при этом с более высокой стадией опухоли и обнаружил прогностическую значимость в отношении безрецидивной выживаемости. По мнению исследователей, CCL2, вероятно, реализует свое туморогенное действие посредством привлечения опухолеспецифических макрофагов и стимуляции ангиогенеза [125]. Более того, полагают, что сигнальный путь CCL2/CCR2 (CCL2 рецептор) принимает участие в реализации клеточной миграции, а гиперэкспрессия хемокина и рецептора обуславливает метастазирование опухолевых клеток РМЖ в легкие и кости [124, 126].

Сигнальный путь CCL5/CCR5 (CCL5 рецептор) активируется у пациенток с агрессивным базальным молекулярным типом РМЖ. Т. Т. Murooka с соавт. [127] показали, что CCL5 активирует клеточную пролиферацию опухолевых клеток MCF-7 линии РМЖ. А по данным М. Velasco-Velazquez и R. G. Pestell [128], CCR5 активизирует инвазивный и метастатический потенциал клеток РМЖ. Описанные результаты указывают на то, что чрезмерная экспрессия CCR5 прямо коррелирует с более тяжелыми стадиями опухолевого процесса, подчеркивая вовлеченность сигнального пути в процессы опухолевого прогресса при

неоплазиях молочной железы [129]. В данном контексте CCL2 и CCL5 должны рассматриваться не только как прогностические маркеры, но и как потенциальные мишени для эффективных химиотерапевтических лекарственных средств.

1.3.5 Факторы роста как прогностические маркеры при раке молочной железы

Роль факторов роста при РМЖ досконально изучена с точки зрения как риска возникновения заболевания, так и опухолевой прогрессии. М. Серна с соавт. [130] обнаружили обратную корреляцию между уровнем инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF1) и тяжестью опухолевого процесса. Таким образом, данный фактор не может служить надежным маркером клинического состояния пациентки на ранних стадиях опухолевого роста, в отличие от эпидермального фактора роста (EGF). Тем не менее и тот и другой факторы представляют собой стимулы, активирующие процесс клеточной миграции в отдаленные области и формирования метастазов, и, следовательно, обе молекулы вовлечены в прогрессию злокачественной неоплазии молочной железы [131].

Фактор роста гепатоцитов (HGF) рассматривается в настоящее время как маркер опухолевой прогрессии и агрессивного течения заболевания. Данные, полученные научной группой R. Kusera [132], полностью подтверждают это предположение. Авторы статьи полагают, что фактор роста гепатоцитов может выступать как дополнительное средство для дифференциальной диагностики злокачественной или доброкачественной природы образования в ткани молочной железы. Подобных же результатов достигли и ученые под руководством Н. Н. Ahmed [133], которые сделали однозначный вывод, что рассматриваемый фактор может иметь диагностическую ценность в отношении РМЖ и выступать как независимый предиктивный фактор. Вместе с тем в уже упомянутом исследовании М. Серна с соавт. [130] высказывается противоположная точка зрения в отношении фактора роста гепатоцитов, наряду с эндотелиальным фактором роста сосудов (VEGF). В другом не менее серьезном исследовании

было показано, что экспрессия VEGF-A в строме опухоли молочной железы представляет собой надежный прогностический индикатор РМЖ-зависимой выживаемости и общей выживаемости женщин на момент постановки диагноза и, следовательно, может использоваться для стратификации пациенток с воспалительным РМЖ на группы низкого и высокого риска рецидива и неблагоприятного исхода заболевания. Кроме того, высокие уровни стромального VEGF-A могут использоваться для идентификации пациенток с воспалительной формой РМЖ и хорошим предположительным ответом на антиангиогенную химиотерапию, в силу того что VEGF-A – наиболее мощный активатор ангио- и лимфангиогенеза [134].

Противоречивы литературные данные относительно биологической роли трансформирующего фактора-бета (TGF- β) при РМЖ. Так, J. M. M. Oda с соавт. [135] показали, что у гомозиготных пациентов по СС - генотипу T869C полиморфизма гена, кодирующего экспрессию фактора, выявляется высокая экспрессия TGF- β , позволившая авторам сделать вывод о прогностической значимости маркера в прогрессии РМЖ. Известно, что высокая экспрессия TGF- β как в опухоли, так и в строме может облегчать формирование метастазов РМЖ вследствие TGF- β -опосредованных активирующих стимулов в отношении ангиогенеза и клеточной подвижности [136].

C. M. Sheen-Chen с соавт. [137] показали, что высокий плазменный уровень TGF- β связан с далеко зашедшими формами заболевания и, следовательно, может отражать тяжесть течения РМЖ. С ними не согласны J. D. Figueroa с коллегами [138], обнаружившие корреляцию между экспрессией TGF- β и благоприятным прогнозом течения опухолевого процесса.

Представленные противоречивые данные, возможно, могут объясняться двойственной ролью фактора TGF- β в развитии опухоли. Так, E. M. de Kruijf с соавт. [139] считают, что комбинированные TGF- β биомаркеры обладают прогностическим значением у пациентов с I - III стадиями РМЖ. Авторы полагают, что с помощью TGF- β можно определять пациентов с высоким риском

рецидива и, следовательно, фармакотерапевтическое воздействие на TGF- β -ассоциированный сигнальный путь может иметь большое клиническое значение.

1.3.6 V-MYC Онкогенный гомолог вируса миелоцитоматоза (Avian, MYC)

Семейство MYC протоонкогенов включает c-myc, N-myc, L-myc и является одним из наиболее изученных в молекулярной биологии. MYC – это основной протеин, ответственный за сшивание петель ДНК (bHLHZ), чья активность регулируется путем связывания с молекулой гомологичного сшивателя MAX. Активация MYC приводит либо к активации транскрипции, либо к подавлению экспрессии специфических генов [140]. В свою очередь подавляемые гены играют важную роль в опухолевой трансформации, а также репликации, росте, метаболизме, дифференцировке и программируемой гибели опухолевых клеток [141].

Белок MYC был выделен из опухолевых клеток РМЖ, а также многих других злокачественных новообразований. Однако идентификация белков и кодирующих их генов не имеет диагностического и прогностического значения до сих пор в связи с довольно высокой противоречивостью научных результатов [142, 142]. Вместе с тем в ряде исследований были получены сходные данные о возможной роли MYC в функционировании клеток РМЖ. Так, в статье D. Horiuchi с соавт. [144] показано, что в клетках тройного негативного рака молочной железы наблюдается повышенная экспрессия MYC, приводящая к активации MYC-опосредованного сигнального пути. Ученые показали, что CDK ингибирование влечет эффективную регрессию опухоли, свидетельствуя, что MYC-высокоэкспрессирующие опухоли крайне чувствительны к CDK ингибиторам.

Выделение MYC в опухолевых клетках имеет строгую связь с экспрессией эстрогеновых рецепторов, стадией заболевания (на начальных этапах выявления РМЖ) и наличием удаленных метастазов. Кроме того, высказывается мнение, что экспрессия MYC свидетельствует об агрессивной гистологической форме

заболевания, наличии поражения лимфатических узлов и высокой фракции клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. В то же время не получено убедительных доказательств того, что амплификация онкогена значимо влияет на среднюю выживаемость пациентов с инвазивными формами опухоли. Таким образом, генетическая альтерация сигнального пути представляется маркером агрессивности неоплазии, но не имеет самостоятельного прогностического значения [142, 145].

Все же необходимо подчеркнуть, что, несмотря на выявленные различия уровня экспрессии маркера у пациенток с РМЖ и у здоровых женщин [146], корреляционные зависимости между различными клинико-патологическими параметрами заболевания и выявлением *MYC* неочевидны. Также даже при отсутствии прогностического значения амплификации *MYC* для оценки выживаемости пациенток с РМЖ представленный онкоген имеет несомненное клиническое значение как предиктор наличия метастатического поражения [142].

1.3.7 Foxp3 как прогностический и диагностический маркер при раке молочной железы

Fork head box protein P3 (Foxp3) имеет большое значение для дифференцировки, созревания, поддержания популяции и функционирования регуляторных Т-лимфоцитов [147]. При этом совершенно не очевидно, что экспрессия Foxp3 в CD4+ Т-хелперах свидетельствует о регуляторном фенотипе Т-лимфоцитов. Высокий уровень Т-регуляторных лимфоцитов выявлен в периферической крови, лимфатических узлах и образцах опухоли пациентов с различными опухолевыми заболеваниями. К настоящему времени до конца не установлен определенный механизм супрессии клеток иммунной системы регуляторными Т-лимфоцитами, вместе с тем появились сообщения, что это может быть следствием как прямого клеточного контакта, так и непрямого ингибирования посредством выделения противовоспалительных медиаторов, таких как интерлейкины. Сигналы, подаваемые микроокружением, имеют

огромное значение для существования и прогрессии опухолевой ткани. И хотя Т-лимфоциты представляют собой наиболее значимую популяцию клеток иммунной защиты, особенно на ранних этапах опухолевой трансформации и опухолевого роста, они становятся супрессивными CD4⁺ или регуляторными CD8⁺ Т-лимфоцитами лишь вследствие хронической стимуляции и длительного взаимодействия с клетками опухоли, при этом приобретая способность не подавлять, а, напротив, поддерживать опухолевую прогрессию [148].

Недавно было показано, что Foxp3 экспрессируются на мРНК и белковом уровнях в ядре эпителиальных клеток в предстательной железе [149], молочной железе [150, 151] и легких [152]. Сейчас уже нет сомнений, что опухолевые клетки описанной природы могут демонстрировать нарушение регуляции Foxp3 экспрессии. В ряде работ показано распределение белков Foxp3 в опухолевых и неизмененных эпителиальных клетках молочной железы [151, 153]. В каждом из упомянутых исследований показано, что белки Foxp3 экспрессируются конституционально в ядрах здоровых эпителиальных клеток. Однако описания распределения Foxp3 в ядрах злокачественных клеток не так однозначны. Одни исследователи указывают на сходство ядерной локализации белков и в опухолевых, и в здоровых клетках, тогда как другие описывают или полное отсутствие Foxp3 мутаций в неповрежденных клетках или их субклеточную локализацию [149, 151, 153].

В работах, показывающих связь между уровнем выживаемости пациенток с РМЖ и локализацией Foxp3, установлено, что женщины с отсутствием в цитоплазме Foxp3 имели такой же плохой прогноз, как и пациентки со слабой экспрессией маркера [151]. Авторы делают вывод о том, что слабый рекрутинг Foxp3 в ядра может служить важным предиктором плохой выживаемости и высокой агрессивности опухоли при РМЖ. Также около 20 % опухолевых клеток и 80 % неизмененных эпителиоцитов экспрессируют Foxp3, по данным оценки внутриклеточного распределения белков семейства [153]. Доказано, что Foxp3 способен подавлять экспрессию *MYC* [149], а в неизмененном эпителии

связываться и ингибировать активность HER-2 [153] в прогностическом диапазоне [53].

D. Overbeck-Zubrzyska с соавт. [154] показали, что нормальный эпителий молочной железы Foxp3 экспрессирует конституционально в ядрах на фоне низкой экспрессии CXCL4 на мембранах клеток, тогда как в образцах первичной опухолевой ткани и метастазов опухоли, напротив, на фоне снижения выявления Foxp3 наблюдается рост уровня мембранного CXCL4. Экспрессия последнего фактора позволяет клеткам осуществлять CXCL12-специфичную миграцию в сайт-специфичные регионы человеческого тела [133, 156].

1.3.8 Патогенетическое и предиктивное значение микроРНК у пациенток с раком молочной железы

За прошедшее десятилетие резко возросло число доказательств вовлечения микроРНК как тканевых маркеров в классификацию и прогноз многих человеческих злокачественных опухолей, в том числе, безусловно, и РМЖ [157, 158].

МикроРНК представляют собой естественные некодирующие небольшие молекулы РНК, состоящие не более чем из 21 - 24 последовательностей нуклеотидов, которые связываются частично или полностью с 3'-нетранслирующими регионами белок-кодирующих генов, приводя к подавлению трансляции таргетных генов [159, 160]. МикроРНК могут стабильно присутствовать в цельной крови, сыворотке, плазме [161], однако происхождение циркулирующих молекул микроРНК не совсем понятно. Высказываются предположения, что опухолеспецифичные микроРНК попадают в кровоток вследствие гибели или лизирования опухолевых клеток [162], а также путем активной секреции микроРНК-содержащих экзосом клетками опухоли [163].

В некоторых исследованиях авторы указывают на то, что микроРНК играют ключевую роль в таких важнейших биологических процессах, как опухолевая трансформация, пролиферация и дифференцировка опухолевых клеток,

определение их судьбы, регуляция программируемой гибели, передача сигналов, органогенез, дифференциация линий гемопоэтических клеток, взаимодействие вирусный антиген - хозяин [164, 165].

Х. Wu с коллегами [166] выделили более 800 типов микроРНК в циркуляции пациенток с РМЖ. Два из них, микроРНК-375 и микроРНК-122, показали статистически значимую связь с клиническими исходами, включая ответ на неоадьювантную химиотерапию и рецидивы метастазов опухоли. Полученные результаты позволяют оптимизировать химиотерапевтическое лечение РМЖ, проводить эффективные антиметастатические интервенции и открывают многообещающее клиническое применение в будущем. L. Wang с соавт. [149] установили, что микроРНК-122 проявляет свойства опухолевого супрессора и ингибирует опухолевую трансформацию и прогрессию посредством воздействия на IGF1R, и регулируя сигнальный путь PI3K / Akt / mTOR / p70S6K.

В образцах опухолевой ткани показаны обратная зависимость между уровнем экспрессии микроРНК - 497, патологической стадией опухоли, ее размером, наличием метастазов в лимфатические узлы и уровнем экспрессии HER-2, а также отсутствие корреляционной зависимости между экспрессией микроРНК - 497 и экспрессией эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, а также статусом p53 мутаций. Гиперэкспрессия микроРНК - 497 ведет к подавлению активации Bcl-w (представитель антиапоптотического семейства Bcl-2), что проявляется ингибированием клеточного роста и активацией апоптоза, ингибированием G0/G1 - фазы клеточного цикла, а в целом – супрессией опухолевого роста. Следовательно, пациентки с гиперэкспрессией микроРНК-497 имеют лучший прогноз выживания и благоприятного клинического исхода [168].

Геномные исследования, проводимые в последние годы, дополнили наш арсенал доказательств регуляторной роли микроРНК новыми уникальными сведениями, показывающими, что экспрессия микроРНК опухолями имеет потенциально двойственное значение, поскольку, с одной стороны, молекулы микроРНК могут модулировать сигнальные пути известных онкогенных

маркеров, таких как *p53*, *c-MYC*, *RAS*, и *BCR-ABL*, а с другой – сами являются объектом регуляции указанных биологических маркеров [169].

Новые биологические и патологические свойства микроРНК непрерывно описываются в научной периодике. Так, в частности, было показано, что микроРНК-373 и микроРНК-520с стимулируют миграцию и инвазию опухолевых клеток как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* [170]. Все это, без сомнения, говорит о большом диагностическом и прогностическом потенциале молекул, нуждающемся в дальнейших исследованиях.

1.4 Прогнозирование терапевтического ответа при раке молочной железы: молекулярные и клинические маркеры

Остеопонтин – секретируемый белок адгезии экстрацеллюлярного матрикса, ассоциированный с инвазией опухолевых клеток и метастазированием РМЖ [171, 172]. Научный коллектив под руководством Н. Pang [173] изучал клинический и патогенетический эффекты различных молекул адгезии – остеопонтина-с, Е-категрина и катенина-бета при раке молочной железы. Исследователи установили, что при неоплазии молочных желез наблюдается повышение экспрессии всех упомянутых молекул при сравнении со здоровыми тканями органа.

При этом экспрессия остеопонтина-с четко коррелировала с наличием метастазов в лимфатические узлы, с высоким грэйдом опухоли [174] и более агрессивным ее морфологическим вариантом. Помимо прочего, у пациенток с тройной негативной формой заболевания также установлена прямая зависимость между уровнем молекулы адгезии и метастазированием и рецидивированием опухоли. При данной форме рака доказана связь остеопонтина-с с неблагоприятным течением опухоли, низкими средней продолжительностью жизни и опухолеспецифической выживаемостью.

Было показано, что уровень экспрессии ароматазы опухолевыми клетками имеет непосредственное влияние на эффективность гормонотерапии РМЖ [175,

176]. Так, М. J. Ellis с соавт. [177] провели сравнительное исследование образцов ткани опухоли молочных желез женщин, получавших в качестве неoadъювантной терапии тамоксифен и летрозол. Они установили, что уровень экспрессии ароматазы в опухолевых и неизмененных железистых клетках коррелировал с изменениями Ki-67, вызванными видом химиотерапии, продолжительностью безрецидивной выживаемости, а также опухолеспецифической выживаемостью [178 - 180].

Экспрессия фермента ассоциируется с меньшим размером опухоли, большим уровнем эстрогеновых рецепторов и низкой экспрессией Ki-67, что, наряду с доказанным значением в качестве независимой переменной безрецидивной выживаемости сделало блокаторы ароматазы препаратами первой линии химиотерапии гормон-позитивного РМЖ у женщин в период постменопаузы [181, 182].

Альфа-рецептор ретиноевой кислоты (RARA). У около трети всех пациенток с эстроген-позитивным РМЖ, получавших терапию тамоксифеном, наблюдается рецидив заболевания [183]. В настоящее время накоплен ряд доказательств, позволяющих считать альфа-рецептор ретиноевой кислоты (RARA) потенциальным биомаркером резистентности к тамоксифену [184]. Возможные доказательства подобного утверждения мы находим в области ассоциации между RARA и эстрогеновыми альфа-рецепторами, а также наличия совместного сайта связывания в геноме человека [185]. Взаимосвязь между резистентностью к RARA и к ЭР-альфа была в свою очередь доказана с использованием тамоксифен-чувствительной и тамоксифен-устойчивой линий опухолей молочной железы (MCF7, LCC2 соответственно). При этом тамоксифен-резистентные клетки экспрессировали высокий уровень RARA [186].

В том же исследовании было показано, что у женщин с ЭР-альфа-позитивным РМЖ и высоким уровнем содержания RARA на фоне терапии тамоксифеном регистрировали меньшую безрецидивную выживаемость, чем у пациенток с низким уровнем экспрессии рецептора ретиноевой кислоты [186]. Н. J. Johansson с соавт. [186] с использованием количественного ИФА доказали

предиктивную роль рецептора в группе ЭР-альфа-позитивного РМЖ с точки зрения эффективности антиэстрогенной терапии.

Карциноэмбриональные молекулы клеточной адгезии 6-го типа (СЕАСАМ 6) представляют собой человеческий карциноэмбриональный антиген, который функционирует как мультирегуляторный протеин, чья экспрессия повышается при многочисленных злокачественных новообразованиях человека [187, 188]. Экспрессия СЕАСАМ 6 в клетках протоков при атипичной дуктальной гиперплазии, по мнению ряда авторов, может рассматриваться в контексте формирования РМЖ [189]. В работе [190] показана связь маркера с инвазивным и лекарственно-резистентным РМЖ. В то же время в большом когортном исследовании не было показано связи экспрессии СЕАСАМ 6 с прогнозом и общей выживаемостью пациенток с люминальным молекулярным типом РМЖ, тогда как такая связь была установлена для HER2-экспрессирующих опухолей [190].

Ген каталитической субъединицы фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат 3-киназы (PIK3CA) кодирует соответствующие 1 или 2 субъединицы фермента [191], представляющего собой результат функциональных мутаций, обнаруживаемых в клетках ряда злокачественных опухолей, и встречающихся почти в 20 % случаев при РМЖ [192]. М. Cizkova с соавт. [193] идентифицировали PIK3CA- мутации у 17 (21,3 %) из 80 пациенток с HER-2-позитивным РМЖ через год терапии трастузумабом. При этом в сравнительном исследовании было показано, что у пациенток с диким типом PIK3CA наблюдались лучшие значения опухолеспецифической выживаемости, чем у женщин с мутациями PIK3CA. Прогноз при HER2-позитивном РМЖ с мутациями PIK3CA на фоне терапии трастузумабом также был хуже, чем у женщин, экспрессирующих дикий тип PIK3CA. Полагают, что описанный феномен – результат снижения эффективности трастузумаба вследствие нарушений PI3KCA / протеинкиназа В сигнального пути на фоне PIK3CA мутаций. Таким образом, определение PIK3CA мутаций целесообразно лишь у пациенток с HER2-позитивным РМЖ.

Тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (TIMP-1). Паклитаксел является препаратом выбора первой линии при метастазах РМЖ в лимфатические узлы [194, 195]. Однако до последнего времени не существовало надежного биомаркера, позволяющего прогнозировать чувствительность метастатических клеток к химиотерапевтическому лекарственному средству. В то же время было показано, что TIMP-1 защищает клетки от программируемой гибели [196]. В проведенных эпидемиологических исследованиях установлена зависимость между высокими уровнями экспрессии и снижением ответа к циклофосфамиду / метотрексату / 5-фторурацилу и протоколам химиотерапии, базирующимся на применении антрациклиновых антибиотиков [197].

В ретроспективном исследовании 99 пациенток с РМЖ D. Zhu с коллегами [198] установили корреляцию между высоким уровнем экспрессии TIMP-1 и повышением чувствительности к терапии с использованием паклитаксела. Построение кривой выживаемости Каплан - Мейера выявило, что пациентки с высокой экспрессией ингибитора имели худшую опухолеспецифическую выживаемость, чем женщины со слабо TIMP-1-экспрессирующими опухолями. Пятилетняя выживаемость женщин с высокой экспрессией ингибитора металлопротеиназы-1 также была значимо ниже при плохом ответе на химиотерапию с использованием паклитаксела. Следовательно, TIMP-1 может быть использован как маркер лекарственной резистентности к паклитакселу.

Легкие цепи ферритина (FTL). Ферритин – это распространенный повсеместно в организме железо-связывающий белок. У позвоночных выделяют 2 типа апоферритина, состоящих из 24 аминокислотных последовательностей, формирующих тяжелые и легкие цепи. Причем соотношение тяжелых и легких цепей белка может широко варьировать в зависимости как от типа ткани, так и от ее функционального или патологического состояния [199]. Повышение концентрации легких цепей ферритина в образцах различных опухолей установлено на начальных этапах формирования злокачественного процесса [200]. G. Ricolleau с соавт. [201] изучали возможность использования FTL как

прогностического маркера метастазов РМЖ в лимфатические узлы и установили, что критический уровень концентрации равен 2,4. У пациенток с уровнем FTL, превышающем указанный, наблюдалась худшая безметастазная выживаемость [202], что свидетельствует о независимом прогностическом значении маркера.

Активатор урокиназа-подобного плазминогена (uPA) и ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1). Первый маркер относится к опухолеспецифическим протеолитическим факторам, тогда как второй играет важную роль в опухолевой инвазии и метастазировании [203], а также клеточной сигнализации, адгезии, миграции и пролиферации [204]. В финальном исследовании Chemo-N0 trial for the validation of The American Society of Clinical Oncology-recommended biomarkers (1993 - 1998, 647 наблюдений, 12 центров, средняя продолжительность периода наблюдения 113 месяцев с диапазоном от 5 до 167 мес.) высокий уровень описываемых маркеров коррелировал со значительно худшей опухолеспецифической выживаемостью пациенток с РМЖ, не получавших адъювантной терапии, а также низкой общей 5- и 10-летней выживаемостью. Подобные же результаты были получены и в других исследованиях [205].

Центромеры 17-й хромосомы (Ch17CEP). 17-я хромосома относится к наиболее плотным хромосомам в человеческом геноме и включает несколько генов, таких как BRCA1 и HER-2, играющих ключевую роль в прогрессии РМЖ. Помимо этих, в хромосоме локализируются гены, ответственные за естественное восстановление структуры ДНК, – TP53, RAD51C и RAD52B [206]. Дупликация центромерного региона хромосомы 17 строго ассоциирована с идентификацией HER-2 [207]. Ch17CEP-перекрест также свидетельствует о нестабильности генома при РМЖ и коррелирует с чувствительностью к химиотерапии [207, 208]. Недавно было показано, что Ch17CEP-перекрест является независимым прогностическим фактором опухолеспецифической и общей выживаемости женщин со всеми молекулярными типами РМЖ [209].

Ген торможения митоза 1 (MAD1L1) представляет собой чекпоинт-ген, ассоциированный с хромосомной нестабильностью. Мутации гена наблюдаются

при многих разновидностях злокачественных опухолей, в частности толстого кишечника и легких [210]. Q. Sun с соавт. [211] анализировали экспрессию гена MAD1L1 у 461 женщины с РМЖ и неизменной тканью молочной железы и определили неблагоприятный прогноз общей выживаемости на фоне высокой экспрессии гена в группе РМЖ. Кроме того, в этом же исследовании было показано, что высокая ядерная экспрессия MAD1L1 у пациенток, проходящих лечение таксолами, сопровождается ухудшением прогноза по сравнению с нелечеными женщинами. Таким образом, авторы предположили, что экспрессия гена MAD1L1 является маркером фармакорезистентности опухоли молочной железы к таксолам.

1.5 Молекулярная характеристика тройного негативного рака молочной железы

В результате проведения транскриптомных исследований РМЖ вся совокупность злокачественных опухолей молочной железы эпителиального происхождения в настоящее время классифицируется на пять молекулярных классов: люминальный А, люминальный В, базальный, HER-2-позитивный и нормальный [212, 213]. И хотя все упомянутые молекулярные классы могут входить в ИГХ-определяемый надкласс тройного негативного РМЖ, базальный молекулярный класс чаще всего обнаруживается при ТН РМЖ: от 50 до 75 % всего ТН РМЖ имеет базальный фенотип, и около 80 % всех базальных опухолей являются ЭР-негативными и HER-2-негативными (рисунок 1) [214, 215]. Характеристика молекулярных классов РМЖ с использованием секвенирования 50 генов (PAM50, предиктор подтипов РМЖ) позволила получить информацию о прогнозировании полного клинического ответа (pCR) на неоадьювантную химиотерапию РМЖ всех молекулярных классов [216], однако, сузив анализ до ТН РМЖ, оказалось, что ни один из PAM50-предикторов не позволяет оценить pCR на этапе первичной диагностики заболевания [217].

В базальных ТН опухолях низкая экспрессия маркеров люминальной-А формы и высокая экспрессия факторов пролиферации ассоциируются с pCR [217].

В это же время высокая экспрессия генов - регуляторов клеточного цикла (CCNE и FANCA) и низкий уровень активности генов, кодирующих эстроген-зависимую сигнальную систему (FOXA1 и PGR), также были связаны с pCR, тогда как гиперэкспрессия генов мезенхимально-эпителиальной трансформации (EMT), TWIST1 и ZEB1 не обнаруживает подобной связи [217]. Следовательно, для ТН РМЖ не установлено ни одного гена - предиктора опухолеспецифической выживаемости [217]. Вместе с тем в протоколе GEICAM/9906 у ТН РМЖ, принадлежащего к базальному молекулярному классу, и в протоколах METABRIC и GEICAM/9741 того же класса ТН опухоли на фоне лечения неoadьювантной химиотерапией

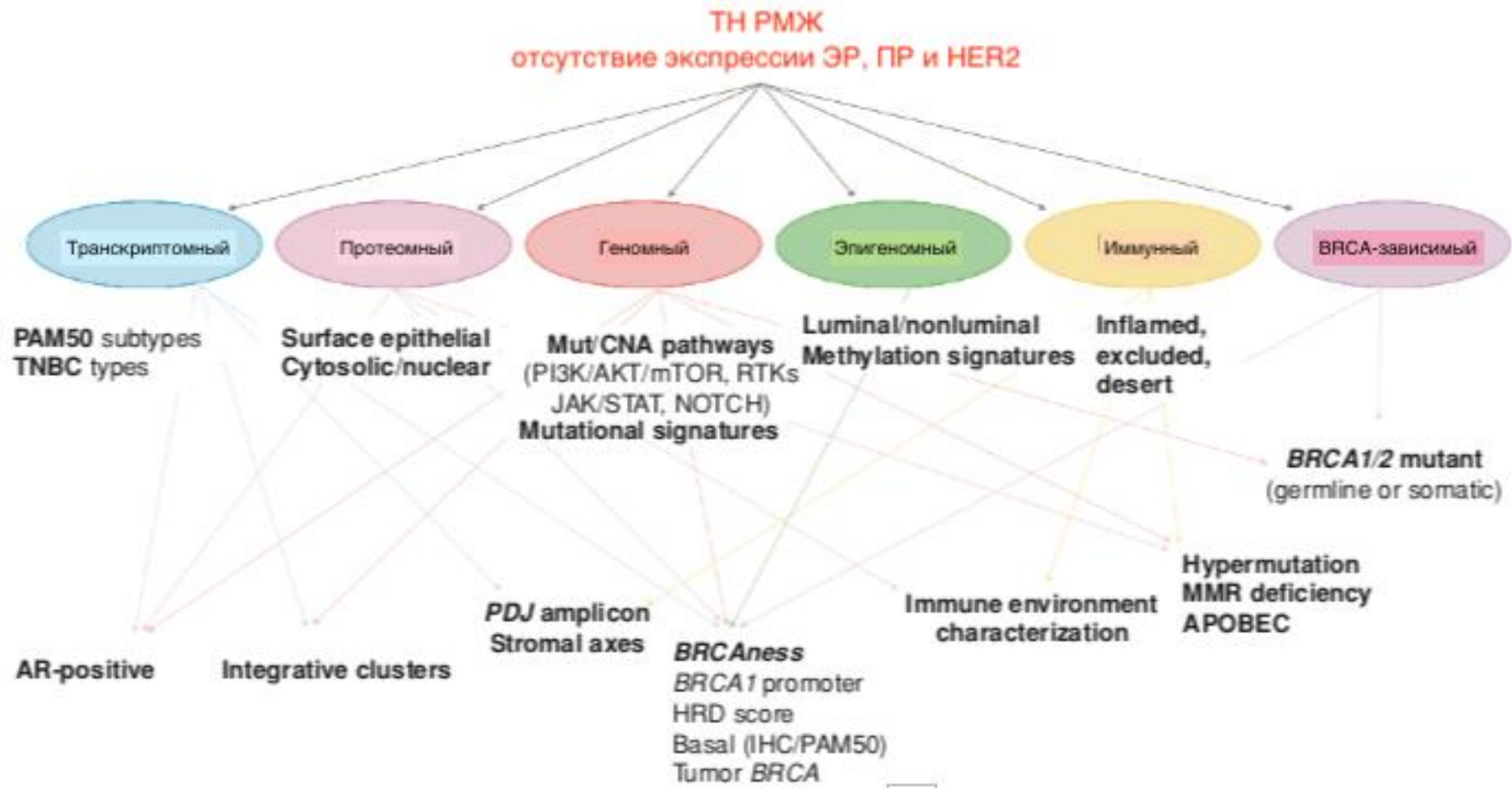


Рисунок 1 – Взаимодействие между молекулярными характеристиками ТН РМЖ, установленными при проведении геномных, эпигеномных, транскриптомных, протеомных и иммунологических исследований по [217] в ред. авт., пояснение в тексте

обнаружена предиктивная способность двух вышеописанных молекулярных характеристик (низкая экспрессия маркеров люминальной-А формы и высокая экспрессия факторов пролиферации) в повышении опухолеспецифической и безрецидивной выживаемости (рисунок 2).

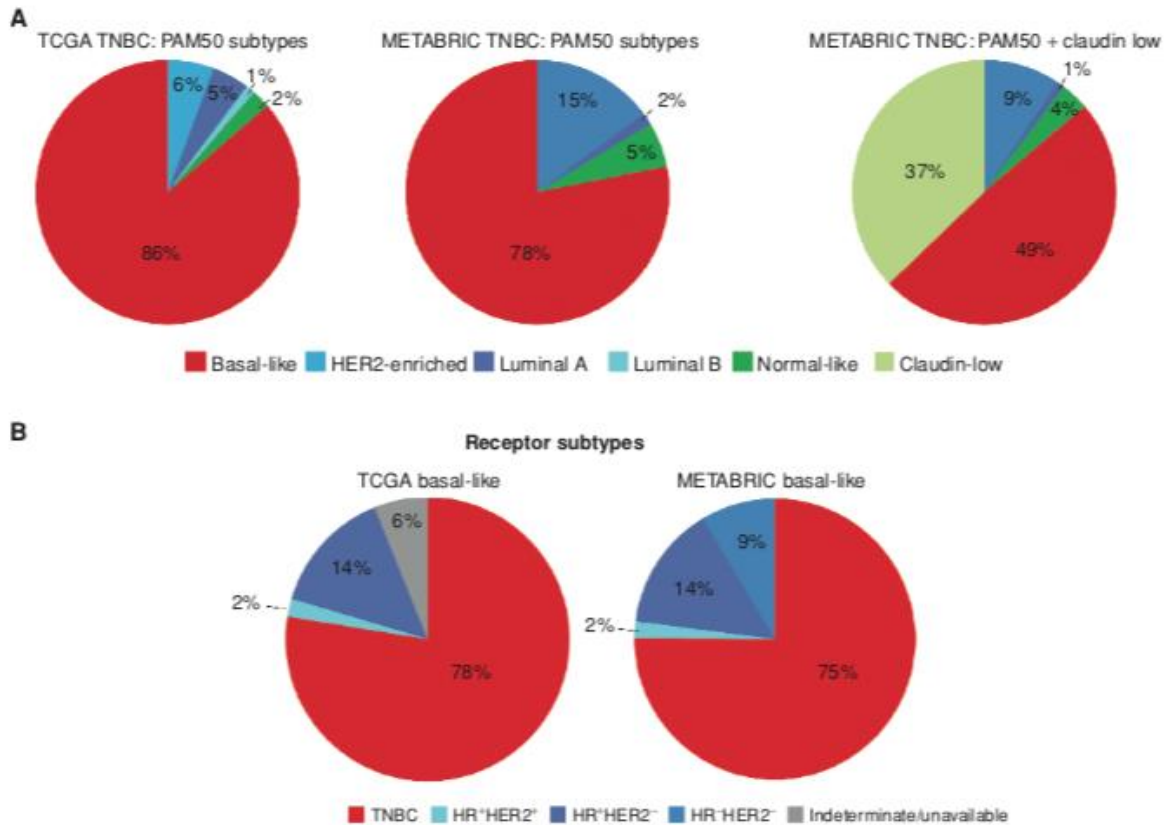


Рисунок 2 – Распределение основных молекулярных классов РМЖ среди ТН формы опухоли (А) и распределение ТН РМЖ у лиц с базальным классом опухоли по [217], *ред. авт.*

Как мы уже говорили, ни один из маркеров группы PAM50 не доказал своей роли как предиктора ответа опухоли ни на одно химиотерапевтическое средство при ТН опухоли МЖ. Лишь для протокола CALGB/40603 [218] рост значения индекса pCR с 47 до 61 % был обусловлен добавлением к схеме карбоплатина, однако это повышение было нивелировано в общей популяции носителей ТН РМЖ при анализе всех, в том числе небазальных, генотипов опухоли.

На фоне метастатического поражения при ТН форме заболевания карбоплатин и доцетаксел достигли сравнительно одинакового уровня ответа на терапию у пациенток с базальным вариантом опухоли в исследовании TNT [219]. Интересно, что статистической значимости достигала связь между с подгруппами РАМ50 и пациентками, получающими лекарственную терапию, что было обусловлено неожиданным открытием более высокого ответа на доцетаксел по сравнению с карбоплатином у лиц с небазальными формами опухоли [220].

Проведенный в последние годы генный анализ выявил шестой молекулярный класс опухоли молочной железы – с низкой экспрессией клаудина (НЭК), представленный у 7 – 14 % пациенток с РМЖ [213]. Приблизительно 70 % всех НЭК-опухолей являются ТН РМЖ с высоким представительством метастатических и медуллярных форм заболевания. И хотя, как и базальный класс РМЖ, НЭК-класс также характеризуется низкой экспрессией маркеров люминального А типа опухоли, для него не характерен высокий пролиферативный потенциал. Для описываемого НЭК-класса РМЖ характерны низкий уровень клеточной адгезии и повышенная экспрессия генов иммунного ответа (таких как CD4 и CD79a). Данные мезенхимальные признаки (включая рост экспрессии CD44, виментина и катгерина) на фоне низкой эпителиальной дифференцировки (низкая экспрессия гена CD24) напоминает фенотип маммарных клеток-предшественников (CD44⁺CD24^{-lo}) [213]. В ретроспективных исследованиях НЭК-опухоли обладали низкими значениями индекса pCR (39 %) по сравнению с базальным типом РМЖ (73 %), и более неблагоприятным прогнозом при сравнении с люминальным А классом опухоли. При этом для НЭК-класса РМЖ была характерна такая же выживаемость, как и для люминального В, базального и HER-2-позитивного классов опухоли [213]. В НЭК-неоплазиях молочной железы формирование опухолевых стволовых клеток индуцируется трансформирующим фактором роста бета (TGF-бета) [220], при этом в клетках химиорезистентного ТН

РМЖ наблюдается гиперэкспрессия как TGF-бета, так и других сигнальных молекул, участвующих в трансформации стволовых клеток [221]. Следовательно, ингибирование TGF-бета может представлять потенциальную терапевтическую стратегию для предотвращения фармакорезистентности РМЖ хотя бы НЭК-молекулярного класса.

1.5.1 Молекулярная гетерогенность тройного негативного рака молочной железы

Молекулярная гетерогенность ТН РМЖ была определена с использованием транскриптомного анализа. В. D. Lehmann с коллегами проанализировали 21 публичный датасет с результатами генного секвенирования, отобранный по принципу наличия признаков ТН РМЖ, а также ЭР1-, ПР- и ERBB2-экспрессии. Авторы идентифицировали 7 следующих кластеров внутри ТН РМЖ: базально-подобный 1-го типа (BL1), базально-подобный 2-го типа (BL2), иммуномодулирующий (IM), мезенхимальный (M), мезенхимально-стволово-подобный (MSL), люминальный с экспрессией андрогеновых рецепторов (LAR) и нестабильный (UNS) [222]. Перечисленные кластеры характеризуются определенным паттерном молекулярных повреждений, выявляемых на уровнях экспрессии РНК, соматических мутаций и вариаций.

Так, BL1-кластер характеризуется превалированием экспрессии генов, участвующих в ответе на повреждение ДНК и регуляции клеточного цикла, включая наиболее высокий уровень мутаций гена *TP53* (92 %), высокую частоту амплификации *MYC*, *CDK6* и *CCNE1* и делеций в генах *BRCA2*, *PTEN*, *MDM2* и *RB1* [223]. Для BL2-кластера характерна гиперэкспрессия факторов роста и сигнальных систем, регулирующих метаболическую активность, а также пролиферативный фенотип с высоким уровнем фармакологического ответа (pCR) на применение ингибиторов митоза, таких как таксаны. Гены, участвующие в процессинге и презентации антигенов,

внутриклеточной сигнализации иммунных клеток, а также цитокиновой продукции (*JAK / STAT*, *TNF* и *NFkB*) высоко экспрессируются при иммуномодулирующем (IM) кластере ТН РМЖ. Мезенхимальные кластеры ТН РМЖ, М и МL демонстрируют сходный молекулярный профиль, включающий однонаправленную регуляцию клеточной подвижности и дифференцировки, но отличающийся уникальной для MSL гиперэкспрессией генов, регулирующих ангиогенез и дифференцировку стволовых клеток, наряду с низкой экспрессией клаудинов. Наконец, помимо ЭР-негативизма, для LAR-кластера свойствен люминальный паттерн экспрессии генов (высокий уровень экспрессии *FOXA1*, *GATA3*, *SPDEF* и *XBPI*) на фоне повышенного уровня мРНК и кодирующих ее протеинов андрогеновых рецепторов, перекрещивающихся в 82 % случаев с люминальным А и люминальным В классическими молекулярными типами РМЖ.

В этой связи не удивительно, что андроген-позитивный люминальный кластер ТН РМЖ содержит повышенный уровень мутаций *PIK3CA* (55 %), *KMT2C* (19 %), *CDH1* (в сочетании с высоким превалированием инвазивного долькового роста на гистологических препаратах), *NF1* (13 %), и *AKT1* (13 %) [222]. Описанная семикластерная классификация ТН РМЖ позволяет независимо прогнозировать вероятность ответа на химиотерапию (pCR), но не способна к ретроспективной предикции продолжительности жизни до формирования отдаленных метастазов и 5- и 10-летней выживаемости пациенток с ТН РМЖ, получавших лечение препаратами неoadъювантной химиотерапии [224]. Медиана 5-летней выживаемости LAR- и BL1-кластеров была наиболее высокой среди всех семи кластеров ТН РМЖ, даже несмотря на то, что pCR- индекс для андроген-позитивных опухолей был наименьшим. В культуральных исследованиях на клеточных линиях, представляющих каждый молекулярный кластер ТН РМЖ, была показана различная чувствительность опухолей к химиотерапевтическим

лекарственным средствам, что, при условии корректной валидации, может приобрести важнейшее клиническое применение [225].

Что удивительно, при проведении независимого ИГХ исследования препаратов пяти классических молекулярных типов РМЖ не удалось идентифицировать все семь молекулярных кластеров ТН РМЖ, для чего необходимо проведение анализа экспрессии соответствующих характерных для каждого кластера генов [226]. Даже при изучении результатов других исследований не трудно установить, что при идентификации кластеров ТН РМЖ с применением метода мРНК гибридизации воспроизводимость BL2- и UNS- кластеров была недостоверной [227, 228].

В наблюдательном исследовании, проведенном В. D. Lehmann с соавт., выполнение гистологического исследования и лазерной микродиссекции опухолевых образцов перед изоляцией РНК и анализом экспрессии генов позволило установить, что присутствие стромальных клеток (инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и опухолеспецифических мезенхимальных клеток) определяет принадлежность ТН РМЖ к IM- и MSL-кластерам соответственно [225]. Описанные находки привели к ревизии действующей классификации и выделению 4 стабильных транскрипционных классов ТН РМЖ: BL1, BL2, M и LAR, существенно отличающихся друг от друга не только прогнозом и чувствительностью к химиотерапевтическим лекарственным средствам, но и дебютом заболевания, а также траекторией рецидивирования, характеризующейся, в частности, тем, что вовлечение лимфатических узлов наиболее характерно для LAR-класса ТН РМЖ, а метастатическое рецидивирование с тропизмом к легким присуще M-классу, тогда как в кости – LAR-классу заболевания.

Подобно семикластерной градации ТН РМЖ, для 4-классной классификации присущи межклассовые отличия и в ответе на неoadьювантную химиотерапию. Так, при общей зависимости всех классов ($p=0,027$) наибольшая чувствительность (по индексу pCR) к

химиотерапевтическим протоколам, базирующимся на препаратах платины и таксанах, присуща BL1- классу (65,6 %), а наименьшая – LAR-классу (21,4 %) соответственно [229]. Изложенные новеллы проливают свет на ограниченные возможности классификаций солидных опухолей, не учитывающих соотношение опухолевых и стромальных клеточных элементов, а также возможности профилирования генотипа единственных опухолевых клеток и опухолевое микроокружение.

В самом деле, расширение использования техники РНК-секвенирования одной клетки опухоли демонстрирует наличие множественных подтипов клеточных элементов в рамках материнской опухоли ТН РМЖ. Это показывает, что секвенирование генетического материала, полученного из препарата (образца) опухоли, и связанное с этими результатами прогнозирование рецидивирования, выживаемости и ответа на фармакотерапию не может служить аккуратным методом, отражающим сущность биологических процессов в опухоли с точки зрения взаимодействия ее клеток с нормальными стромальными клетками и другим микроокружением [230]. Различия в превалировании внутриопухолевой гетерогенности между ТН и ЭР-позитивным РМЖ во многом объясняют сохраняющиеся до сегодняшнего дня ограничения широкого – рутинного – применения в клинической практике коммерческих наборов для изучения экспрессии генов с целью прогнозирования рецидивирования, выживаемости и ответа на химиотерапию пациенток с ТН РМЖ.

Здесь необходимо остановиться еще на одной попытке выделить стабильные опухолевые молекулярные фенотипы среди ТН РМЖ. Используя технику анализа экспрессии генов, M. D. Burstein и коллеги разделили заболевание на 4 фенотипа: LAR, мезенхимальный (MES), базально-подобный иммуносупрессивный (BLIS) и базально-подобный иммуноактивированный (BLIA) [228]. Интересным оказалось то, что наилучший прогноз опухолеспецифической выживаемости

продемонстрировал BLIA-фенотип, тогда как наихудший – BLIS-фенотип. Кроме того, были установлены межклассовые различия в числе специфических ДНК-копий: например, фокальные мутации 11q13 (*CCND1*-, *FGF*-семейства) у LAR-фенотипа и гиперэкспрессия *CTLA4* при фенотипе BLIA. В другом исследовании, объединившем исследования соматических мутаций и экспрессии генов первичного РМЖ всех классов по METABRIC датасету, были идентифицированы 10 интегративных кластеров, в которых Int Clust 10 демонстрировал наибольший перекрест с PAM50 базально-подобными опухолями и характеризовался точечными мутациями в 5-й позиции, 8q, 10p, 12p [232]. Как показывают работы, исследующие перекресты между различными молекулярными классификациями и градациями, основанными на экспрессии генов, сильная корреляция была установлена между PAM50 базально-подобным ТН РМЖ, Lehmann-овскими BL1 / BL2 и Baylog-овскими BLA / BLIS-субтипами [233 - 243], что еще раз доказывает высокую стабильность базального молекулярного типа ТН РМЖ.

Перечисленные исследования также подчеркивают наследственный характер проблем классификации, ассоциированный с определением ТН РМЖ, поскольку существующие градации не отражают всецело существующие молекулярные профили заболевания. Что, однако, кажется вполне определенным, так это то, что люминальный (ЭР-позитивный и АР-позитивный) и нелюминальный (базальный и мезенхимальный) раки имеют кардинально отличающиеся друг от друга эволюционные паттерны. Последнее, по крайней мере отчасти, является отражением эпигенетического профиля нормальных клеток молочной железы, являющихся источником описываемых молекулярных типов опухоли. Таким образом, совершенствование классификационных подходов, основанных на эпигенетическом профилировании и количественных измерениях внутриопухолевой клеточной гетерогенности, может существенно

продвинуть наше понимание клинического поведения отдельных классов ТН РМЖ.

1.6 Белковые маркеры тройного негативного рака молочной железы как потенциальные мишени для конъюгатов антител – лекарство

Выделение поверхностных гликопротеинов клеток эпителиальных злокачественных опухолей инициировало формирование конъюгатов антител – лекарственное химиотерапевтическое средство для направленного создания высоких концентраций лекарственных цитотоксических средств в цитоплазме клеток, экспрессирующих антитело-связывающие молекулы. При этом, такие молекулы не всегда опухолеспецифичны или специфичны для РМЖ, а часто для создания конъюгатов используется целый ансамбль экспрессирующихся поверхностных молекул.

Многие подобные конъюгаты продемонстрировали впечатляющую активность при ТН РМЖ. В частности, сацитузумаб говетикан (IMMU-132), конъюгат SN-38-антитело, направлен на взаимодействие с TROP2, экспрессирующегося почти у 90 % пациенток с ТН РМЖ [244]. У женщин с леченым метастатическим ТН РМЖ применение IMMU-132 обеспечивало 30 % частоту ремиссии метастатического процесса с медианой выживаемости без наступления прогрессии и общей выживаемостью в 6 и 16,6 мес. соответственно.

LIV-1 представляет собой трансмембранный белок с металлопротеиназной активностью, который экспрессируется в 68 % образцов метастатического ТН РМЖ. Ладиратузумаб ведотин (SGN-LIV1A) с монометил-ауристатином-Е (ММАЕ) в качестве химиопрепарата показал 25 % частоту ремиссий в подобной популяции пациенток с ТН РМЖ с медианой до продолжения прогрессии опухоли, равной 11 мес. [245].

В 40 % случаев ТН РМЖ экспрессирует гликопротеин-NMB (25 % опухолевых клеток позитивно окрашиваются на gpNMB). Применение в

данной группе женщин глембатузумаба ведотина (антительного конъюгата CDX-011, являющегося носителем для ММАЕ) позволяет достигать ремиссии в 40 % случаев в сравнении с отсутствием ремиссий вообще при самостоятельном выборе тактики лечения врачом в группе сравнения [245]. Однако при сравнении с капецитабином в группе gpNMB-гиперэкспрессирующего ТН РМЖ в исследовании второй фазы METRIC глембатузумаб ведотин не показал улучшения выживаемости, подавления прогрессии опухоли, что привело к прекращению его разработки¹. Вместе с тем SGN-LIV1A в настоящее время проходит вторую фазу клинических исследований, тогда как IMMU-132 перешел на третью фазу клинических испытаний².

Учитывая превалирование описанных протеиновых маркеров при ТН РМЖ, как правило, для начала терапии нет необходимости проводить предварительное ИГХ исследование, тогда как в случае о реже экспрессирующимися с белками это сделать необходимо для идентификации пациентов с наибольшим ответом на соответствующую терапию с использованием конъюгатов антител.

1.7 Соматические генетические повреждения при тройном негативном раке молочной железы

Раки концентрируют в себе многочисленные генетические повреждения, хотя справедливости ради необходимо подчеркнуть, что лишь небольшая их часть имеет отношение к тому, что сегодня известно как опухолевые драйверы [246]. Широкомасштабное секвенирование экзона и таргетное секвенирование первичных опухолей молочной железы показали наличие многочисленных мутаций в генах предполагаемых опухолевых

¹Celldex's METRIC Study Press release, April 16, 2018; <https://globenewswire.com/news-release/2018/04/16/1471890/0/en/Celldex-s-METRIC-Study-in-Metastatic-Triple-negative-Breast-Cancer-Does-Not-Meet-Primary-Endpoint.html>.

²ASCENT: NCT02574455.

драйверов при ТН РМЖ [247 - 249]. Средняя частота мутаций при базально-подобных опухолях молочной железы составляет 1,68 мутаций на мегабазу (Mb); опухоли, частота мутаций в которых превышает три средних значения (более 4,68 мутаций/Mb), считаются гипермутантными [250]. На основе группировки альтераций генов в опухолевых драйверах, выявленных при NGS-секвенировании, были предложены взаимосвязи этих альтераций с теми сигнальными путями, ДНК-повреждениями и регуляторами клеточного цикла, в экспрессии элементов которых участвуют альтерированные гены: PI3K / АКТ и RAS / MAPK и др. (таблица 1) [250 - 253].

Большинство соматических мутаций при ТН РМЖ выявлены в опухолевых генах-супрессорах (*TP53*, *RBI* и *PTEN*), которые, к сожалению, до сих пор находятся вне эффективного фармакотерапевтического таргетирования. Хотя и с меньшей частотой онкогенные альтерации в PI3K / АКТ сигнальном пути также были описаны и при базально-подобном ТН РМЖ (7 % PIK3CA мутаций, 28 % АКТ-амплификаций) [250], что позволяет относить пациенток – носителей мутаций к определенным протоколам противоопухолевой химиотерапии. Таргетное секвенирование препаратов опухоли после проведения неoadьювантной химиотерапии показало наличие мутаций хотя бы одного из перечисленных сигнальных путей более чем в 90 % случаев [253].

Однако только у трех генетических повреждений доказано наличие статистической роли в прогнозировании опухолеспецифической выживаемости (*JAK3*-амплификация, *BRCA1*-мутация – неблагоприятный прогноз; *PTEN*-альтерации – лучший прогноз выживаемости). Лекарственные средства, ингибирующие указанные сигнальные пути, были подробно изучены в рамках клинических испытаний при ТН РМЖ [250, 251].

Учитывая невероятную сложность генетического пейзажа при ТН РМЖ, анализ одиночных мутаций в предполагаемых опухолевых драйверах представляется несущественным [250; 252 - 263]. Различные процессы и

обстоятельства - возраст, воздействие канцерогенов, нарушения восстановления ДНК, семейство АРОВЕС цитидин-диаминаз - вносят свой вклад в мутационный паттерн ракового генома.

Таблица 1 - Взаимосвязь выявляемых мутаций при эпигеномном секвенировании образцов опухолей с ключевыми сигнальными путями (пояснение в тексте) [253]

TCGA (basal-like; ref. 36)	Genomic alteration (frequency, %)
p53 pathway	TP53 mut (84), gain of MDM2 (14)
PI3K/PTEN pathway	PTEN mut/loss (35), INPP4B loss (30), PIK3CA mut (7)
RB1 pathway	RB1 mut/loss (20), CCNE1 amp (9), high expression of CDKN2A, low RB1 expression
METABRIC (ER-negative; ref. 37)	Mutated gene (frequency, %)
AKT signaling	PIK3CA (24), AKT1 (2), PTEN (4), PIK3R1 (3), FOXO3 (1)
Cell-cycle regulation	RB1 (4), CDKN2A (1)
Chromatin function	KMT2C (9), ARID1A (3), NCOR1 (2), PBRM1 (3), KDM6A (2)
DNA damage and apoptosis	TP53 (77), BRCA1 (3), BRCA2 (3)
MAPK signaling	NF1 (4), MAP3K1 (3), MAP2K4 (1), KRAS (1)
Tissue organization	CDH1 (3), MLLT4 (3)
Transcription regulation	TBX3 (2), RUNX1 (2), GATA3 (1), ZFP36L1 (1), MEN1 (1)
Ubiquitination	USP9X (3), BAP1 (3)
Other	ERBB2 (3), SMAD4 (1), AGTR2 (1)
Residual disease post-neoadjuvant chemotherapy (triple-negative; ref. 39)	Genomic alteration (frequency, %)
Cell cycle	RB1 loss (11), CDKN2A loss (9), CDKN2B loss, CDK4 amp, CDK6 amp (6), CCND1 amp (6), CCND2 amp (6), CCND3 amp (6), CCNE1 amp (6), AURKA amp
PI3K/mTOR pathway	PTEN mut/loss (16), PIK3CA mut/amp (12), PIK3R1 mut/amp, AKT1 amp, AKT2 amp, AKT3 amp (7), RAPTOR amp, RICTOR amp, TSC1 truncations/mut
Growth factor receptor	IGF1R amp (6), EGFR amp (4), MET amp, KIT amp, FGFR1 amp, FGFR2 amp, FGFR4 amp
RAS/MAPK pathway	KRAS amp/gain (7), BRAF amp/gain, RAF1 amp/gain, NF1 truncations (7)
DNA repair	BRCA1 truncations/loss/mut (11), BRCA2 truncations/loss/mut, ATM mut
JAK2/STAT3 pathway	JAK2 amp (10)

Таким образом, идентификация отдельных молекулярных механизмов, выявление внешних и внутренних обстоятельств развития опухоли представляются проблемой чрезвычайной актуальности, далекой от разрешения. Выделение и обоснование надежных маркеров, с одной стороны, определяющих клиническое течение и прогноз РМЖ, а с другой – ответ на те или иные фармакотерапевтические воздействия, в рамках отдельных клинических групп является тем более сложной задачей, поскольку вносит дополнительные лимитации в научно-клинический поиск.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ввиду того что основной фабулой научной проблемы, определившей необходимость проведения представленного диссертационного исследования, является выявление некоторых важнейших молекулярно-морфологических закономерностей возникновения, течения и прогноза развития, а также молекулярно-генетической характеристики тройного негативного рака молочной железы, при подготовке и планировании работы, разработке ее концепции, плана, дизайна мы руководствовались фундаментальными принципами построения поискового исследования, а именно: объективности; учёта непрерывного изменения, развития исследуемых явлений; единства логического и исторического; системности изучения процесса с учетом всех его требований; восхождения от абстрактного к конкретному и от конкретного к абстрактному.

Рак молочной железы – один из наиболее часто встречающихся видов злокачественных опухолей у женщин, занимающий второе место в структуре смертности после рака легких [1, 2]. По мировым данным, заболеваемость раком молочной железы составляет более 1 800 000 новых случаев ежегодно [1]. Признанным диагностическим стандартом является проведение скрининговой рентгеновской маммографии с томосинтезом или без него, с классификацией вероятности злокачественного процесса по шкале Американского радиологического общества BI-RADS, с последующим проведением УЗИ и / или МРТ молочных желез и при выявлении очаговых образований или локальной перестройки структуры, полиморфных кальцинатов – биопсии образования с гистологическим исследованием биоптата. Рак молочной железы является гетерогенной патологией, включающей несколько различных форм с независимыми патологическими механизмами развития и соответственно разными вероятными исходами. Несмотря на сходные клинко-морфологические характеристики опухоли,

течение опухолевого процесса у разных пациентов может различаться. Существующие прогностические модели прогнозирования течения обладают серьезными недостатками. Важным молекулярным открытием в исследованиях РМЖ последних десятилетий можно считать выделение четырех его типов: люминального А, люминального В, HER-позитивного и тройного негативного, которые являются формами с разным течением и агрессивностью. При этом сам тройной негативный рак молочной железы молекулярно неоднороден и включает базальноподобный, небазальноподобный формы. Молекулярные маркеры позволяют произвести разделение по двум формам еще на ранних этапах. Однако до настоящего времени не определен молекулярный маркер, на основе оценки которого можно было бы объективно спрогнозировать течение патологического процесса, а также витальные перспективы пациенток – представительниц различных этнических групп. Разумной альтернативой может быть применение панели опухолевых маркеров. Поиск такого маркера / диагностической панели необходим, поскольку стратификация пациенток для осуществления наиболее точного прогнозирования течения опухолевого процесса является краеугольным камнем для подбора индивидуализированного лечения, требованием времени и лежит в основе теории и практики персонализированной медицины.

2.1 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. Схематически дизайн работы представлен на рисунке 3.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

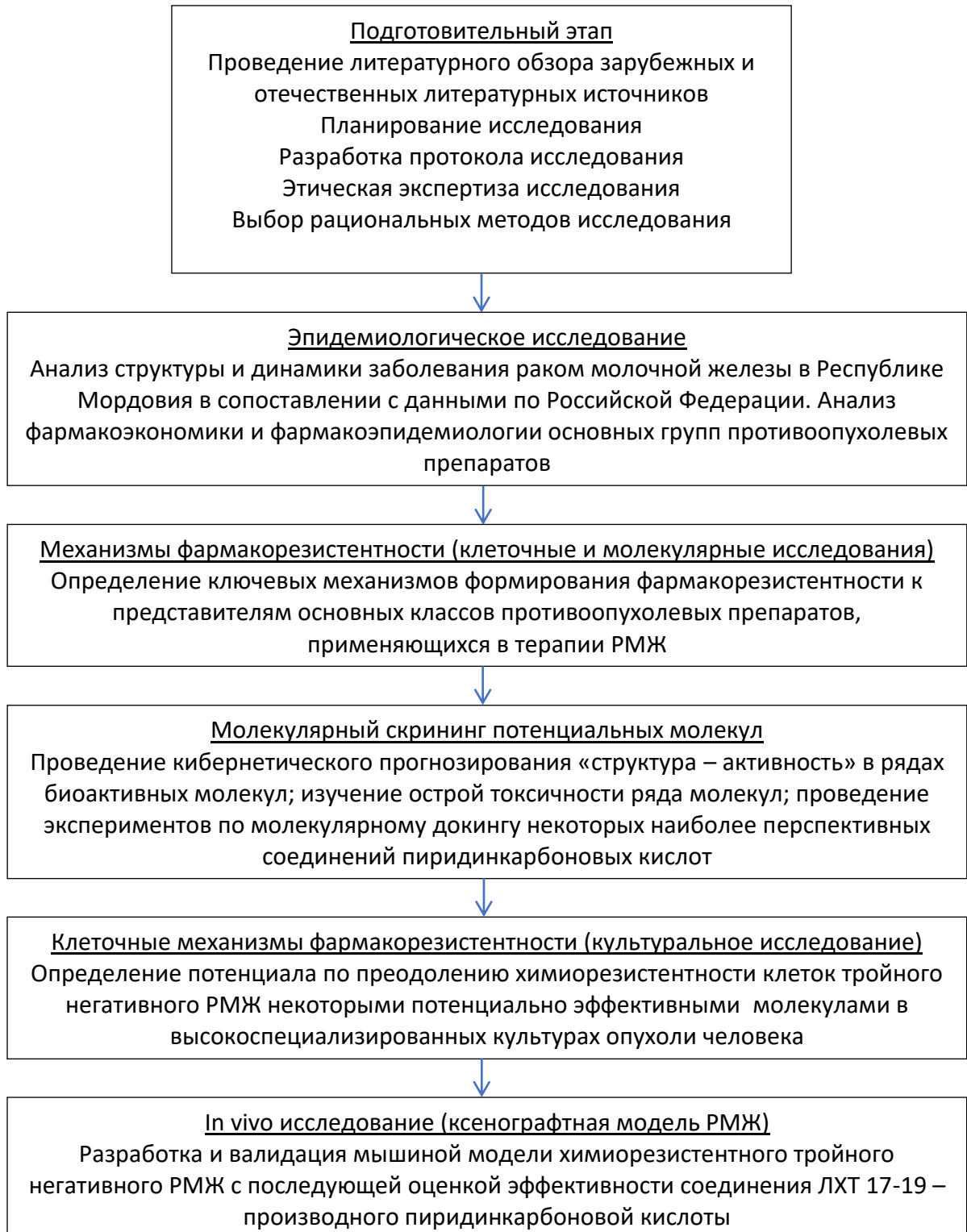


Рисунок 3 – Схематизированный дизайн исследования

На первом – подготовительном – этапе мы поставили перед собой задачу провести аналитический обзор современных направлений в области понимания механизмов формирования и течения злокачественного процесса с локализацией в молочной железе с акцентом на оценку роли систем внутри- и внеклеточной сигнализации в регуляции опухолевой прогрессии при тройном негативном РМЖ в отечественной и мировой науке, установить ключевые тренды и критические механизмы в области поиска новых надежных и перспективных технологий прогнозирования общей и специфической выживаемости пациенток, обладающих, с одной стороны, высокими чувствительностью и специфичностью, а с другой - наделенных оптимальным с точки зрения современных клинических требований профилем локальной и системной безопасности.

Нам было важно на данном этапе определить место планируемого исследования в научном континууме современной молекулярной онкофармакологии и патологической анатомии с позиций актуальности, потенциальных научной новизны и практической значимости результатов работы.

На подготовительном этапе нами был также разработан детальный план исследования, составлены подробные протоколы, сформирована, систематизирована и проанализирована база ретроспективных данных пациенток с тройным негативным раком молочной железы, осуществлена этическая экспертиза материалов диссертационной работы.

Помимо прочего, первый этап исследования был посвящен также выработке методологической и методической стратегии работы. Для достижения поставленных цели и задач мы посчитали обоснованным провести доклиническое молекулярно-фармакологическое и экспериментально-патологоанатомическое исследование. При выборе экспериментальных, морфологических, молекулярно-генетических,

биохимических, математических методов исследования мы использовали доступные отечественные и зарубежные источники.

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

В рамках данного этапа была дана медико-социальная характеристика населения региона и представлена 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 проанализированы исходы применения хирургических, лучевых, химиотерапевтических и комбинированных методов лечения в зависимости от основной онкологической патологии. Для решения поставленных в работе задач на первом этапе были выделены следующие исследовательские приоритеты:

- 1) Оценка медико-демографических закономерностей развития региона за период с 2011 по 2020 год.

- 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) Выявление 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 формировании групп учитывали этническую и возрастную характеристику пациентов.

Реализация мероприятий исследования на втором – молекулярно-фармакологическом и экспериментально-патологоанатомическом этапе – включала прогностический, скрининговый, *in vitro* и *in vivo* разделы. В рамках молекулярно-генетического этапа проводили определение уровня экспрессии следующих биологических маркеров:

1) определение иммуногистохимическим методом уровня экспрессии фактора транскрипции HER-2, регулирующего клеточную дифференцировку эпидермальных клеток человека;

2) определение иммуногистохимическим методом уровня экспрессии фактора Ki-67, являющегося маркером опухолевого поражения молочной железы;

3) определение уровня экспрессии рецепторов половых гормонов – эстрогенового, прогестеронового;

4) определение генетического варианта мутаций гена BRCA и функционально связанных генов;

5) определение уровня экспрессии гена *EGFR* и генетического варианта мутаций гена *EGFR*;

6) определение методом секвенирования по Сэнгеру уровня экспрессии специфичной для рака молочной железы панели микроРНК []: микроРНК-200а и микроРНК-145 с доказанной значимостью в регуляции явлений фармакорезистентности.

Кроме того, был проведен отдельный экспериментальный этап работы по разработке ксенографтной модели химиорезистентного тройного

негативного рака молочной железы и ее патоморфологической валидации, описанию которого посвящен отдельный параграф настоящей главы.

На заключительном этапе диссертационного проекта была проведена математическая и статистическая обработка результатов исследования, сформулированы выводы, практические рекомендации, представлено обобщенное видение перспектив дальнейшего развития рассматриваемой темы.

2.2 Этические, регуляторные и нормативные процедуры при проведении исследования

План, дизайн и протоколы ретроспективно-эпидемиологического этапа и экспериментального исследования в рамках настоящего диссертационного проекта прошли экспертизу на соответствие действующим нормативно-правовым требованиям в области проведения исследований с участием животных и человеческого биологического материала на заседании Локального этического комитета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева» от 26 декабря 2019 года (протокол №81).

Исследование выполнено в соответствии с положениями следующих законодательных и нормативных актов, принятых для подобного рода исследований в Российской Федерации:

1. Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ (последняя редакция).

2. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

3. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной

практики».

4. ГОСТ 33044- 2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт Российской Федерации).

5. ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 сентября 2005 г. № 232-ст) (Национальный стандарт Российской Федерации).

2.3 Методы проведения эпидемиологического раздела исследования.

Математические методы обработки информации

Планирование эпидемиологического этапа исследования предполагало в том числе формирование релевантной совокупности, проведение анализа которой позволило бы получить репрезентативные результаты.

Объем совокупности был рассчитан по формуле:

$$n = (t^2 \sigma^2 N) / (\Delta^2 N + t^2 \sigma^2), \quad (1)$$

где n – объем совокупности; σ – дисперсия, или мера рассеивания исследуемого признака, характеризующая величину отклонения от средних величин в генеральной совокупности; t – коэффициент доверия (критерий достоверности); Δ - предельная ошибка выборки; N – численность генеральной совокупности.

Кроме того, рассчитали относительные величины, характеризующие половозрастную характеристику популяции региона, его социально-экономическое развитие, охарактеризовали структуру общей и онкологической заболеваемости населения, структуру и динамику заболевания РМЖ в зависимости от возраста, морфологического варианта, стадии и клинической группы заболевания; провели анализ фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии.

2.4 Фармакологические вещества и лекарственные препараты, изученные в диссертационной 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 2 представлена краткая характеристика соединений – производных пиридинкарбоновых кислот.

Таблица 2 - Краткая характеристика производных пиридинкарбоновых кислот, изученных в работе

№ п/п	Шифр соединения	рН, растворимость	Молекулярный вес	Химическая структура
1	2	3	4	5
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-аминоэтансульфоат магния) дипропил-2-этанамид
3.	ЛХТ-13-19	6,5 Мало растворим в	213,24	3-пиридинкарбамид 2-амино-5 метилпиридин

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		воде, суспензия в твине 80		
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)-4H- 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- гидроксипутандиоата
8.	ЛХТ-18-19	6,5 Растворим в воде	275,49	дихлоро-(гидразид-4- пиридиноата)-N,O цинка

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 [264, 265].

2.5 Лабораторные животные и культуры клеток, использованные в диссертационной работе

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 массой 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» (Национальный стандарт Российской Федерации).

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 тройного 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.

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 mM глутамина и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки во влажной атмосфере с 5 % содержанием углекислого газа при температуре 37 °C.

Первоначально клетки каждой опухолевой линии рассеивались в количестве 8×10^3 штук на лунку в 96-ячеечный планшет.

Фармакологическое воздействие на культуру осуществляли 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).

2.6 Методика изучения острой токсичности

Острую токсичность производных пиридинкарбоновых кислот и 2-аминохромена изучали при внутривенном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении в строгом соответствии с действующими национальными и международными рекомендациями по проведению токсикологического исследования [264 - 266].

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 [264 - 266].

При определении острой токсичности при внутривенном введении соединение вводилось в вену хвоста фиксированного бодрствующего животного, которому регистрировалась неинвазивная ЭКГ («Kent Scientific Inc.», США). Количество подаваемого вещества регулировалось при помощи

двухканального программируемого инфузомата (Kent Scientific Inc., США). Регистрировали дозу, вызывающую гибель животного. Рассчитывали показатель ЛД₁₀₀.

2.7 Метод проведения экспериментов по молекулярному докингу

Виртуальный скрининг сегодня уже вошел в методический арсенал при разработке новых биологически активных соединений и академической наукой, и фармацевтическими фирмами - разработчиками новых лекарств. Одним из самых перспективных методов виртуального скрининга является молекулярный докинг. Докинг-исследования – это первый шаг поиска активных соединений из огромного арсенала существующих библиотек, он является неотъемлемой частью проекта по разработке новых биологически активных веществ. Многие фармацевтические компании имеют собственные библиотеки, которые могут содержать миллионы соединений. Содержать библиотеку и проводить скрининг с высокой пропускной способностью очень затратная процедура. Виртуальный скрининг обеспечивает альтернативный подход для скрининга миллионов соединений с небольшими затратами времени и средств [267].

Молекулярный докинг – это один из методов молекулярного моделирования, который предназначен для анализа взаимодействия молекул на атомном уровне. Это современный научный метод, который заключается в исследовании взаимодействия двух или более молекул [268]. Молекулярный докинг является одним из самых применяемых методов виртуального скрининга, особенно когда доступна трехмерная структура целевого белка. Пространственные 3D-структуры биологических мишеней собраны в единой базе Protein data bank и находятся в свободном доступе. Основной задачей докинг-исследований является поиск возможных способов связывания одной молекулы (лиганд) с другой (мишень), то есть образование оптимальных пространственных структурных комплексов и выявление

активного сайта (лиганд-связывающий центр) и фрагментов молекулы, которые способствуют связыванию. Исходной информацией для проведения докинговых исследований служат трехмерные 3D-структуры белка (рецептора, фермента) и лиганда, конформационная подвижность и взаимное расположение которых моделируются в процессе исследований. Проведение докинговых исследований заключается в подборе низкомолекулярного объекта (лиганда), наилучшим образом соответствующего "активному сайту" высокомолекулярного объекта.

Образование комплекса (докинг) сопровождается формированием водородных, электростатических, ван-дер-ваальсовых связей между мишенью и лигандом и осуществляется с помощью операции, при которой одну молекулу приближают к другой, постоянно вычисляя энергию взаимодействия между ними при различных ориентациях и конформациях, постепенно устанавливая выгодную взаимную ориентацию. Зная пространственную структуру молекулярной мишени и пространственную структуру лиганда, можно на молекулярном уровне объяснить механизм взаимодействия лиганда с белком, рассчитать аффинность или сродство (силу связывания) лиганда к мишени. Аффинность равна концентрации лиганда, при которой половина мишеней связывается с лигандом. Вычисленные значения не являются настоящей переменной свободной энергии связывания, то есть силами взаимосвязи между экспериментально определенной биологической активностью и прогнозируемой прочностью связывания. Для оптимального использования ограниченных вычислительных ресурсов молекулярного докинга были разработаны различные вычислительные функции, которые могут предсказать, насколько прочной является связь между химическим соединением и целевым белком. Основное назначение оценочной функции докинга – отображать свободную энергию связывания лиганда (ΔG). Существует несколько точных подходов для расчета свободной энергии связывания и сродства к связыванию [269].

Оценочная (скоринговая) функция обычно состоит из различных терминов для описания различных межмолекулярных взаимодействий и их вклада в общую прочность связывания. Однако существуют трудности учета некоторых условий межмолекулярного взаимодействия, такие как эффекты сольватации и изменение энтропии. При моделировании потенциально активных молекул вещество может иметь лучший терапевтический эффект, если оно имеет более высокое сродство к связыванию и долгое время пребывания в кармане сайта для связывания.

Знание оптимальной молекулярной ориентации лиганда в активном сайте рецептора может быть использовано для предсказания силы аффинитета или родства с соответствующими белками, то есть выявления ингибиторов того или иного фермента или рецептора, что служит ключевым звеном в патогенезе любого заболевания. Лиганды с прогнозируемой аффинностью будут в биологических экспериментах лучше блокировать молекулярную мишень. Использование результатов докинговых исследований позволяет сократить затраты средств и времени на поиск новых фармакологически активных соединений за счет проведения виртуальной процедуры, аналогичной высокопроизводительному биологическому скринингу.

Программный пакет Autodock 4.2. предусматривает проведение гибкого рецепторно-ориентированного молекулярного докинга в виртуальных условиях, которые дают возможность максимально приблизить образование комплекса между исследуемой молекулой и рецептором к условиям, которые существуют в биологических системах.

В качестве мишеней для проведения докинга на противоопухолевую активность нами использованы 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 4G-квадруплексной ДНК

(PDB ID: 6KN4). Выбор биомиметической молекулы был нами обоснован с учетом уже известных механизмов образования опухолевых клеток (см. раздел Результаты).

Для докинговых исследований была выбрана молекула 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипропандиоват ЛХТ-17-19 (рисунок 4).

Молекула ЛХТ 17-19 представляет собой соль, образованную 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-оном и остатком 2-гидроксипропандиоватом (яблочная кислота). Поскольку дикарбоновые кислоты являются естественными метаболитами организма человека, то можно предположить, что введение их остатка в качестве анионной части должно привести к улучшению биодоступности и снижению токсичности. Яблочная кислота является промежуточным продуктом цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного цикла, поэтому после диссоциации целевой соли дальнейшая роль анионного остатка очевидна.

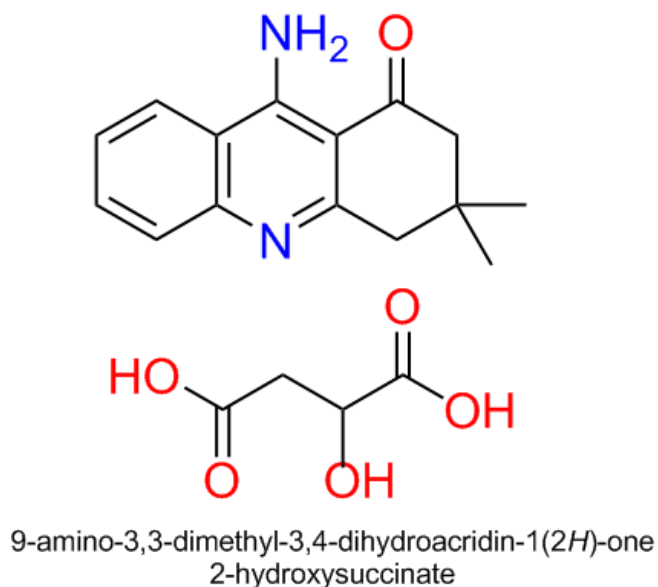


Рисунок 4 – Объект докингового исследования ЛХТ 17-19

Поэтому объектом докинговых исследований было выбрано основание молекулы ЛХТ 17-19 – 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-он.

Наличие гетероатома азота и насыщение атомом кислорода дигидроакридиновой системы может вызвать появление межмолекулярных взаимодействий с остатками аминокислот активного сайта биомишеней. Наличие аминогруппы может привести к появлению водородных связей, а метильные фрагменты - к появлению гидрофобных взаимодействий, что важно для дополнительной стабилизации целевых комплексов «молекула - мишень».

Для рецепторно-ориентированного гибкого докинга использовали пакет программ Autodock 4.2. Подготовка лигандов проводилась с помощью программы MGL Tools 1.5.6. Оптимизация лигандов осуществлялась с помощью программы Avogadro. Для 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 – 1 000,
- максимальная начальная энергия - 0,
- максимальное число попыток – 10 000,
- количество структур в популяции - 150,
- максимальное число этапов оценки энергии – 2 500 000,

- максимальное число генераций – 27 000,
- 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.

2.8 Методы экспериментального туморигенеза

В своей работе мы использовали три метода экспериментального туморигенеза: сингенную модель у мышей, ксенографтную модель у гуманизированных мышей и инновационную платформу – органоидную модель тройного негативного рака молочной железы человека.

2.8.1 Модель сингенной опухоли у мышей

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.

Выбор опухолевой системы был обусловлен высокой злокачественностью опухолевого штамма, его радио- и

химиорезистентностью, тотальным метастазированием в брюшину с развитием асцитного варианта лимфолейкоза и гибелью 100 % животных после инокуляции опухолевых клеток.

2.8.2 Модель ксенографтного тройного негативного рака молочной железы у гуманизированных мышей

Для формирования базовой модели воспользовались методом, описанным Powell с соавт. (2020), в нашей модификации [270]. Схематически технология изображена на рисунке 5.

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.

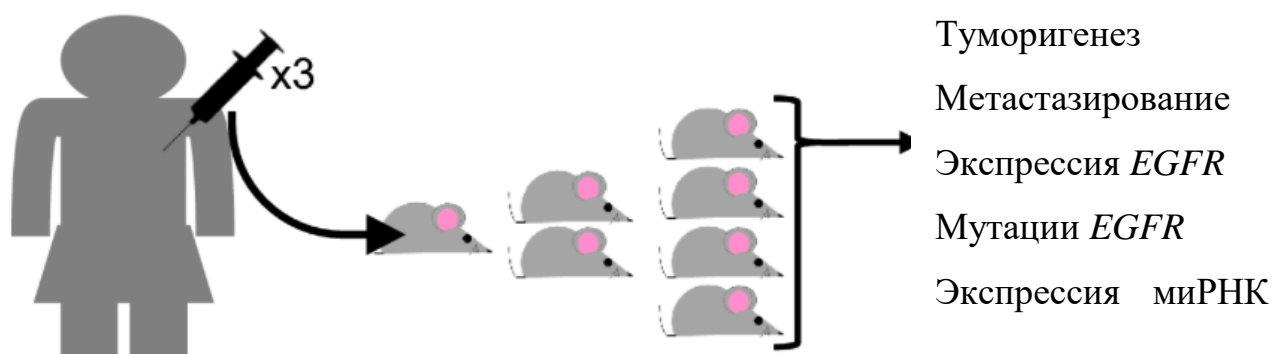


Рисунок 5 – Схема постановки эксперимента на ксенографтной модели тройного негативного рака молочной железы по Powell с соавт. (2020) в модификации автора (пояснения в тексте)

Краткая характеристика субъектов – доноров опухолевой ткани – представлена в таблице 3. Предъявляли и неукоснительно выполняли следующие требования для биопсийного материала: объем ткани не должен был быть менее 10 мм³. Сразу же после взятия биопсийный материал помещали в контейнер с предварительно охлажденной транспортной средой. Обязательно из той же области отбирали второй фрагмент биопсийного материала для проведения гистологического исследования.

По результатам визуального обследования препарата опухолевых фрагментов доля площади, занятой опухолевыми клетками, должна быть более 80 %. По результатам гистологического исследования препарата опухолевых фрагментов доля площади, занятой опухолевыми клетками, должна быть более 20 % от общей площади ткани. Доля площади, занятая некротическими массами, не должна превышать 40 % от общей площади ткани.

Таблица 3 - Характеристика пациентов – доноров биологического опухолевого материала

Возраст, лет	Локализация	Гистологический тип	Клиника	Воспроизведение ксенографта
74	ПМЖ	Тубулярная карцинома	РОКД	+
68	ПМЖ		СУ	-
47	ЛМЖ	Тубулярная карцинома	РОКД	-

Примечание. РОКД – ГБУЗ РМ Республиканский клинический онкологический диспансер (г. Саранск); СУ – Клиника онкологии Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); ПМЖ – правая молочная железа; ЛМЖ – левая молочная железа.

Тонко нарезанный с помощью микрохирургических ножниц («World Precision Instruments», США) материал разделяли на три приблизительно равные части:

- для гистологического и иммуногистохимического исследования (использовали предварительно заполненные забуференным 10 % формалином контейнеры «HistoPot» (США));
- для мгновенного замораживания (экстракция ДНК / РНК и последующие эксперименты по изучению экспрессии генов, микроРНК, мутации генов);
- для инокуляции лабораторным животным.

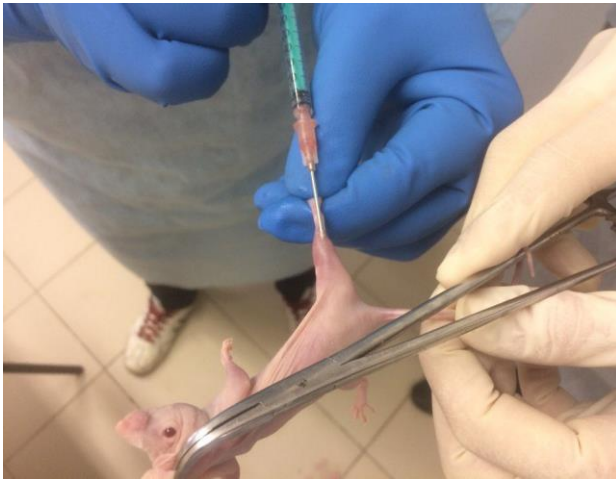
С целью моделирования ксенографтного туморигенеза использовали 4 - 6 недельных самок иммунодефицитных мышей BALB/c *nu/nu*, полученных из специального питомника «Пушино» – филиала ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков Щемякина и Овчинникова Российской академии наук. В целях гуманизации 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 цитофлуометрического 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 матригеле (рисунок 6). Контроль роста опухоли проводили путем визуального осмотра места инокуляции и пальпацией области. При появлении пальпируемого опухолевого образования осуществляли измерения узла (длина, ширина и высота) при помощи штангенциркуля. Нам удалось воспроизвести рост опухоли, полученной от женщины-эрзя в возрасте 74 лет с рецидивной опухолью правой молочной железы, которой была проведена трепанобиопсия в ГБУЗ РМ «Республиканский онкологический диспансер» (г. Саранск).

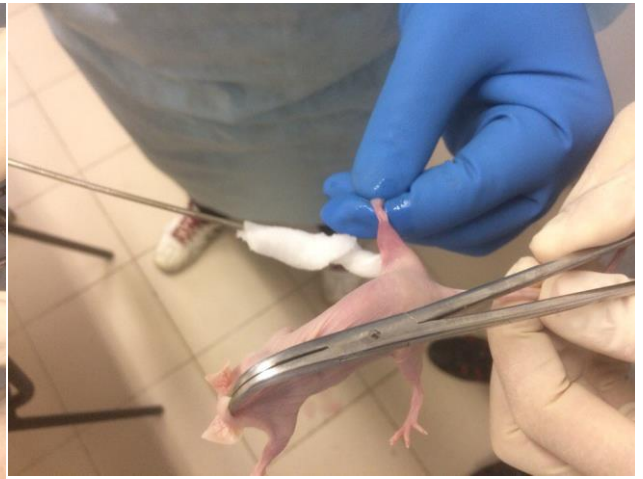
После достижения узлом размера 200 мм^3 животное-носитель выводили из эксперимента под ингаляционным наркозом севофлураном с использованием специальной наркозной установки производства компании RWD (США), после чего опухолевый узел извлекали, также разделяли на три неравные части: большую – для последующей перевивки и две другие – для гистологического исследования и криоконсервации (ДНК- и РНК-секвенирование). Опухолевую ткань перевивали трем животным, гуманизированным по вышеописанной технологии. Процедуру повторяли дважды.

Для финальной инокуляции группе из 30 животных использовали опухолевую ткань третьей генерации. Рандомизацию животных на три группы по 10 животных в каждой проводили случайным образом с использованием компьютерного генератора случайных чисел после достижения пальпируемой опухоли объема 150 мм^3 (приблизительно 10 -12 сутки после трансплантации опухолевых фрагментов).

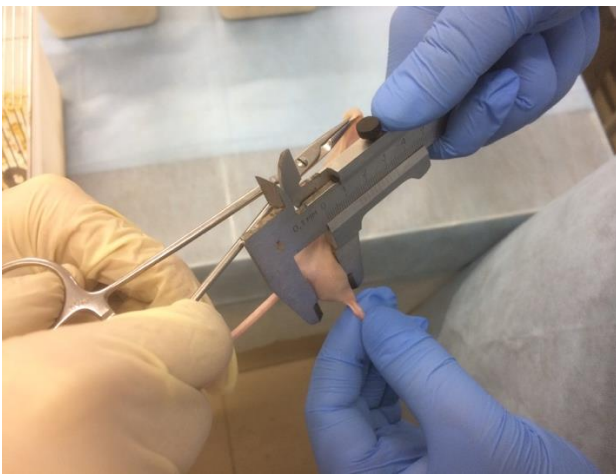
Противоопухолевое действие исследуемых веществ на сингенной модели и на модели ксенографтного рака молочной желез, а также антиметастатическое действие оценивали в соответствии с «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств» [271] и «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей» [272].



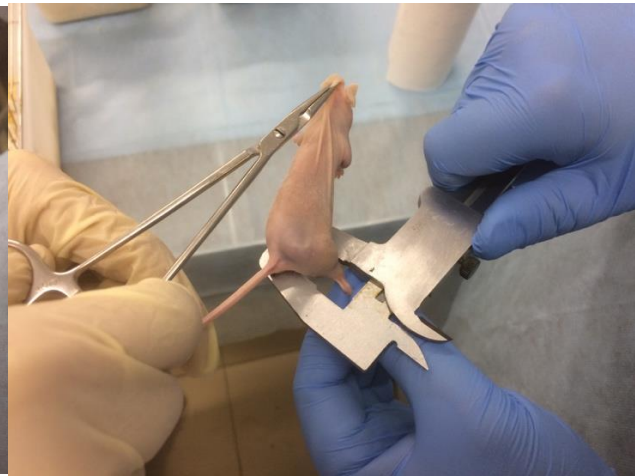
А



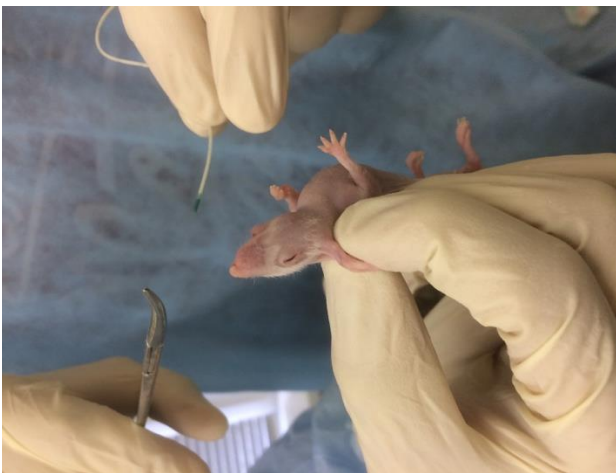
Б



В



Г



Д



Е

Рисунок 6 – Последовательность манипуляций с самками BALB/c *nu/nu*:
А и Б – фиксация и инокуляция фрагментов опухоли; В и Г –
осуществление измерений опухолевого узла; Д и Е – введение
лекарственных веществ с помощью специального зонда

Противоопухолевый эффект оценивали по объему первичного опухолевого узла и в конце эксперимента – по его массе. Размеры опухолей на месте трансплантации определяли с помощью штангенциркуля и рассчитывали объем по следующей формуле:

$$V=0,131 \times L \times (D1+D2)^2 \quad (2),$$

где L – длина опухоли; D1 и D2 – два других взаимно перпендикулярных диаметра.

Степень торможения роста опухоли определяется по показателю индекса K (соответствует торможению роста опухоли), вычисляемому по формуле:

$$K = (V_k - V_o) / V_k \times 100 \quad (3);$$

где V — средний объем опухоли (мм³) в получавшей вещество (о – опыт) и контрольной (к – контроль) группах соответственно на конкретный срок.

Антиметастатическое действие исследуемых веществ изучали на модели спонтанного метастазирования солидных опухолей – трижды негативного рака молочной железы.

Влияние исследуемых веществ на продолжительность жизни животных оценивали на мышах, наблюдение за которыми осуществлялось до их гибели (в данную группу будут включены 50 % мышей первоначально введенных в эксперимент) с построением кривой Каплана - Майера и последующим анализом выживаемости.

2.8.3 Органоидная модель экспериментального туморигенеза

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 России³.

Клетки опухоли были получены из хирургически удаленного легочного метастаза рака молочной железы 68-летней пациентки с рецидивной опухолью при полном соблюдении этических процедур. По поводу первичной опухоли пациентка получала неоадьювантную химиотерапию в составе циклофосфида, доксорубина, 5-фторурацила и тамоксифена.

Для получения первичной органоидной культуры ткань опухоли на первом этапе была измельчена острым способом с немедленным помещением в специальный консервационный раствор MACS производства «Miltenyi Biotech» (Германия), в котором мелкие фрагменты опухолевой ткани хранились в течение нескольких часов при температуре 4⁰С – время, необходимое для иммунофенотипирования и генотипирования материнской опухоли.

Затем фрагменты опухолевой ткани помещали в специальные колонки для гомогенизации gentleMACS C tube производства «Miltenyi Biotech» (Германия), в которые добавлялся специально приготовленный ферментативный коктейль для гомогенизации Tumor Dissociation Kit human производства «Miltenyi Biotech» (Германия) в следующем составе:

- модифицированная среда DMEM/F-12 («Thermo Fisher Scientific», США) – 2,2 мл;
- раствор Enzyme H («Miltenyi Biotech», Германия) – 100 мкл;
- раствор Enzyme R («Miltenyi Biotech», Германия) – 50 мкл;
- раствор Enzyme A («Miltenyi Biotech», Германия) – 12,5 мкл.

После герметичного закупоривания колонки она помещалась в диссоциатор gentleMACS Octo производства «Miltenyi Biotech» (Германия) с заданной программой «37C_h_TDK_3». Полученная после диссоциации

³ Автор выражает искреннюю благодарность заведующему 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.

суспензия центрифугировалась при 300 оборотах в минуту в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости осадок разбавляли 10 мл фосфатного буфера по Дульбекко (DPBS, «Thermo Fisher Scientific», США) и снова центрифугировали при 300 оборотах в минуту в течение 10 мин. После удаления супернатанта осадок разбавляли модифицированной средой DMEM/F-12 («Thermo Fisher Scientific», США).

После охлаждения колонок со средой, содержащей клетки опухоли, на льду их содержимое смешивали с основным мембранным матриксом, лишенным факторов роста, Matrigel («Corning», США) в соотношении 1:2.

Полученная суспензия в экстрацеллюлярном матриксе раскапывалась (по 50 мкл) в лунки 24-луночного планшета производства TPP (Швейцария) и инкубировалась в течение 20 мин во влажной среде CO₂-инкубатора при 5 % концентрации углекислого газа и температуре окружающей среды 37⁰C до застывания геля.

После этого в каждую лунку добавляли по 750 мкл полной клеточной культуральной среды («Thermo Fisher Scientific», США), и смесь инкубировалась во влажной среде CO₂-инкубатора при 5 % концентрации углекислого газа и температуре окружающей среды 37⁰C с замещением среды культивации каждые двое суток. Наблюдение за растущими органоидными структурами осуществляли на инвертированном микроскопе производства «Carl Zeiss» (Германия). Рекультивацию органоидов проводили каждые 2 недели.

2.9 Методы морфологического исследования

Ускорение темпов научного поиска в области биологической природы злокачественных новообразований обогатило современную науку достаточно широким спектром молекулярных механизмов, лежащих в основе сложных процессов формирования и эволюции опухолей. Для рака молочной железы в целом и тройного негативного его варианта в частности также доказана

специфичность ряда молекулярных маркеров, однако среди всего их многообразия нам необходимо было остановиться лишь на тех, чувствительность которых имеет особое значение с точки зрения поиска путей преодоления химиорезистентности. Именно поэтому чрезвычайно актуальны в современной науке возможности молекулярной патологической анатомии.

В результате анализа мы пришли к выводу, что в рамках исследований на лабораторных животных, а также органоидных культурах опухоли человека необходимы морфологическая валидация опухолевых образцов согласно 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 (HER-2, 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. Часть биологического материала подвергали заморозке для проведения молекулярно-генетических исследований.

Весь первичный опухолевый материал, а также ткани опухоли на этапах перевивки ксенографтного тройного негативного рака молочной железы изучали светооптическим методом при окрашивании гематоксилином и эозином по стандартной методике.

2.9.1 Методы иммуногистохимического исследования

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование – метод микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ и основанный на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому антигену. ИГХ-реакции 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, HER-2 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 с последующей тепловой индукцией (HIER) в восстанавливающем буфере на водяной бане при температуре 90–95 °С в течение 20–30 мин (с целью обновления структур антигенов перед иммуноокраской).

Дальнейший протокол исследования включал ингибирование эндогенной пероксидазы и трехэтапную иммуноферментную 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 осуществляли на микроскопе «Olympus» (Япония), снабженном цифровой фотокамерой, а анализ иммуногистохимических реакций - с использованием специальных морфометрических программ.

2.10 Молекулярно-генетические методы исследования, используемые в работе

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 экспрессии некоторых микроРНК, в частности микроРНК-200а, микроРНК 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 и Е. А. Самышиной [273, 274].

2.10.1 Способ изоляции ДНК и РНК

Свежие образцы опухолевых тканей или свежемороженые ткани непосредственно после разморозки погружали в литический буфер (0,6 мл раствора) «RLT Plus» производства «Qiagen» (Германия) для гомогенизации. Буфер содержал специальный гомогенизатор «TissueLyser LT» производства «Qiagen» (Германия) в силиконированных тубах «Lysing Matrix A» производства компании «MP Biomedicals» (США) и 1 % бета-меркаптоэтанол («Merch SIGMA-Aldrich», Германия) [273, 274].

Немедленно после гомогенизации осуществляли изоляцию ДНК и РНК с помощью специального набора для изоляции «All Prep DNA / RNA / miRNA Universal Kit» производства компании «Qiagen» (Германия) в строгом соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Измерение концентраций нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) осуществляли с помощью флуориметра марки «Qubit 4» производства компании «Thermo Fisher

Scientific Inc.» (США). С этой целью применяли экспертные диагностические наборы марок «Qubit RNA BR Assay» и «Qubit dsDNA HS Assay», произведенные компанией «Thermo Fisher Scientific Inc.» (США) [273, 274].

2.10.2 Способ проведения обратной транскрипции

В порядке пробоподготовки каждый образец, полученный в результате выделения нуклеиновых кислот, в количестве 0,1 мкг РНК (общей) смешивали с 20 пм специального праймера (олигонуклеотидного) обратной транскрипции (с целью установления уровня экспрессии *EGFR*, *BRCA1* и гена бета-актина (*ACTB*) были применены случайные декамеры, в то время как с целью установления уровня экспрессии микроРНК-145 и микроРНК-200а применяли специальные праймеры – олигонуклеотидные). Инкубацию реакционной смеси проводили в течение 2 мин в объеме 9 мкл при температуре 70⁰С с последующим охлаждением (на льду) [273, 274].

С помощью лабораторного набора марки «MMLV RT» производства компании «Евроген» (Россия) на протяжении 30 мин проводили реакцию обратной транскрипции при температуре 42⁰С в полном соответствии с рекомендациями фирмы - производителя реагентов. Реакция обратной транскрипции останавливала вследствие инкубирования реакционной смеси с ферментом обратной транскриптазой инактивирующей на протяжении 10 мин при температуре 70⁰С. 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 [273, 274].

2.10.3 Метод проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

Лабораторные опыты с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР) ставили с использованием

амплификатора марки «DTPrime» производства компании «DNA technology» (Россия). Диагностические наборы «qPCRmix-HS SYBR» производства компании «Evrogen» (Россия) применяли с целью детекции уровня экспрессии генов *EGFR*, *BRCA1* и *ACTB* в строгом соответствии с инструкциями фирмы - производителя реактивов. В объеме 25 мкл проводили амплификацию 1,5 мкл раствора соответствующей кДНК и 4 пм ПЦР праймера каждого вида. При проведении ПЦР в режиме реального времени использовался следующий лабораторный протокол [273, 274]:

1) денатурация молекул ДНК на протяжении 2 мин при температуре 95⁰С;

2) последовательность из 45 циклов реакций денатурации молекул ДНК на протяжении 10 секунд при температуре 95⁰С каждый; отжиг праймера на протяжении 3 сек. при температуре 67⁰С, фаза элонгации на протяжении 18 сек. при температуре 72⁰С;

3) анализ реакционной кривой с помощью специального программного обеспечения.

Экспрессия гена *EGFR* определялась с использованием следующих олигонуклеотидов:

Прямой праймер (*EGFRRT-F*) – 5'-CCCAAATGGGAGCTGTCTCG-3'.

Обратный праймер (*EGFRRT-R*) – 5'-CATCTCAGACACCAGGTCCG-3'.

Экспрессия гена *ACTB* определялась с использованием нижеследующих олигонуклеотидов:

Прямой праймер (*b-act-for*) – 5'-GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3';

Обратный праймер (*b-act-rev*) – 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'.

Экспрессия микроРНК, а также участка РНК-стандарта *RNU6-1* определялась с применением диагностических наборов марки «qPCRmix-HS»

производства компании «Evrogen» (Россия) в строгом соответствии с инструкциями компании-производителя. В объеме 25 мкл проводили амплификацию 1,5 мкл раствора соответствующей кДНК и 4 пм ПЦР праймера каждого вида. При проведении ПЦР в режиме реального времени использовался следующий лабораторный протокол [273, 274]:

1) денатурация молекул ДНК на протяжении 2 мин при температуре 94⁰С;

2) последовательность из 45 циклов реакций денатурации молекул ДНК на протяжении 10 сек. при температуре 94⁰С, отжиг праймера на протяжении 20 сек. при температуре 53⁰С, фаза элонгации на протяжении 20 сек. при температуре 72⁰С;

3) анализ реакционной кривой с помощью специального программного обеспечения «Chromas 2.6.6 software» производства «Technelysium» (Австралия) или хранение образцов при температуре 4⁰С.

Экспрессия микро-РНК-145 и микро-РНК-200а определялась с использованием следующих олигонуклеотидов:

1) МикроРНК-200а – обратной транскрипции праймер (*200a-RT*),
5'-GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACGACACATC
GTT-3';

прямой транскрипции праймер (*200a-Fw*), 5'-CCAGCTAAC
ACTGTCTGGT-3';

обратной транскрипции праймер *UR-3* – 5'-
CTGAGGCTCACTGAGACCT-3'.

2) МикроРНК-145 – обратной транскрипции праймер (*145-RT*),
5'-GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTGACACGACAG
GGATTC-3';

прямой транскрипции праймер (*145-FW*), 5'-CCACAG
TCCAGTTTTCCAG-3';

обратной транскрипции праймер *UR-3*, 5'-*CTGAGGCTCACTGAGACCT-3'*.

3) Малая ядерная РНК *U6* (snRNA): обратной транскрипции праймер *U6-RT*,

5'-*GTCGTGTCTGAGGCTGACTGAGACCTATTCGCACCTGACACGACGGCCATGC-3'*;

прямой транскрипции праймер (*U6-Fw*), 5'-*GGCCGCATACAGAGAAGATTA-3'*;

обратной транскрипции праймер (*U6-Rv*), 5'-*CTGAGGCTGACTGAGACCT-3'*.

Нижеследующие зонды, меченные флюоресцентной меткой, были нами использованы с целью детекции транскриптов:

- для микроРНК-145: (*Pb-145*) 5'-(*R6G*)-*ATTCGCACC(T-BHQ1)GACACGACAGGGATTC-p-3'*;

- для микроРНК-200а: (*200a-Pb*), 5'-(*R6G*)-*ATTCGCACC(T-BHQ1)CGACACGACACATCGTT-p-3'*;

- для *U6* мяРНК: (*U6-Pb*) 5'-(*R6G*)-*ATTCGCACC(T-BHQ1)GACACGACGGCCATGC-p-3'* [273, 274].

2.10.4 Метод определения точечных мутаций гена *EGFR*

Так называемые мутации горячих точек – наиболее часто регистрируемые мутации гена *EGFR* – определяли в кодонах 248 и 249. С этой целью осуществляли ПЦР-амплификацию экзона 3-го гена *EGFR* в режиме реального времени. Для этого использовали 0,1 г ДНК (геномной) из лабораторного набора «qPCRmix-HS» производства компании «Evrogen» (Россия) в сочетании с 10 пм олигонуклеотидного специфического праймера (прямой олигонуклеотидный праймер (*EGFR-7F*) – 5'-*AGTGGCGGTGGTGG*

TGAGGGAG-3'; обратный олигонуклеотидный праймер (*EGFR-7R*) – 5'-*ACC TTGAGCACGGTAACGTTAGGGTGT-3'*) в строгом соответствии с лабораторным протоколом [273, 274]:

1) денатурация молекул ДНК на протяжении 2 мин при температуре 94⁰С;

2) последовательность из 45 циклов реакций денатурации молекул ДНК на протяжении 10 сек. при температуре 94⁰С, отжиг праймера на протяжении 20 сек. при температуре 53⁰С, фаза элонгации на протяжении 20 сек. при температуре 72⁰С;

3) анализ реакционной кривой с помощью специального программного обеспечения «Chromas 2.6.6 software» производства «Technelysium» (Австралия) или хранение образцов при температуре 4⁰С.

Реакционные продукты полимеразной цепной реакции подвергались очистке методом электрофореза в агарозном геле с применением специальной колонки марки «Cleanup Standard» производства компании «Evrogen» (Россия). Очищенные таким образом реакционные продукты проходили секвенирование по методу Sanger, при этом отдельно использовали оба олигонуклеотидных праймера – прямой *EGFR-7F* и обратный *EGFR-7R*. Анализ сиквенсов (результаты секвенирования) проводили с использованием специального программного продукта «Chromas 2.6.6 software» производства «Technelysium» (Австралия) [273, 274].

Для секвенирования использовали олигонуклеотидные немодифицированные праймеры производства компании «Evrogen» (Россия) и меченные (флюоресцентной меткой) олигонуклеотидные зонды производства компании «DNA-Synthesis» (Россия) [273, 274].

2.11 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 Гехана с поправкой Йейтса при сравнении нескольких кривых выживаемости [275].

В анализе использован пакет программ по статистике STATA (США) и BioStat (Россия).

ГЛАВА 3. ФАРМАКОЭПИДЕМИОЛОГИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ

Для комплексного рассмотрения эпидемиологии рака молочной железы в популяции, населяющей Республику Мордовия, в первую очередь 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 являющиеся максимально адекватными измерителями народного благополучия [276].

3.1 Медико-демографическая характеристика популяции

Республики Мордовия

Численность населения Республики Мордовия за период исследования с 2011 по 2020 год уменьшилась на 6,1 % (на 53 285 чел.) - с 871 848 до 818566 чел. Численность постоянного населения Республики Мордовия за период с 2011 по 2020 год представлена на рисунке 7.

Численность городского населения за отчетное время уменьшилась на 1,7 % (на 8 907 чел.) - с 510,9 тыс. до 502,0 тыс. чел. Общая убыль городского населения в 2011 году составила 3 518 человек (за счет естественной убыли 2 215 чел. и отрицательного миграционного прироста 1303 чел.), в 2012 году – 3 019 чел. (естественная убыль – 2023 чел., миграционная убыль – 996 чел.), в 2013 году – 1 259 чел. (естественная убыль – 1 693 чел., миграционный прирост – 434 чел.), в 2014 году – 634 чел. (естественная убыль – 1 125 чел., миграционный прирост – 491 чел.), в 2015 году – 504 чел. (естественная убыль – 1 085 чел., миграционный прирост – 581 чел.), в 2016 году – 883 чел. (естественная убыль – 1 514 чел.,

миграционный прирост – 631 чел.), в 2017 году – 1 548 чел. (естественная убыль – 1 117 чел., миграционная убыль – 431 чел.), в 2018 году – 1 084 (естественная убыль – 919 чел., миграционная убыль – 165 чел.), в 2019 году – 1 124 (естественная убыль – 1 056 чел., миграционная убыль – 86 чел.).

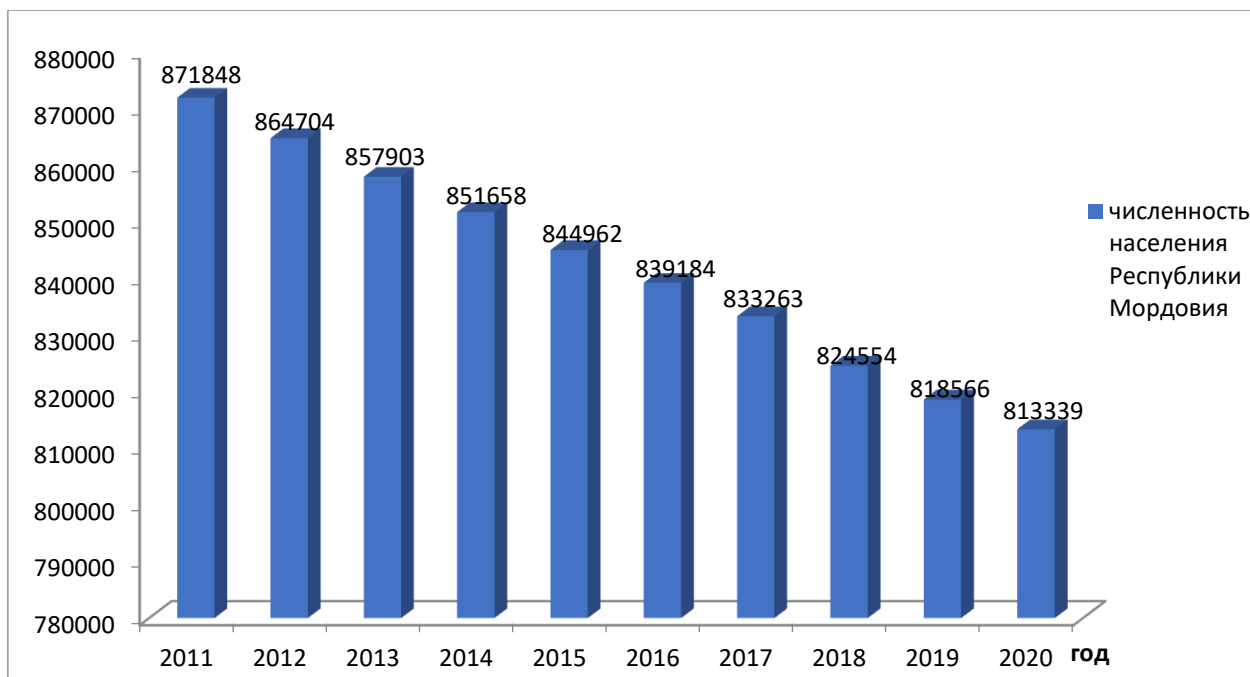


Рисунок 7 – Численность постоянного населения Республики Мордовия за период с 2011 по 2020 год

Численность сельского населения за период наблюдения уменьшилась на 12,3% (на 44 375 чел.) - с 360,9 тыс. в 2011 году до 316,5 тыс. чел. в 2019 году. Общая убыль сельского населения в 2011 году составила 6 280 человек (за счет естественной убыли – 5 214 чел. и отрицательного миграционного прироста – 1 066 чел.), в 2012 году – 6 169 чел. (естественная убыль – 4 591 чел., миграционная убыль – 1 578 чел.), в 2013 году – 5 995 чел. (естественная убыль – 3 899 чел., миграционная убыль – 2 096 чел.), в 2014 году – 6 726 чел. (естественная убыль – 3 827 чел., миграционная убыль – 2 899 чел.), в 2015 году – 6 001 чел. (естественная убыль – 3 839 чел., миграционная убыль – 2 162 чел.), в 2016 году – 6 403 чел. (естественная убыль – 3 618 чел.,

миграционная убыль – 2 785 чел.), в 2017 году – 6 261 чел. (естественная убыль – 3 268 чел., миграционная убыль – 2 993 чел.), в 2018 году – 5 804 чел. (естественная убыль – 2 826 чел., миграционная убыль – 2 978 чел.) [276].

Анализируя динамику численности населения республики, мы выявили, что удельный вес городского населения в 2011 году составлял 58,6% от общего числа людей, проживающих на территории Республики Мордовия, а к 2019 году увеличился до 61,3 % (в 2012 году – 58,7 %, в 2013 году – 58,9 %, в 2014 году – 59,2 %, в 2015 году – 59,6 %, в 2016 году – 60,1%, в 2017 году – 60,6 %, в 2018 году – 61,0 %). При выравнивании показателей динамического ряда отмечается тенденция к повышению удельного веса жителей городских поселений республики в среднем на 0,6 % ежегодно (рисунок 8).

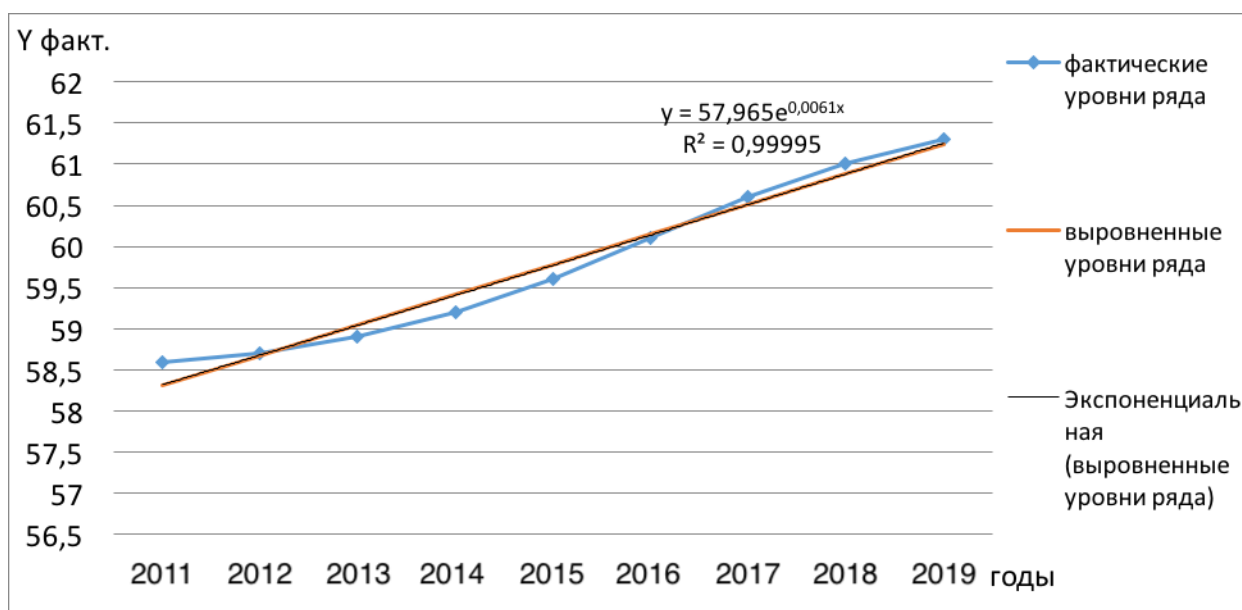


Рисунок 8 – График исходного ряда, аппроксимирующей линии динамического ряда удельного веса городского населения Республики Мордовия за 2011 - 2019 годы

На долю жителей сельской местности республики за период наблюдения приходилось в среднем 40,2 % от общей численности населения (в 2011 году – 41,4 %, в 2012 году – 41,3 %, в 2013 году – 41,1 %, в 2014 году

– 40,8 %, в 2015 году – 40,4 %, в 2016 году – 39,9 %, в 2017 году – 39,4 %, в 2018 году – 39,0 %, в 2019 году – 38,7 %). Графики аппроксимирующей линии динамического ряда удельного веса сельских жителей свидетельствуют о четкой тенденции к снижению доли сельского населения по 0,9 % в год (рисунок 9).

Одним из важнейших элементов перераспределения населения является процесс урбанизации, стимулируемый концентрацией инвестиционных возможностей и возможностей для трудоустройства в городских районах, а также переходом от малоэффективного сельского хозяйства к более производительному механизированному. Основная производственная деятельность в промышленности и в сфере услуг концентрируется в городах. Внутриреспубликанские перемещения населения происходят за счет оттока сельских жителей в городские поселения. Основной зоной привлекательности для внутриреспубликанских мигрантов является городской округ Саранск [276].

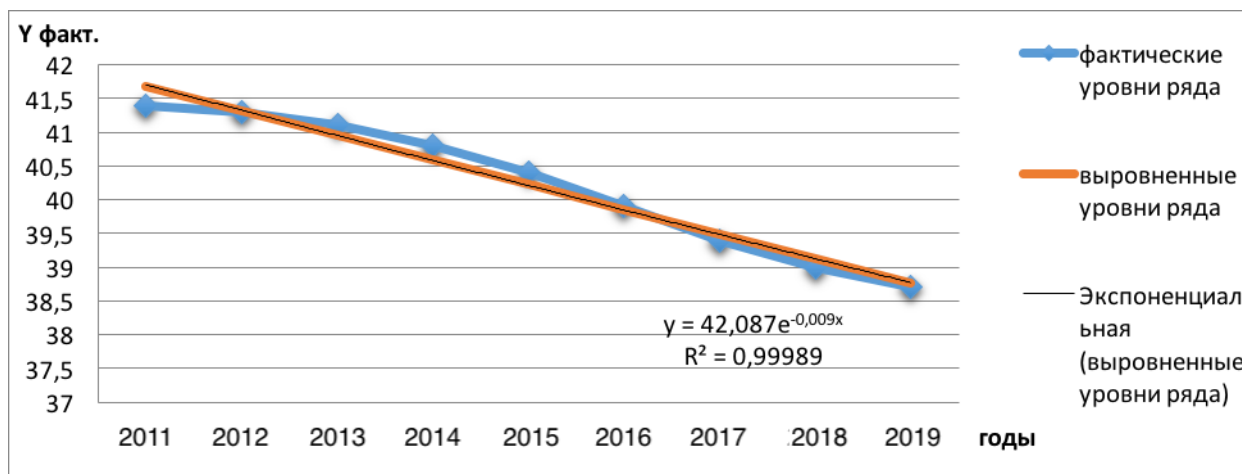


Рисунок 9 – График исходного ряда, аппроксимирующей линии динамического ряда удельного веса сельского населения Республики Мордовия за 2011 - 2019 годы

В половой структуре населения республики преобладает женское население. Эта тенденция наблюдается во все рассматриваемые годы.

Причины половой диспропорции носят биологический и социальный характер. У мужчин меньше биологическая стойкость организма. С 30 - 40 лет уже остро ощутимо численное преимущество женщин. С увеличением возраста растет доля женщин в численности населения. Наблюдаемое в более ранних возрастах преобладание мужской части населения к 40 годам выравнивается, после чего в результате более высокой смертности мужчин в рабочих возрастах увеличивается численность женщин. Распределение населения по полу представлено на рисунке 10.

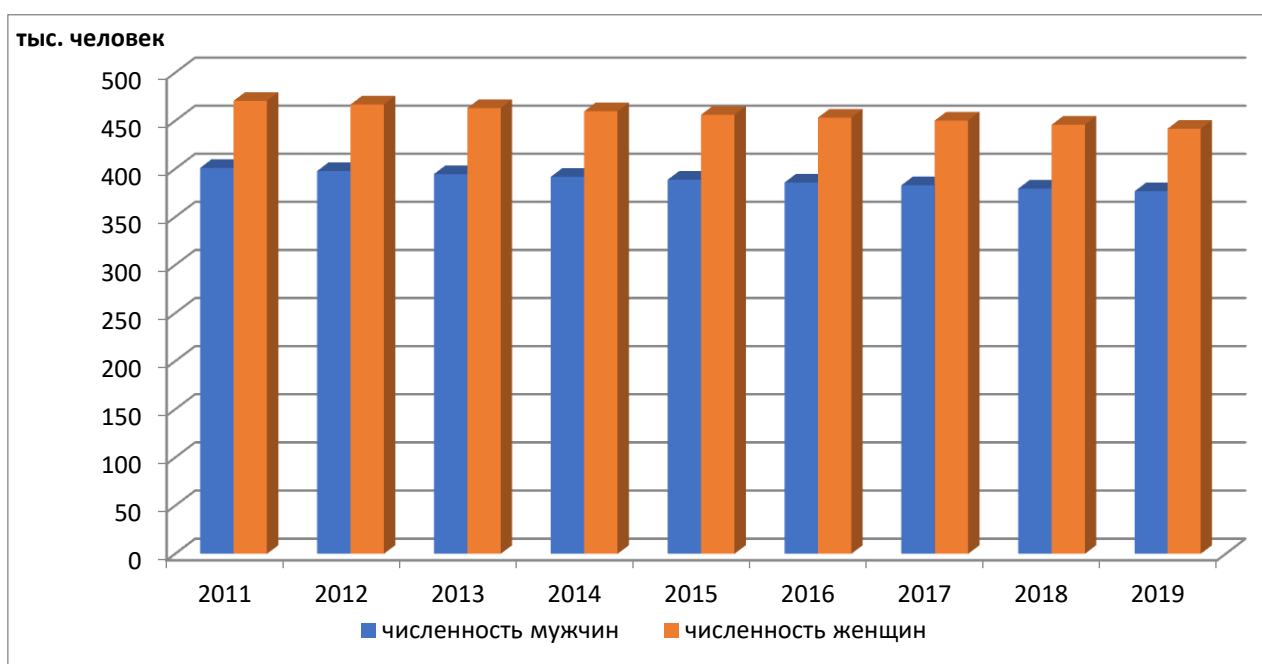


Рисунок 10 – Распределение населения Республики Мордовия по полу за период с 2011 по 2019 годы

Доля мужчин в общей численности населения за период исследования с 2011 по 2019 год стабильно сохранялась на уровне 46,0 %, а доля женщин – 54,0 % соответственно. В республике на 1 000 мужчин приходится 1 174 женщины с небольшими колебаниями в 2016 году – 1 175, в 2017 – 1 176, в 2018 – 1 175, в 2019 – 1 173.

Количество женщин в возрасте 15 - 49 лет составляет 238 110 чел. в 2011 году – 202 260 чел. в 2019 году. Удельный вес женщин данной

возрастной категории в городской и сельской местности различный. В городе на долю женщин в возрасте от 15 до 49 лет приходилось 54,5 - 47,8 % за девять изучаемых лет, а в сельской местности – 44,8 - 42,4 %. Уровень женщин сократился в городских поселениях на 6,7 процентных пункта, в сельских поселениях – на 2,4 процентных пункта [276].

Численность населения непрерывно изменяется вследствие рождений и смертей, поэтому нами проанализированы такие основные демографические составляющие, как рождаемость, смертность и естественный прирост. За рассматриваемый период в Республике Мордовия общее число родившихся составило 71 135 человек (в 2011 году – 7 394 чел., в 2012 – 7 367 чел., в 2013 – 7 728 чел., в 2014 – 8 215 чел., в 2015 – 8 103 чел., в 2016 – 7 974 чел., в 2017 – 7 918 чел., в 2018 – 8 180 чел., в 2019 – 8 256 чел.). За девять лет наблюдений отмечено несколько скачков роста рождаемости: в 2013 и 2014 годах (на 4,7 % и 5,9 % соответственно) и в 2018 и 2019 годах (на 3,2 % и 0,9 % соответственно) [276].

В остальное время выявлено снижение количества родившихся, а именно: в 2012 году - на 0,4 %, в 2015 - на 1,4 %, в 2016 - на 1,6 %, в 2017 - на 0,7 %. В расчете на 1 000 человек населения коэффициент рождаемости варьировал в пределах 8,5 - 9,7 в 2011 - 2014 годах, к 2016 году понизился до 9,5 (на 3,1 %), в 2017 году соответствовал уровню 9,5, в 2018 и 2020 годах вырос до 10,1.

За последние годы благодаря совместной деятельности органов и учреждений здравоохранения республики по совершенствованию организации медицинской помощи гражданам удалось улучшить ряд показателей воспроизводства населения. Говоря о рождаемости в современном обществе, следует помнить, что она детерминирована не только биологическими (как в животном мире), но и прежде всего социально-экономическими условиями жизни, этническими традициями, религиозными установками и другими факторами [276].

Ожидаемая продолжительность жизни при рождении в Республике Мордовия ежегодно возрастала в среднем на 0,5 % и достигла 72,8 года в 2020 году, что наглядно отображено на рисунке 11. Этот показатель характеризует жизнеспособность населения в целом и не зависит от особенностей возрастной структуры населения. Под этим показателем следует понимать гипотетическое число лет, которое предстоит прожить данному поколению родившихся или числу живущих определенного возраста при условии, что на всем протяжении жизни смертность в каждой возрастной группе будет такой же, какой она была в том году, для которого производилось исчисление [276].

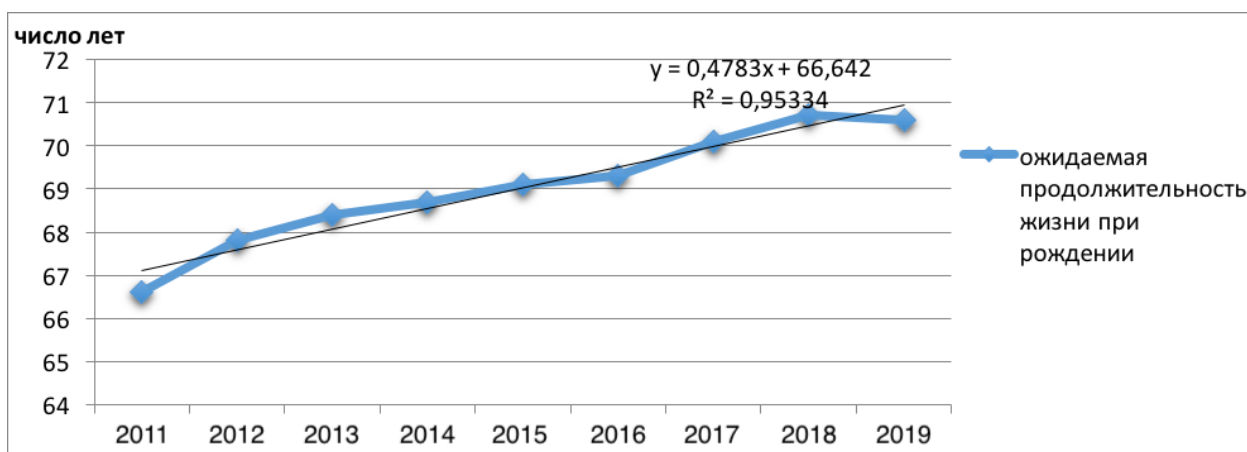


Рисунок 11 – Ожидаемая продолжительность жизни при рождении (число лет) в Республике Мордовия за период с 2011 по 2020 годы

Основными причинами смерти населения по-прежнему остаются болезни, но за исследуемый период наметилась положительная тенденция сокращения количества умерших. Всего число умерших от всех причин в Республике Мордовия за десять лет составило 117 747 чел., в среднем по 13,1 тыс. чел. в год (в 2011 году – 14 823 чел., в 2012 – 13 981 чел., в 2013 – 13 320 чел., в 2014 – 13 167 чел., в 2015 – 13 027 чел., в 2016 – 13 106 чел., в 2017 – 12 303 чел., в 2018 – 11 925 чел., в 2019 г – 12 095 чел.). Коэффициент умерших на 1 000 чел. населения равномерно снижался с 17,1 в 2011 году до

15,5 в 2013 году на 9,4 %, в 2015 году стабилизировался на уровне 15,5, а в 2016 году увеличился на 1,3 % до 15,7, в 2017 - 2018 годах вновь отмечено понижение на 7,6 % до 14,5. В 2020 году коэффициент умерших составлял 14,8 случая на 1 000 чел. населения республики. Коэффициенты смертности по основным классам ее причин в расчете на 100 000 человек населения представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Динамика уровня смертности населения Республики Мордовия по основным классам причин смерти за 2011 - 2020 годы (число умерших на 100 000 населения)

Причины смерти	год								
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Всего умерших от всех причин	1707,2	1616,9	1558,3	1552,1	1547,0	1567,3	1483,4	1450,7	1483,4
в том числе:									
от болезней системы кровообращения	918,1	868,3	852,0	829,1	791,4	784,5	766,9	715,1	668,9
от новообразований	208,1	202,6	207,9	192,0	210,4	207,7	184,6	174,7	184,1
от внешних причин смерти из них:	194,5	185,9	158,5	158,8	152,6	151,9	140,1	138,2	134,7
от случайных отравлений алкоголем	14,6	13,3	10,1	9,1	9,5	6,7	5,2	6,7	4,2
от всех видов транспортных несчастных случаев	17,4		24,6	23,7	26,0	22,7	20,4	25,4	24,3

Продолжение Таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
от самоубийств	31,0	28,2	26,7	26,8	26,0	24,2	24,4	18,7	22,1
от убийств	9,2	8,4	6,3	7,5	9,4	6,1	8,8	6,6	6,3
от болезней органов дыхания	76,4	63,8	55,7	51,3	57,2	50,2	54,9	57,4	62,9
от болезней органов пищеварения	45,5	45,2	41,3	47,9	45,8	53,2	54,7	54,0	53,8
от некоторых инфекцион-ных и паразитарных болезней из них:	15,2	15,1	15,3	14,4	14,1	13,0	13,5	10,7	12,8
от туберкулеза	12,9		11,1	9,8	9,5	6,8	5,7	5,0	4,8
от болезней эндокринной системы, расстройства питания, нарушения обмена веществ и иммунитета	10,5		10,4	7,7	8,2	8,5	6,0	5,6	18,6
от болезней мочеполовой системы	4,8		6,0	5,4	5,3	5,9	4,3	6,0	5,0
от осложнений беременности, родов и послеродового периода	27,0		-	36,5	12,3	-	50,5	24,4	-

Согласно данным, систематизированным в таблице 7, одно из лидирующих мест по основным классам причин смерти в республике во все рассматриваемые годы занимали новообразования: коэффициент смертности составлял 174,7 – 210,4 случая на 100 000 чел. населения, а количество умерших от данной патологии за отчетный период достигло 14948 человек [276].

Таким образом, можно сделать некоторые обобщения: проведенный анализ динамики демографических процессов в Республике Мордовия показал, что за последние годы демографическая ситуация характеризуется снижением численности населения, 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 [276].

3.2 Общая эпидемиология рака молочной железы в Республике Мордовия

На протяжении последнего десятилетия в популяции, населяющей Республику Мордовия, наблюдается динамика заболеваемости онкологическими болезнями и смертности от злокачественных новообразований, характеризующаяся неуклонным ростом интенсивных показателей (рисунок 12).

Негативные тенденции в республике опережают средние показатели, регистрируемые по Российской Федерации в целом: в регионе первичная заболеваемость онкологическими болезнями выросла с 419,9 чел. на 100 тыс. населения в 2011 году до 528,9 чел. в 2019 году, тогда как в Российской Федерации за этот же период отмечался рост показателя с 336,7 до 376,3 чел. на 100 тыс. населения. Также наблюдается значительное ускорение как темпов роста, так и прироста показателя за период с 2015 по 2019 годы [276].

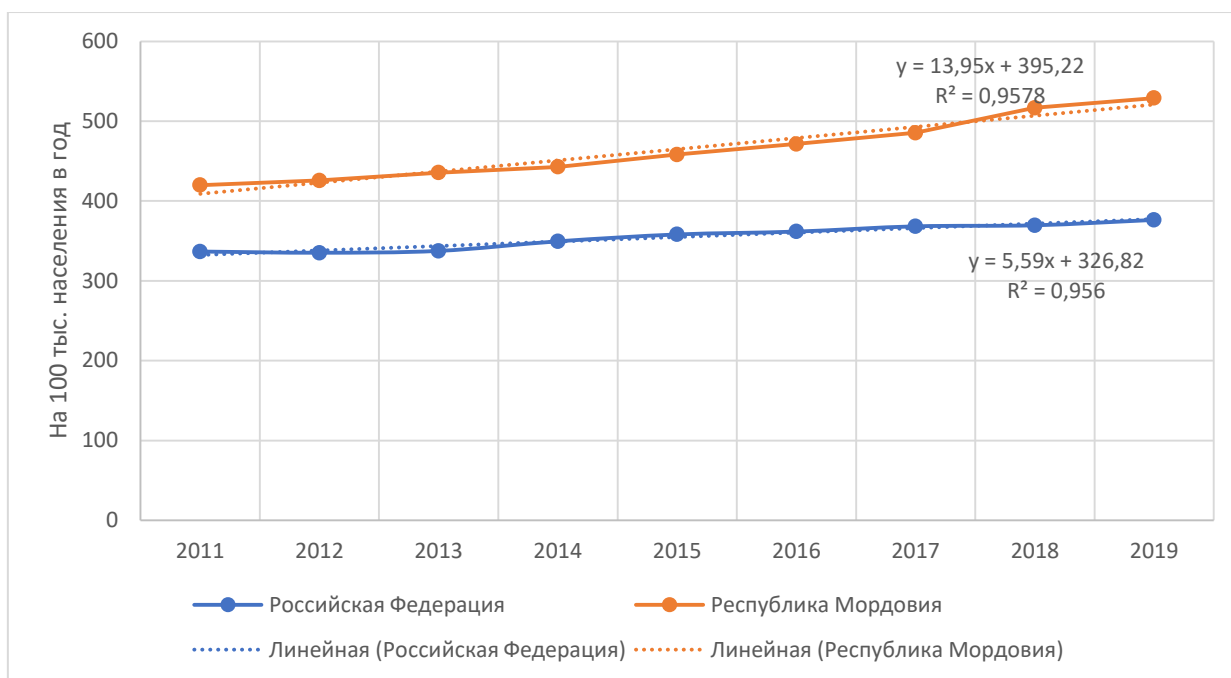


Рисунок 12 – Динамика первичной заболеваемости (на 100 тыс. чел. населения в год) онкологическими болезнями в России и Республике Мордовия за период с 2011 по 2019 год

Нами был проанализирован также показатель общей заболеваемости онкологическими болезнями в Республике Мордовия и Российской Федерации (рисунок 13). В целом по изученному показателю регион соответствует общероссийскому тренду. В частности, за исследуемый период значение показателя в России колебалось около 11 на 1 000 чел. населения в год и увеличилось с 11,1 в 2011 году до 11,9 в 2019 году. В Республике Мордовия наблюдалась та же динамика коэффициента: первичная заболеваемость проявляла слабую тенденцию к росту с 11,3 на 1 000 населения в 2011 году до 11,8 – в 2019 году [276].

Полученные результаты могут говорить о том, что при неизменном уровне общей заболеваемости онкологическими болезнями произошел существенный рост первичной заболеваемости, свидетельствующий не столько об истинном росте числа 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 [276].

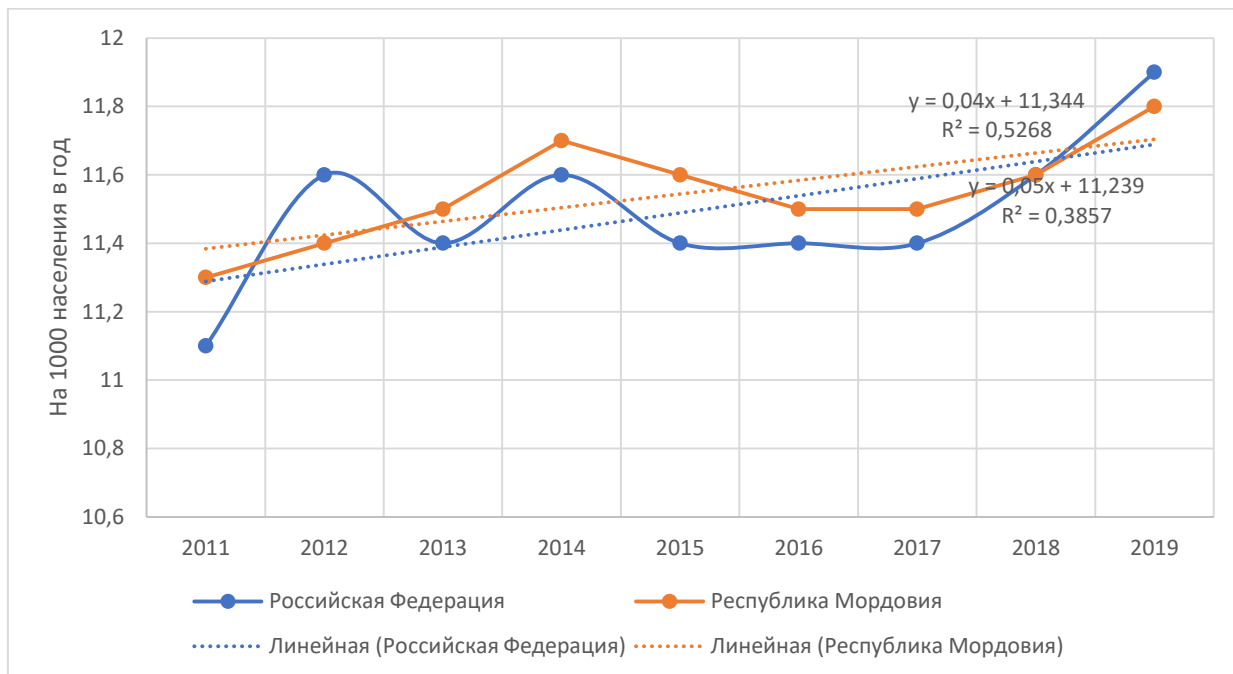


Рисунок 13 – Динамика общей заболеваемости (на 1 000 чел. населения в год) онкологическими болезнями в России и Республике Мордовия за период с 2011 по 2019 год

В структуре онкологической заболеваемости в Российской Федерации за период с 2011 по 2019 год рак молочной железы занимал первое место – 53,4 %. В Республике Мордовия данный показатель находился на сопоставимом уровне – 54,7 %.

Мы также изучили динамику заболеваемости раком молочной железы в популяции Российской Федерации и Республики Мордовия (рисунок 14). Так, в Российской Федерации наблюдался устойчивый тренд к росту заболеваемости злокачественным поражением молочной железы с 58 на 100 тыс. чел. населения в 2011 году до 73,6 чел. в 2019 году [276].

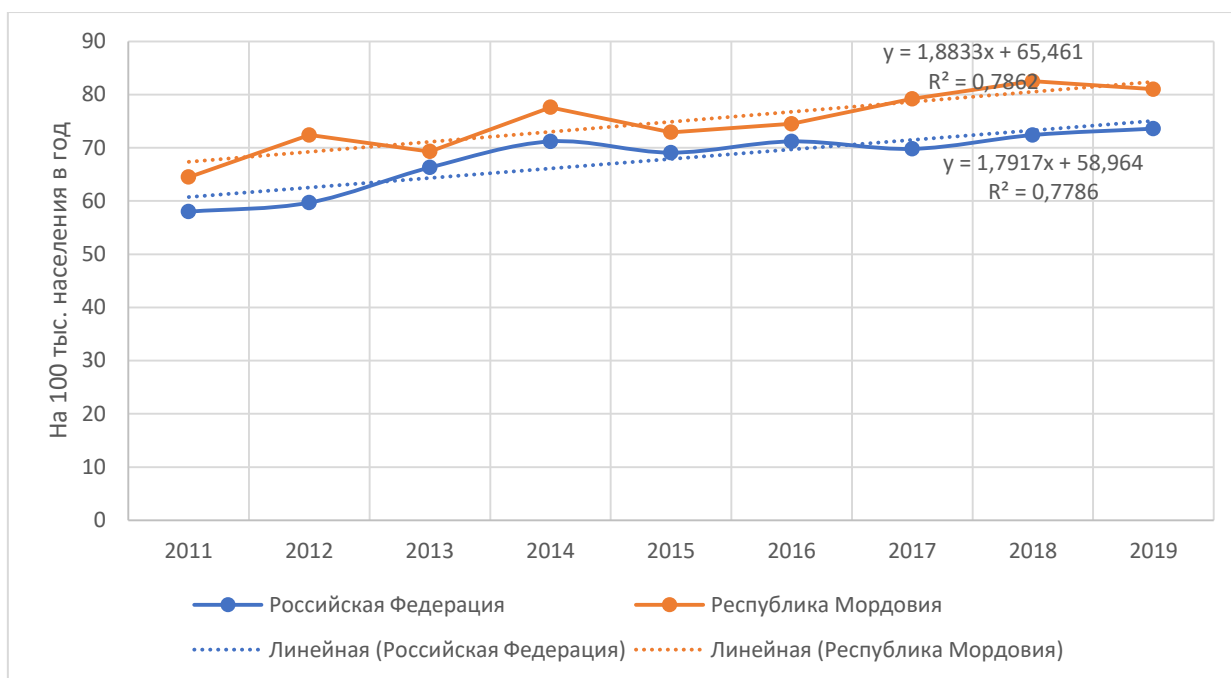


Рисунок 14 – Динамика заболеваемости (на 100 тыс.чел. населения в год) раком молочной железы в России и Республике Мордовия за период с 2011 по 2019 годы

Среднегодовой темп прироста в России составлял 2,54 %, общий прирост достиг 29,47 %. В регионе в 2011 году зарегистрировано 64,5 случая заболевания на 100 тыс. чел. населения, тогда как в 2019 году этот показатель вырос до 81 чел. Среднегодовой темп прироста составлял 2,72 %, общий прирост – 26,54 %. Следовательно, на фоне в целом несколько больших показателей уровня заболеваемости изучаемой патологией коэффициенты, характеризующие динамику явления, соответствуют общероссийским закономерностям [276].

Мы проанализировали повозрастное распределение показателя заболеваемости раком молочной железы в женской популяции Республики Мордовия в сравнении с соответствующими значениями в Российской Федерации (рисунок 15). На графике представлены средние значения, вычисленные за период с 2011 по 2019 год [276].

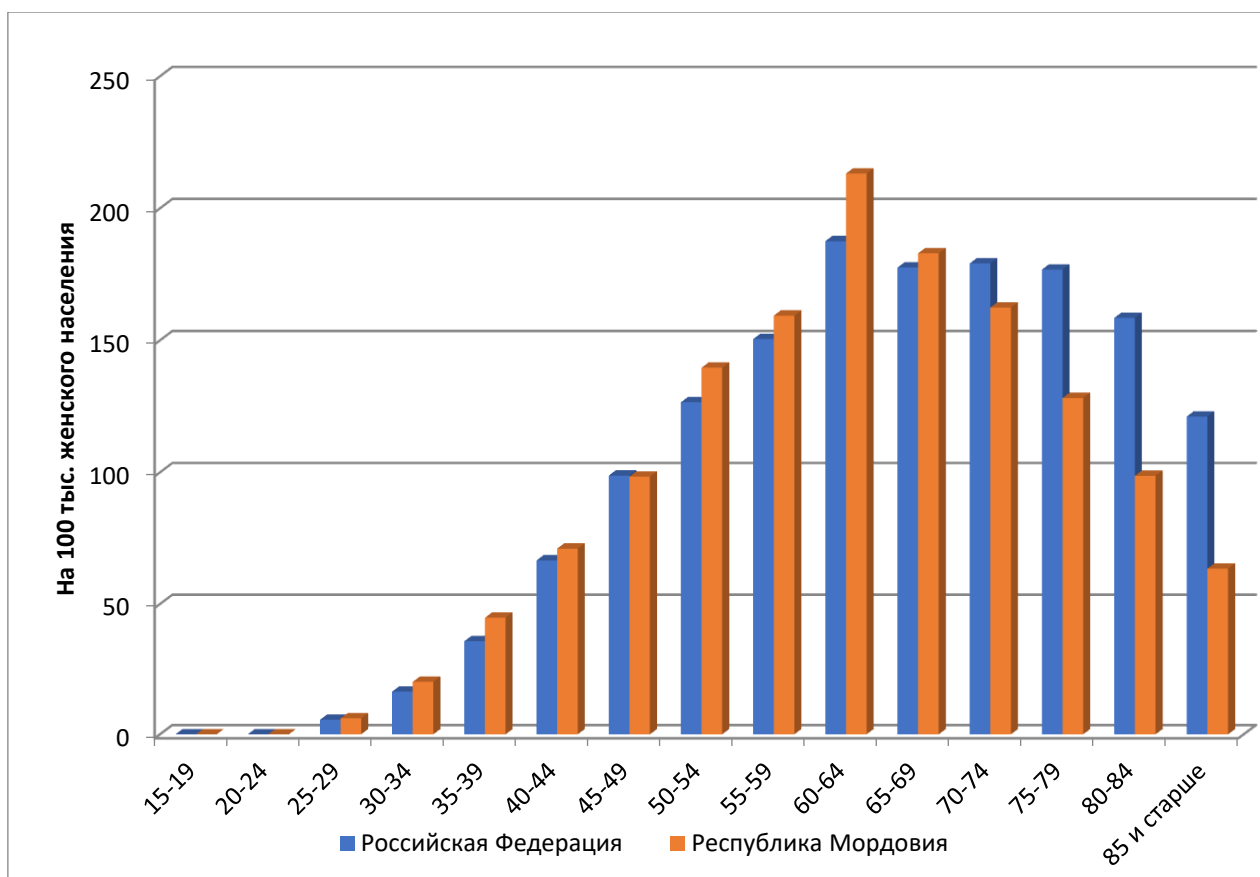


Рисунок 15 – Повозрастные показатели заболеваемости раком молочной железы (на 100 тыс. чел. женского населения в год) в Российской Федерации и Республике Мордовия

Как хорошо видно, заболеваемость раком молочной железы в Российской Федерации регистрируется, начиная с возрастной группы 25 - 29 лет и неуклонно растет с 5,54 чел. на 100 тыс. чел. женского населения до 187,54 чел. в возрастной группе 60 - 64 года в Российской Федерации. В регионе наблюдается аналогичная динамика роста с опережением в значении показателя заболеваемости: с 6,11 чел. на 100 тыс. чел. женского населения в возрастной группе 25 - 29 лет до 213,14 чел. в возрастной группе 60 - 64 года. Начиная с возрастной группы 70 - 74 года уровень заболеваемости патологией в регионе отстает от общероссийского показателя, а у категории женщин 85 лет и старше составляет половину от него, что может быть обусловлено особенностями продолжительности жизни женского населения в регионе [276].

В структуре выявляемости также, как и в Российской Федерации в целом, преобладали неоплазии молочной железы I - II стадий, на долю которых приходилось в среднем за рассматриваемый период 63,6 % в Российской Федерации и 59,4 % в Республике Мордовия, тогда как на III - IV стадии заболевания приходилось 25,8 % всех выявленных случаев в стране и 29,3 % - в регионе. Оставшиеся случаи выявления рака молочной железы составляли категорию с неустановленной стадией (рисунок 16).

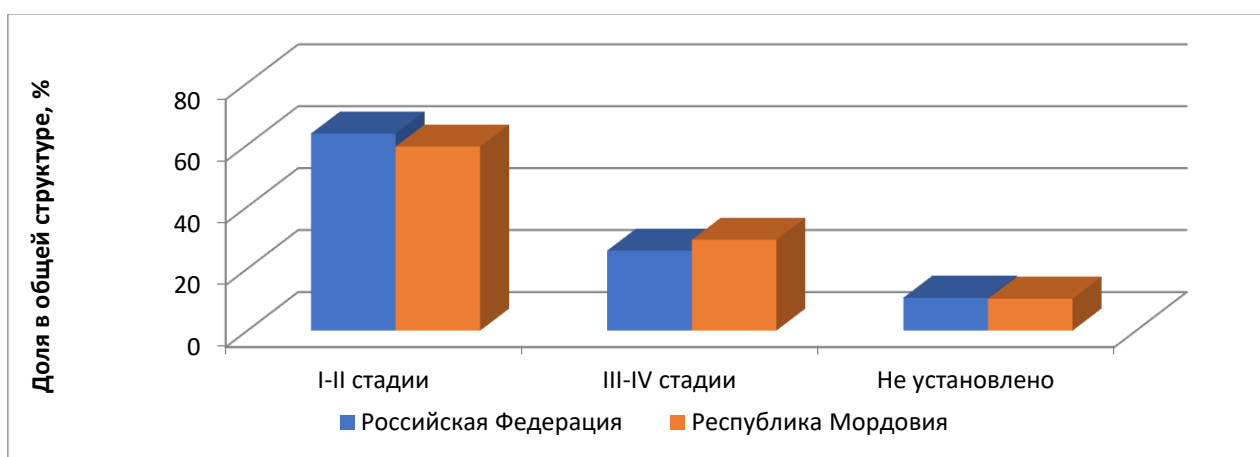


Рисунок 16 – Постадийная структура выявляемости рака молочной железы (среднегодовые показатели за период 2011 - 2020 гг.) в Российской Федерации и Республике Мордовия

В национальной структуре среднегодовой выявляемости рака молочной железы (рисунок 17) преобладали представительницы русской национальной группы, на втором месте – мордовской, на третьем – татарской. На долю представительниц прочих национальностей и народностей приходилось 13,9%, что соотносится с общей национальной структурой популяции Республики Мордовия [276]. В структуре патоморфологической формы рака молочной железы установлено следующее соотношение (рисунок 18): на долю протоковой карциномы приходилось 8,7 %, дольковой карциномы – 11,6 %, инфильтрирующей протоковой карциномы – 58,8 %, инфильтрирующей лобулярной карциномы – 5,4 %, медуллярной карциномы – 2,8 %, рака молочной железы с признаками воспаления – 12,7 %. Показатели рассчитаны как усредненные за период с 2011 по 2019 год [276].



Рисунок 17 – Национальная структура выявляемости рака молочной железы (среднегодовые показатели за период 2011-2019 гг.) в Республике Мордовия



Рисунок 18 – Патоморфологическая структура выявляемого рака молочной железы (среднегодовые показатели за период 2011 - 2019 гг.) в Республике Мордовия

3.3 Фармакоэпидемиология и фармакоэкономика рака молочной железы в Республике Мордовия

Настоящий этап исследования мы провели, основываясь на положениях Стандарта медицинской помощи больным со злокачественным новообразованием молочной железы (при оказании специализированной помощи), утвержденного приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 700 от 9 октября 2006 года. В указанном нормативном документе перечислены все медицинские услуги, кратность их назначения, а также ориентировочная продолжительность пребывания в стационаре в соответствии с клиническо-морфологической стадией опухолевого процесса. Также стандарт дает исчерпывающую информацию по рекомендованным группам и лекарственным средствам, среднесуточным и курсовым дозам в зависимости от стадии опухолевого заболевания [276].

На рисунке 19 представлена средневзвешенная стоимость оказания специализированной медицинской помощи по поводу новообразования молочной железы в условиях стационара в Республике Мордовия в зависимости от стадии заболевания (без учета расходов на хирургическое лечение) [276].

Как хорошо видно, стоимость оказания медицинской помощи пациенткам с I - II стадиями заболевания в среднем составляет порядка 118540 рублей. При оказании специализированной помощи в стационаре по поводу III стадии рака молочной железы стоимость затрат вырастает до 986320 рублей, что более чем в 8 раз выше. Стоимость оказания медицинской помощи пациенткам с IV стадией заболевания в среднем составляет порядка 1 576 740 рублей. Обращает на себя внимание резкий рост стоимости лечения между I -II и III стадиями рака молочной железы. Подобного роста не наблюдается при IV стадии болезни [276].

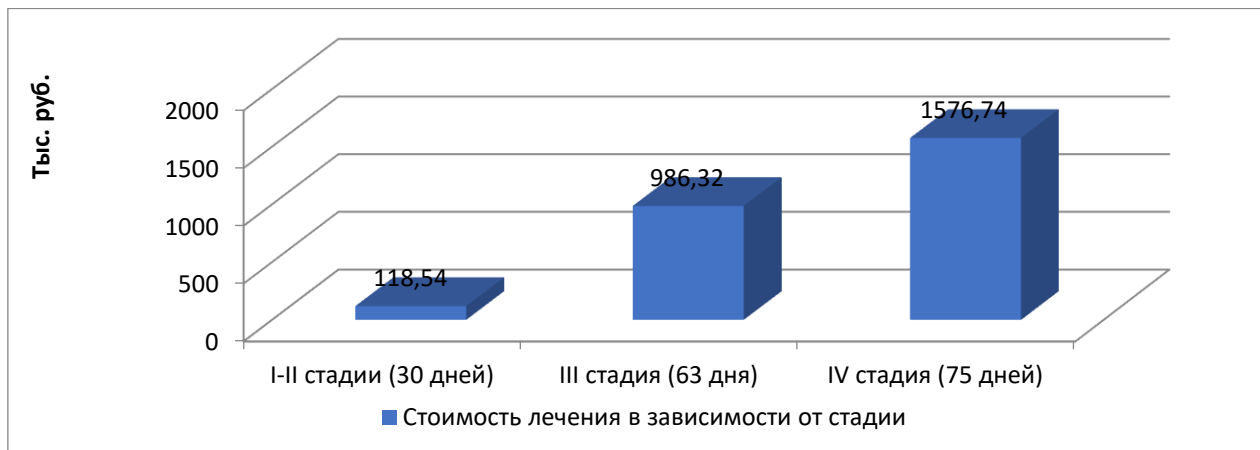


Рисунок 19 – Средневзвешенная стоимость консервативного лечения рака молочной железы (среднегодовые показатели за период 2011 - 2020 гг.) в Республике Мордовия в зависимости от стадии заболевания, тыс. руб.

Очевидно, что рост стоимости лечения определяется ростом стоимости как медицинских услуг, так и лекарственного лечения. Соотношение этих затрат представлено на рисунке 20.

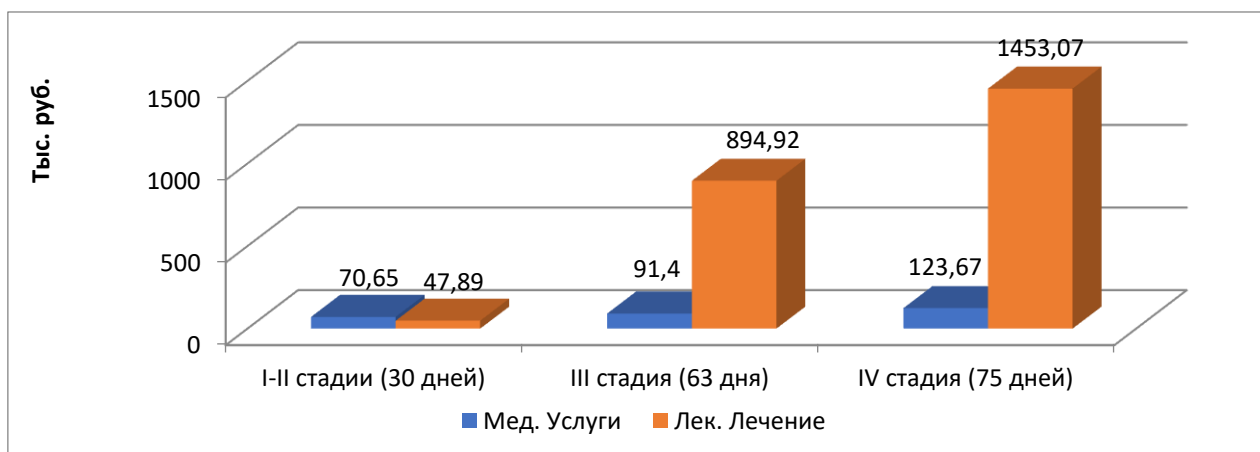


Рисунок 20 – Средневзвешенная стоимость консервативного лечения рака молочной железы (среднегодовые показатели за период 2011-2019 гг.) в Республике Мордовия в зависимости от стадии заболевания, тыс. руб.

Мы установили, что в структуре стоимости оказания медицинской помощи пациенткам с I - II стадиями заболевания преобладали расходы на выполнение диагностических исследований. При оказании помощи

пациенткам с III и IV стадиями болезни львиную долю расходов занимали расходы на медикаментозную терапию, в то время как увеличение расходов на медицинскую диагностику было незначительным [276].

Мы проанализировали также структуру затрат на лекарственное лечение рака молочной железы в зависимости от стадий и фармакологических групп лекарственных средств, применяемых для терапии заболевания (рисунок 21). Национальным регулятором предусмотрено использование 11-й, 14-й и 14-й фармакотерапевтических групп для лечения пациенток с I - II, с III и IV стадиями болезни соответственно. Группы представлены 47, 87 и 91 наименованием 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 [276].

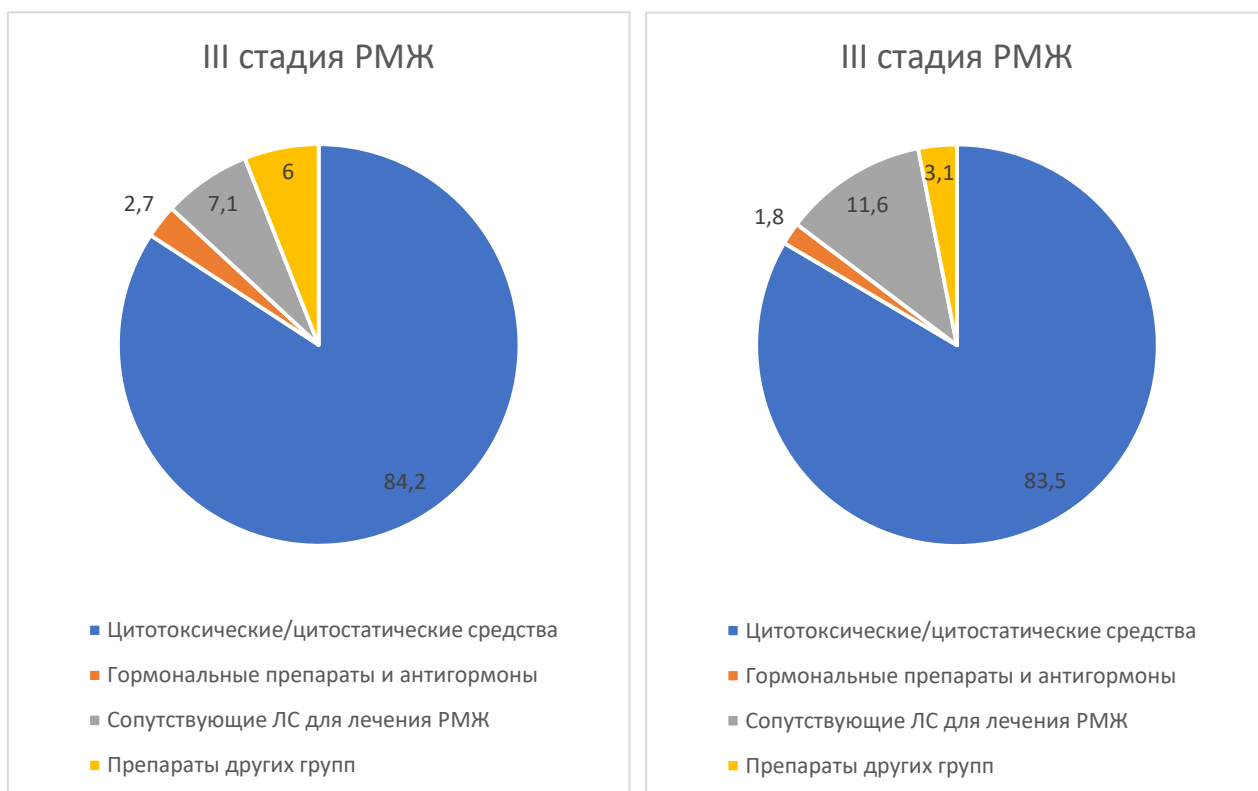


Рисунок 21 – Структура затрат на лекарственное лечение рака молочной железы (среднегодовые показатели за период 2011-2019 гг.) в Республике Мордовия по группам препаратов, %

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 детальной проработки вопроса чувствительности отдельных наиболее прогрессивных форм опухоли к цитостатическим/цитотоксическим лекарственным средствам и выработки путей преодоления фармакорезистентности в регионе [276].

ГЛАВА 4. НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Основные механизмы химиорезистентности клеток злокачественных новообразований изучены не полностью [277]. Следовательно, понимание взаимосвязи между прогрессированием опухоли и химиорезистентностью в ответ на химиотерапию имеет важное значение для успешной разработки новых противоопухолевых терапевтических средств. Устойчивость к лекарствам может быть внутренней (сформированной ранее) или приобретенной (индуцированной лекарственными средствами). Внутренняя резистентность указывает на отсутствие ответа опухоли на начальную терапию из-за существующей резистентности опухолевых клеток. Мутационные изменения в них в результате химиотерапии делают их нечувствительными к лечению, что приводит к приобретенной резистентности [278].

Считается, что опухолевые стволовые клетки (CSC), также известные как клетки, инициирующие опухоль (TIC), играют важную роль в метастатическом рецидиве и химиорезистентности в результате их способности самообновляться и дифференцироваться в гетерогенные опухолевые клетки [279]. В дополнение к химиотерапевтическим агентам другие экзогенные агенты, такие как некоторые наноматериалы, индуцируют CSC [280 - 282]. Механизмы, с помощью которых эти агенты регулируют CSC, не полностью изучены. Однако изменение в факторах транскрипции, контролирующей клональность опухолевых клеток, было предложено в качестве общего механизма регуляции опухолевой трансформации. Регуляция CSC во время формирования химиорезистентности также может происходить посттранскрипционно и зависит от клеточных условий. Например, было обнаружено, что клеточный окислительный и

нитрозативный стресс играет решающую роль в устойчивости к химиотерапии и регуляции формирования химиорезистентности [283 - 286].

Химиорезистентность также объясняется недостаточной биодоступностью препаратов для опухолевых тканей. Большое расстояние между кровеносными сосудами, высокое давление интерстициальной жидкости и нерегулярная сосудистая сеть обуславливают плохое распределение лекарств в солидных опухолях. Следовательно, опухолевые клетки, расположенные дистальнее кровеносных сосудов, подвергаются воздействию неэффективных концентраций препарата [287]. По мере развития устойчивости среди опухолевой популяции злокачественные клетки ускользают от апоптоза, в результате чего опухолевые клетки становятся нечувствительными к лекарствам, которые когда-то были эффективными. Существует множество механизмов, которые способствуют химиорезистентности, включая активное выведение лекарства из клетки, восстановление повреждений ДНК, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), ингибирование клеточной гибели, изменение мишени лекарства и его активацию.

Опухолевые клетки достигают химиорезистентности за счет активации транспортеров АТФ-связывающей кассеты (ABC), также известных как механизмы обратного выброса лекарств. Это наиболее распространенные трансмембранные белки, которые могут переносить лекарства, продукты метаболизма и чужеродные вещества через клеточную мембрану, используя энергию, полученную в результате гидролиза АТФ [288]. Гиперэкспрессия специфических белков - транспортеров ABC часто связана с химиорезистентностью в различных солидных опухолях, включая РМЖ. Описаны три основных типа белков ABC, участвующих в химиорезистентности, включая Р-гликопротеин (ABCB1) / белок множественной лекарственной устойчивости (MDR1), белок, связанный с множественной лекарственной устойчивостью (MRP1 / ABCC1), и белок

устойчивости к раку молочной железы (BCRP / ABCG2) [289]. BCRP работает как инструмент выброса низкомолекулярных лекарств. BCRP-ассоциированная резистентность наблюдалась при раке молочной железы и лейкемии у детей и взрослых [289]. MDR1 связан с лекарственной устойчивостью при раке почек, печени, молочной железы, легких, толстой кишки и гемобластозах. MRP1 идентифицируется как биомаркер для прогнозирования химиорезистентности. Распространенными противоопухолевыми препаратами, которые, как известно, увеличивают экспрессию выводных насосов в опухолевых клетках, являются цисплатин, доксорубицин, этопозид, эстрамустин и винбластин [290].

Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) – это процесс, при котором клетки могут переходить от эпителиального фенотипа к мезенхимальному. Эпителиальные клетки характеризуются плотными межклеточными соединениями и клеточной полярностью. Изменения клеточного фенотипа в эпителиальных клетках способствуют фибробластоподобной морфологии, что приводит к увеличению миграции и инвазии клеток и устойчивости к апоптозу [291]. EMT также играет роль в метастазировании рака и связан с фенотипом CSC. Mani с соавт. показали, что эпителиальные клетки молочной железы человека, подвергшиеся EMT, проявляют сходные черты с CSCs, происходящими из нормальных и неопластических стволовых клеток молочной железы [292]. В клетках рака легкого группа исследователей показала, что EMT функционально связана с PCK, поскольку подавление E-кадгерина, маркера EMT, способствует EMT и увеличению клональности клеток [293]. Такое подавление также способствует устойчивости клеток к гибели и их инвазивности [293]. Было показано, что механизм, с помощью которого EMT регулирует ОСК в клетках рака легкого, включает активацию мезотелина (MSLN). MSLN – это ассоциированный с опухолью антиген, который сверхэкспрессируется на различных злокачественных опухолевых клетках. Было обнаружено, что

нокдаун MSLN вызывает обратное развитие EMT и снижает стволовые свойства клеток рака легкого в дополнение к ингибированию роста опухоли и метастазированию. [293]. Активация EMT также связана с резистентностью к химиотерапии, позволяющей эпителиальным клеткам ускользать от лекарственного лечения и различных эндогенных и экзогенных клеточных стрессов, включая гипоксию, истощение питательных веществ и механическое ограничение [294]. Многие исследования показали тесную взаимосвязь между фенотипом EMT и устойчивостью к химиотерапии. Например, резистентность к доксорубину развивается в клетках рака молочной железы, подвергающихся EMT [295].

Противоопухолевая эффективность лекарства может быть уменьшена в процессе инактивации. Некоторые типы клеток (например, клетки печени) обладают высокой устойчивостью к лекарствам. Фермент цитохром P450, присутствующий в клетках печени, может эффективно выводить токсины из цитоплазмы. Фермент дигидропиримидиндегидрогеназа (DPD) отвечает за катаболизм антиметаболических препаратов, таких как 5-фторурацил (5-FU) и метотрексат, в основном в клетках печени. Антиметаболитные препараты должны пройти химическое превращение в клетках, прежде чем проявить свой терапевтический эффект. Однако такое превращение ингибируется отсутствием или нарушением фермента DPD [296]. Кроме того, гиперэкспрессия DPD в опухолевых клетках связана с устойчивостью к 5-FU. Тиолсодержащий трипептид глутатион (GSH) является мощным антиоксидантом, широко представленным во всех клетках. Многие исследования выявили корреляцию между внутриклеточным уровнем GSH и устойчивостью к цисплатину в различных клеточных линиях [297]. Было также показано, что GSH инактивирует цисплатин путем ковалентного связывания через его высокореактивную тиоловую группу. Такая инактивация приводит к усилению детоксикации цисплатина и оттока

лекарства, а также предотвращает его реакцию с ДНК и другими внутриклеточными мишенями [298].

Большинство химиотерапевтических агентов воздействуют на опухолевые клетки, прямо или косвенно повреждая их ДНК. Клетки имеют несколько механизмов репарации, чтобы справиться с повреждающим эффектом, включая клиринг активных форм кислорода (АФК), активацию мутированной киназы атаксии-телеангиэктазии (АТМ) и киназы контрольной точки 1/2 (Chk1 / Chk2), а также передачу антиапоптотических сигналов через Wnt / β -катенин, Notch и пути PI3K / Akt. Крайне важно поддерживать стабильные внутриклеточные уровни АФК в нормальных физиологических условиях в опухолевых клетках, чтобы способствовать росту клеток и отключать механизмы их гибели. Чрезмерное производство АФК может привести к окислительному стрессу, который определяется как состояние, при котором скорость производства АФК превышает возможности механизмов антиоксидантной защиты [299]. Повышенный уровень АФК может повредить биомолекулы, включая ДНК, белки и липиды, что приведет к старению опухолевых клеток и апоптозу. Существование усиленных стратегий адаптивного стресса избирательно защищает опухолевые клетки от опосредованного АФК повреждения ДНК, ведущего к химиорезистентности [300].

Эффективность противоопухолевого лекарственного средства зависит от его молекулярной мишени и ее изменения в результате мутации гена или нарушения регуляции экспрессии, что приводит к устойчивости к лекарству. Например, топоизомераза II (Top2) «раскручивает» нити спирали ДНК. Мутации Top2 приводят к устойчивости опухолевых клеток к ингибиторам Top2, таким как этопозид и доксорубин [301]. Определенные мутации протеинкиназ также являются основной причиной лекарственной устойчивости. Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), такие как gefitinib и erlotinib, обычно используются в таргетной

терапии РМЖ для подавления киназной активности EGFR. Мутация EGFR (делеция в экзоне 19 в рамке считывания) приводит к приобретенной устойчивости к ингибиторам EGFR [302]. Сообщалось о сверхэкспрессии рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2) у 20–30 % пациенток с раком молочной железы. Трастузумаб, моноклональное антитело против HER2, обычно используется у пациентов с раком молочной железы для подавления роста опухолевых клеток. Сообщалось о прогрессировании опухоли у нескольких пациентов с раком молочной железы, несмотря на терапию трастузумабом, из-за лекарственной устойчивости, вызванной амплификацией HER2 [303].

Эпигенетические изменения признаны важным фактором химиорезистентности. Эпигенетические механизмы, в основном метилирование ДНК и модификация гистонов, играют решающую роль в регуляции экспрессии генов и дифференцировке клеток [304]. Цитозин в CpG-островках ДНК часто метилируется до 5-метилцитозина (5mC) с помощью ДНК-метилтрансфераз. Гиперметилирование CpG-островков вызывает геномную нестабильность, приводящую к молчанию гена-супрессора опухоли. Было показано, что гиперметилирование секретируемого гена Frizzled-related protein 5 (SFRP5), который действует как антагонист Wnt при раке яичников, связано с устойчивостью к препаратам платины [305, 306]. Модификации гистонов, включая ацетилирование и деацетилирование, происходят на остатках лизина, расположенных на N-конце гистонов и негистоновых белков. Гистонацетилтрансферазы (НАТ) и гистоновые деацетилазы (HDAC) представляют собой два противоположных класса ферментов, которые катализируют вышеупомянутые реакции [307].

Во процессе развития клеток их дифференцировка обуславливается факторами транскрипции, специфичными для определенного типа клеток. Создание и поддержание этих транскрипционных программ зависят от клеточных типов организации и динамики хроматина, что делает

эпигенетику ключевым элементом в регуляции клеточной судьбы. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что детские опухоли могут возникать в результате прямого нарушения регуляции клеточной дифференцировки во время развития или совместного выбора эпигенетических программ развития посредством пре- и постнатального репрограммирования клеток. Более того, широко распространено мнение, что дифференцированные клетки детерминируются во время развития необратимо и предпрограммируемо. Однако при определенных обстоятельствах дифференцированные клетки могут проявлять пластичность за счет изменения своей идентичности либо путем додифференцировки до состояния, подобного предшественнику, либо путем трансдифференцировки в альтернативный тип дифференцированных клеток.

По аналогии с физиологическим контекстом, в котором клеточная пластичность позволяет клеткам реагировать на внешние стрессы и адаптироваться к окружающей среде, клеточная пластичность может представлять собой кардинальную особенность опухолевых клеток, позволяющую избежать лечения или выйти за пределы первичной опухоли. Таким образом, изменения в эпигенетических процессах, участвующих в спецификации и пластичности клеток, по-видимому, занимают центральное место в детской онкологии. Недавний прогресс секвенирования одноцепочечной РНК принес все больше доказательств того, что детская злокачественная опухоль представляет собой иерархически организованные опухоли, воспроизводящие нарушенные траектории развития и обладающие CSC, ответственными за поддержание, рецидив и метастазирование [307-309]. Следовательно, способность реконструировать внутриопухолевую иерархию и динамику на моделях опухолей имеет решающее значение для понимания биологии рака у детей. Однако до сих пор внутриопухолевая гетерогенность и лежащие в ее основе механизмы остаются черным ящиком в области детской онкологии, в основном из-за нехватки опухолевого

материала и с учетом того, что химиотерапия чаще всего назначается детям и подросткам перед операцией. В этой связи было показано, что органоиды представляют собой многообещающий подход к созданию моделей злокачественных опухолей *in vitro*, полученных от пациентов, которые точно воспроизводят общие патофизиологические особенности естественного педиатрического туморогенеза и позволяют иметь достаточное количество доступного материала. В самом деле, они представляют собой клеточные модели для исследования негенетической динамики состояния клеток, связанной с устойчивостью к лечению, для изучения новых терапевтических возможностей, поскольку они имитируют внутриопухолевую клеточную гетерогенность, сохраняя иерархию дифференцировки. В данном контексте технология органоидов в сочетании с генной инженерией, световой микроскопией и ортотопической трансплантацией представляется мощным подходом к исследованию клеточной динамики опухолей человека *in vitro* и *in vivo*, как это недавно было продемонстрировано при колоректальном раке [310, 311]. Кроме того, они являются более удобной системой для манипулирования нишевыми компонентами, сигнальными путями и редактированием генома (например, CRISPR / Cas9), чем модели *in vivo*, выступают беспрецедентным способом разгадки динамики опухолевых клеток, в частности отдельных CSC.

Недавно разработанные стратегии отслеживания клонов и клеточной абляции в опухолевых системах предоставили понимание пластичности CSC и доказали, что и CSC, и не-CSC пластичны и способны претерпевать фенотипические переходы в ответ на соответствующие стимулы [310 - 312]. В этой связи применение органоидных технологий могло бы открыть новый путь для фенотипического скрининга лекарственных средств, способных обойти стандартные процессы дифференцировки клонов, наблюдаемые при РМЖ, чтобы остановить злокачественную пролиферацию, задействовав терминальную стадию дифференциации. Такие подходы должны выходить за

рамки классического скрининга лекарств и помогать точно определить клеточные механизмы устойчивости к лечению, связанные с состояниями опухолевых клеток.

В рамках настоящей главы мы поставили перед собой задачу изучить некоторые механизмы формирования химиорезистентности клеток тройного негативного РМЖ к представителям основных классов лекарственных веществ, применяющихся для лечения, – адъювантной и неадъювантной терапии заболевания в клинической практике: представителю препаратов платины – цисплатину, антрациклиновых антибиотиков – доксорубицину, алкалоидов – паклитакселу, таргетных препаратов – эрлотинибу.

В качестве экспериментальной платформы для исследования мы использовали различные клеточные линии рака молочной железы человека, подробно описанные в главе 2 настоящего исследования.

4.1 Роль эффлюкса молекул в формировании противоопухолевой химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы

Для определения роли обратного транспорта молекул противоопухолевых препаратов – цисплатина, доксорубицина, тамоксифена и эрлотиниба использовали две клеточные линии тройного негативного РМЖ человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (НТВ-26), АТСС, США), а другая не экспрессирует протеин обратного транспорта рака молочной железы BCRP (BT20, АТСС, США) и чувствительна ко всем описанным выше веществам.

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).

На рисунках 22 - 25 показаны результаты исследований по инкубированию препаратов в культурах клеток рака молочной железы.

Как хорошо видно, инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей BCRP протеин, с 6,73 мкмоль/л доксорубина сопровождалась формированием значительного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 87,7 % опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации действующего вещества препарата в культуре BCRP-позитивного РМЖ MDA-MB-231 не вызывала формирования цитотоксического действия (различия при межгрупповом сравнении достоверны при $p = 0,001$).

Инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей BCRP протеин, с 4,27 мкмоль/л паклитаксела также сопровождалась формированием заметного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 95,3 % опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации действующего вещества препарата в культуре BCRP-позитивного РМЖ MDA-MB-231 не вызывала формирования цитотоксического действия (различия при межгрупповом сравнении достоверны при $p = 0,0001$).

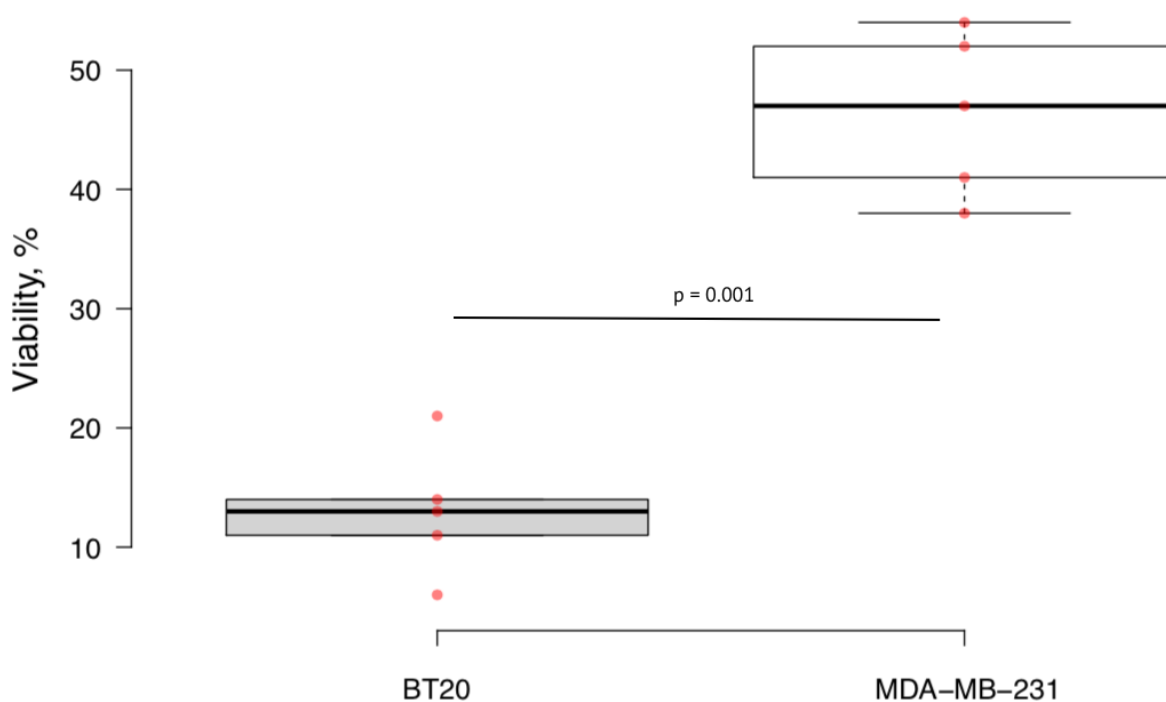


Рисунок 22 – Зависимость цитотоксического действия доксорубицина в концентрации 6,73 мкмоль/л в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия t Стьюдента.

На фоне инкубации клеточных культур исследуемых типов РМЖ с цисплатином в концентрации 4,7 мкмоль/л в течение 24 часов нами были получены результаты, отличающиеся от предыдущих. Так, в частности, инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей VSCRР протеин, с 4,7 мкмоль/л цисплатина приводила к гибели в среднем 93,5 % опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации действующего вещества препарата в культуре VSCRР-позитивного РМЖ MDA-MB-231 также вызывала формирование высокого цитотоксического действия – на уровне 85 % в среднем (различия при межгрупповом сравнении недостоверны, $p = 0,08$).

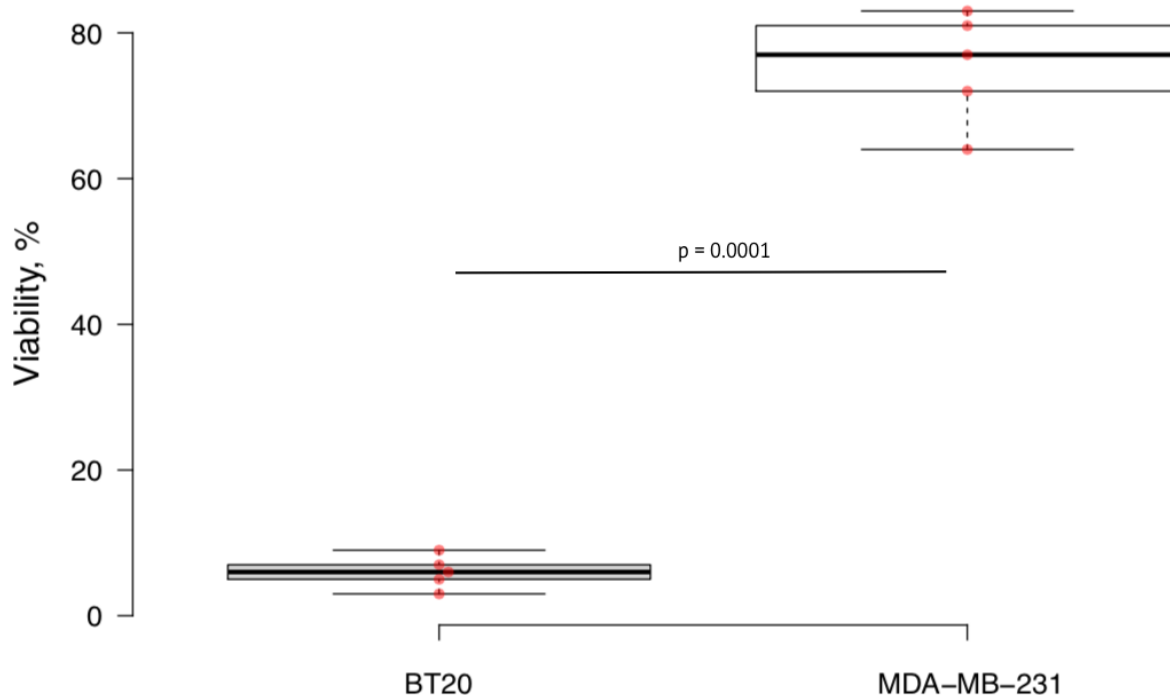


Рисунок 23 – Зависимость цитотоксического действия паклитаксела в концентрации 4,27 мкмоль/л в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия t Стьюдента

Подобные же результаты были получены нами при инкубации опухолевых линий с таргентным препаратом – ингибитором киназ эрлотинибом. В частности, инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей VCRP-протеин, с 2,67 мкмоль/л эрлотиниба приводила к гибели в среднем 85 % опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации действующего вещества препарата в культуре VCRP-позитивного РМЖ MDA-MB-231 также вызывала формирование высокого цитотоксического действия – на уровне 86 % в среднем (различия при межгрупповом сравнении недостоверны, $p = 0,1$).

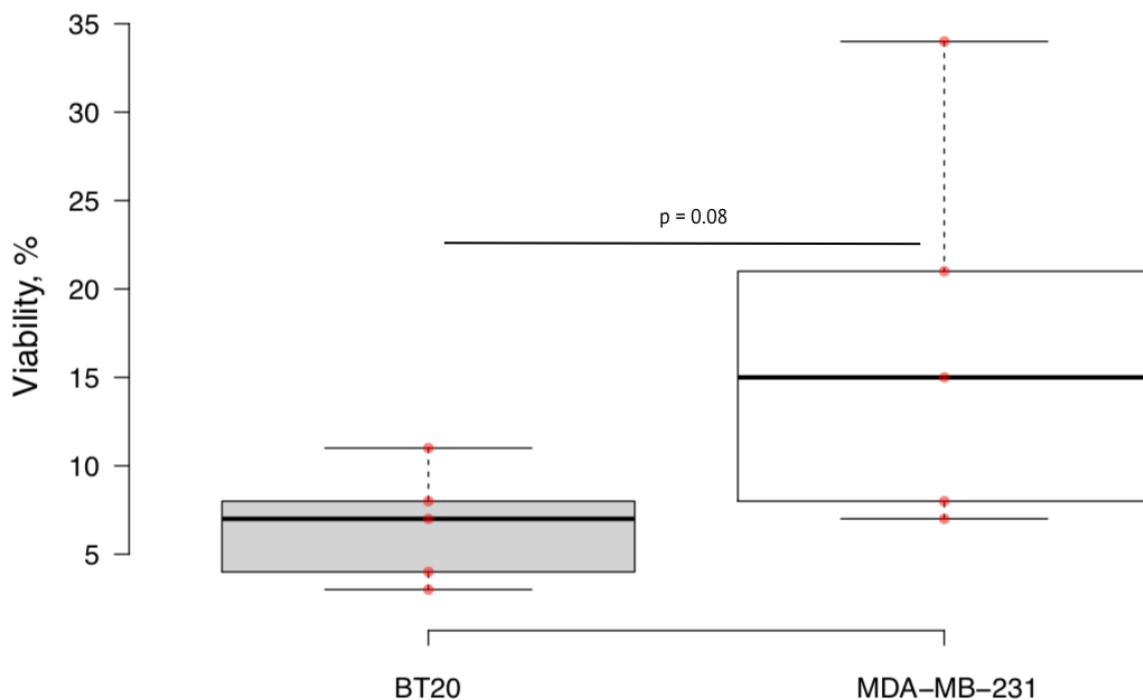


Рисунок 24 – Зависимость цитотоксического действия цисплатина в концентрации 4,7 мкмоль/л в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия t Стьюдента

Следовательно, при анализе полученных результатов можно сделать вывод о том, что сила цитотоксического действия исследуемых веществ на молекулярно-подобных культурах тройного 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 доксорубицину и паклитакселу тройного негативного РМЖ может быть обусловлена обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества.

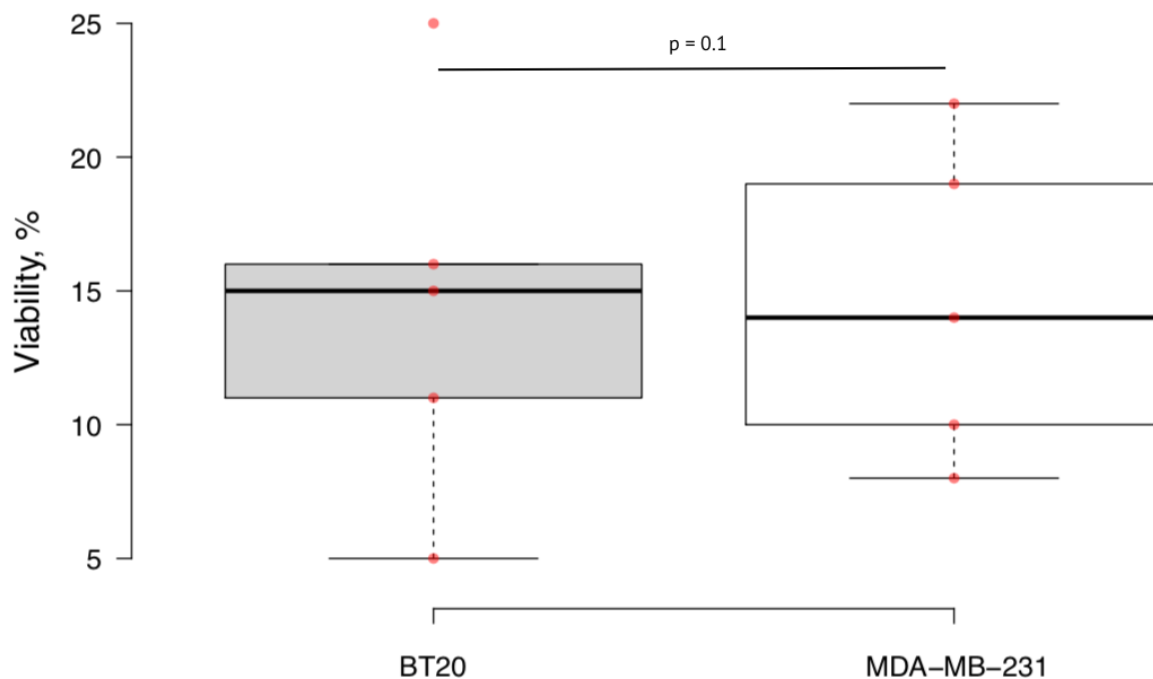


Рисунок 25 – Зависимость цитотоксического действия эрлотиниба в концентрации 2,67 мкмоль/л в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия t Стьюдента

4.2 Мутации гена *BRCA1* как механизм формирования резистентности тройного негативного рака молочной железы к цисплатину

В многочисленных исследованиях было установлено, что мутации гена *BRCA1* встречаются в до 80 % случаев химиорезистентного РМЖ и рака яичников [313]. *BRCA1* взаимодействует как с активаторами, так и с 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 его запуску даже на фоне имеющегося повреждения клеточной ДНК [314]. 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*. Культуры инкубировали с 4,7 мкмоль/л цисплатина, как описано в главе 2 и выше. 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 водный раствор цисплатина добавляли в среду культивирования спустя 24 часа после начала культивации в эффективной противоопухолевой концентрации 4,7 мкмоль/л. 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) (рисунок 26).

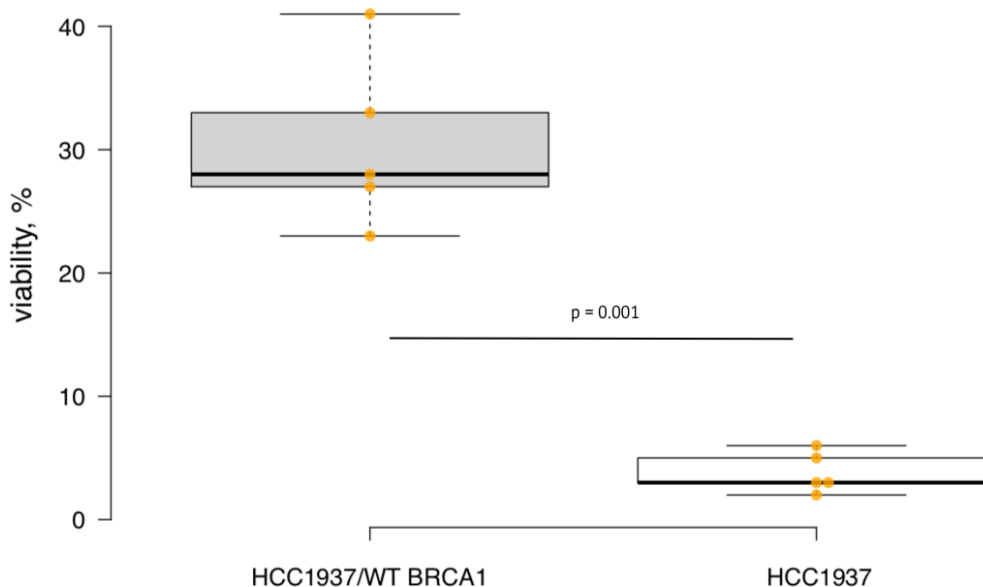


Рисунок 26 – Зависимость цитотоксического действия цисплатина в концентрации 4,7 мкмоль/л в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека HCC1937/^{WT}*BRCA1* и HCC1937; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия t Стьюдента

Мы установили, что подавление роста опухолевых клеток в указанных культурах статистически значимо различалось: если в культуре мутантной опухоли по гену *BRCA1* наблюдали практически полное ингибирование роста, то в реконститутивном штамме культуры РМЖ НСС1937/^{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 (рисунок 27).

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 НСС1937 отличается гиперэкспрессией *RAD52* и *XRCC4* мРНК и подавлением экспрессии *ERCC1* и *RRM1* при сравнении с линией НСС1937/^{WT}*BRCA1* (рисунок 28).

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 тройного негативного РМЖ к препаратам платиновой группы.

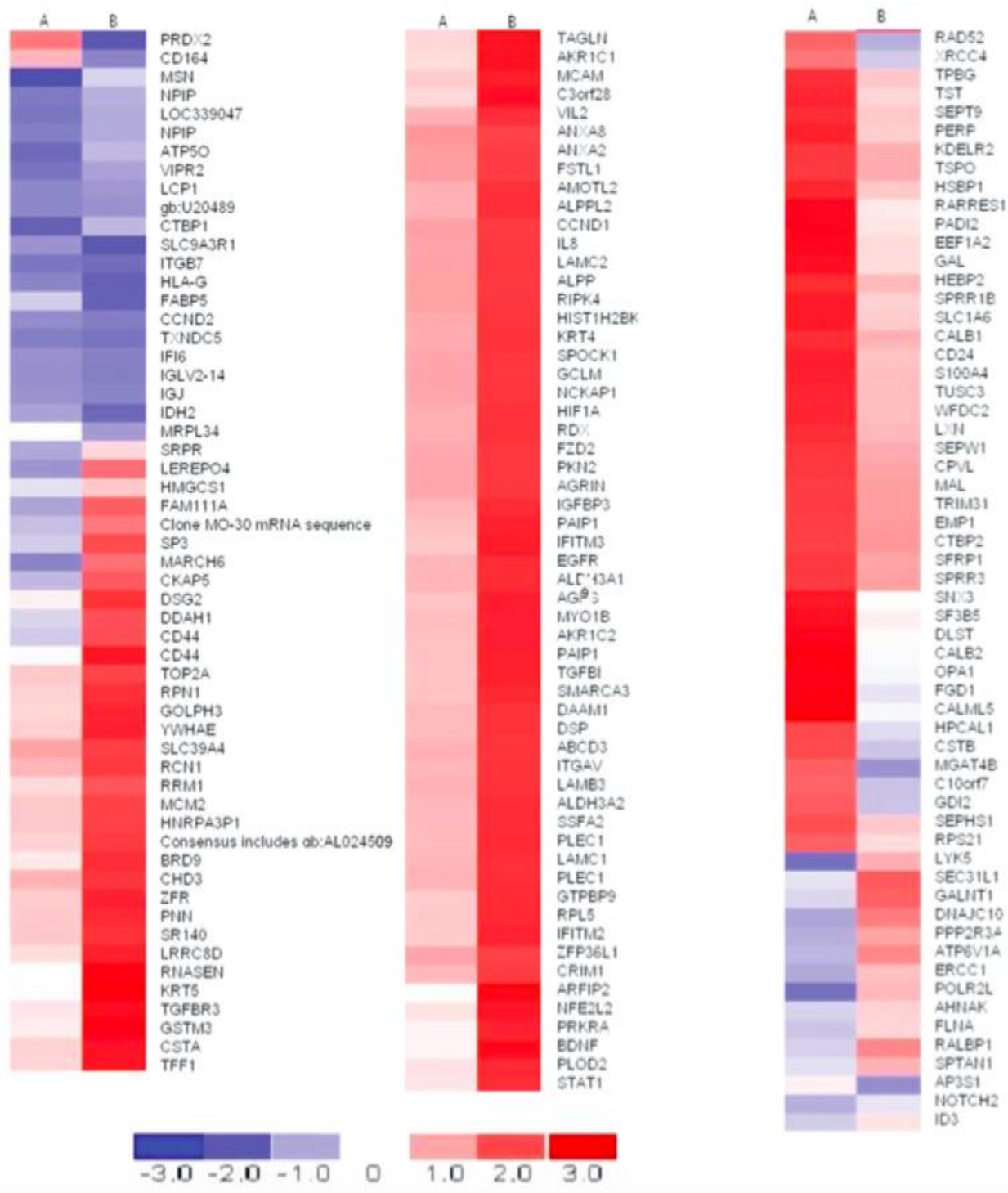


Рисунок 27 – Иерархическая кластеризация данных экспрессии генов. Генетическое профилирование проведено в клетках культур HCC1937 (А) и HCC1937^{WT}BRCA1 (В). Кратность различий более 1,5 была принята как значимая. Цветом отмечен уровень экспрессии генов

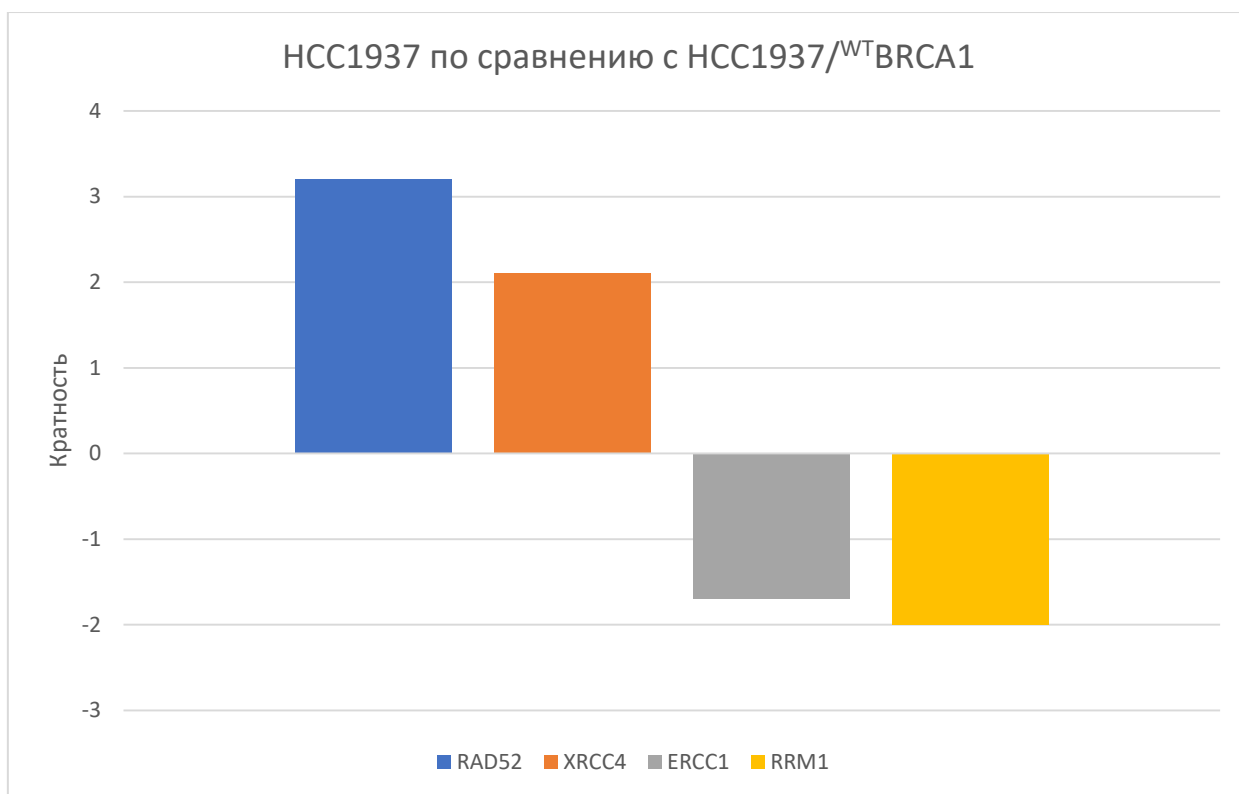


Рисунок 28 – Сравнительная экспрессия генов, регулируемых *BRCA1* и связанных с формированием резистентности к цисплатину, в культурах РМЖ HCC1937 и HCC1937/^{WT}*BRCA1* (пояснение в тексте)

4.3 Вовлеченность некоторых микроРНК в формирование резистентности к средствам лекарственного лечения тройного негативного рака молочной железы

В исследованиях последних лет было показано, что микроРНК играют значимую роль в формировании химиорезистентности клеток РМЖ к химиотерапевтическим воздействиям. В частности, микроРНК-451 и микроРНК-326 подавляют экспрессию MDR-зависимых генов *MDR1* и *MDR2*, повышая чувствительность культуры опухолевых клеток РМЖ человека MCF-7 к доксорубину [315, 316].

Другие микроРНК способны активировать рост опухолевых клеток РМЖ в отсутствие эстрогенной стимуляции и тем самым снижать их чувствительность к эндокринному фармакологическому воздействию за счет

подавления экспрессии альфа-эстрогеновых рецепторов [317]. Например, микроРНК-221/222, микроРНК 342-3p, микроРНК-873 и Let-7b/Let-7i обуславливают резистентность к тамоксифену за счет ингибирования экспрессии мишеней – альфа-эстрогеновых рецепторов и p27Kip1 [318, 319].

МикроРНК-129-5p способна ингибировать В1-фрагмент семейства АТР (АВСВ1) [320]. Известно, что микроРНК-200с может восстанавливать чувствительность РМЖ к паклитакселу, подавляя TUBB3, ZEB1 и ZEB2 [321], в то время как микроРНК-125, напротив, обуславливает Bcl2-опосредованную химиорезистентность РМЖ к паклитакселу. Также в последнее время в литературе обсуждается возможность участия некоторых регуляторных микроРНК в формировании резистентности злокачественных опухолей к таргетному воздействию [322]. Для проверки данной гипотезы изучили экспрессию опухолевыми клетками линии MDA-MB-231 с приобретенной резистентностью к эрлотинибу микроРНК-218 и микроРНК Let-7. Результаты представлены на рисунке 29.

Резистентность культуры тройного 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. Результаты оценивались при культивировании клеток MDA-MB-231 нативной культуры и резистентной культуры в присутствии 2,67 мкмоль/л эрлотиниба.

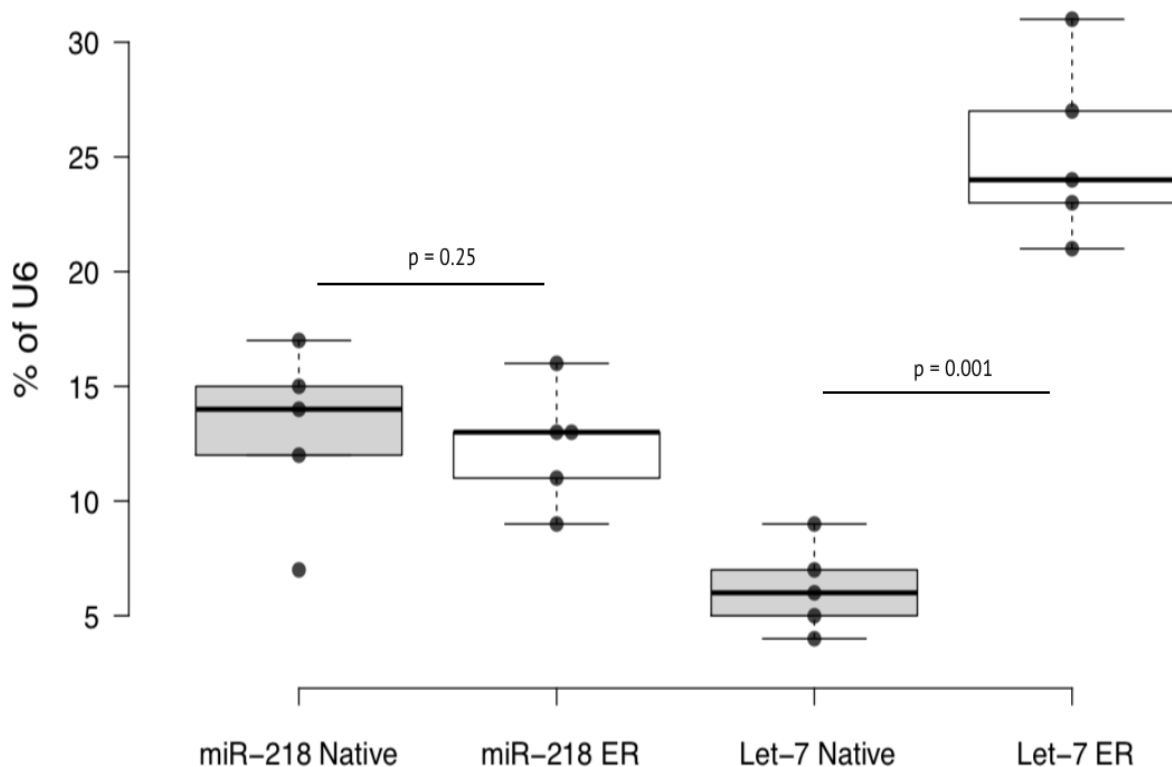


Рисунок 29 – Сравнительная экспрессия микроРНК-218 и микроРНК Let-7 в культурах тройного негативного РМЖ MDA-MB-231: чувствительной к эрлотинибу (Native) и резистентной к эрлотинибу (ER) при их инкубировании в присутствии 2,67 мкмоль/л эрлотиниба (пояснение в тексте); достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия t Стьюдента

Как видно, экспрессия микроРНК-218 не отличалась в клетках чувствительной к эрлотинибу (Native) и резистентной к нему 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 тройного негативного РМЖ MDA-MB-231, нечувствительной к эрлотинибу, была значительно выше таковой для культуры сравнения ($p = 0,001$ при межгрупповом сравнении). Таким образом, можно заключить, что в формировании резистентности тройного негативного РМЖ к таргетному препарату эрлотинибу задействован сигнальный путь опосредованный микроРНК Let-7. Подводя итог описанного раздела работы, можно с

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

ГЛАВА 5. СКРИНИНГ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

В данной главе изложены результаты изучения острой токсичности и специфической цитотоксичности в ряду перспективных соединений, объединенных общностью химической структуры, – производных пиридинкарбонновых кислот, которые по многочисленным литературным данным в настоящее время рассматриваются как источники целого ряда таргетных молекул, обладающих широким противобластомным потенциалом.

В настоящем исследовании исходя из главной цели по разработке стратегии преодоления первичной и вторичной химиорезистентности рецидивной и метастатической тройной негативной карциномы молочной железы, показано, что именно производные пиридинкарбонновых кислот могут выступать как потенциальная фармакотерапевтическая альтернатива для существующих подходов к консервативному лечению заболевания.

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.

В результате выполнения настоящего раздела работы рассчитаны показатели острой токсичности при различных путях введения, определены

перспективы для использования того или иного пути введения в последующих экспериментах, а также установлены диапазоны эффективных цитотоксических концентраций для каждого вещества в зависимости от опухолевой культуры.

5.1 Острая токсичность производных пиридинкарбоновых кислот при различных путях введения

При изучении острой токсичности при внутрибрюшинном пути введения растворы исследуемых веществ в объеме 0,5 мл в возрастающих концентрациях вводили экспериментальным мышам без предварительного обезболивания. Каждая доза вещества вводилась группе, включавшей не менее 5 животных, для получения нормального распределения и достижения статистической репрезентативности результатов. За сутки перед процедурой животных лишали пищи при сохранении неограниченного доступа к питьевой воде.

После введения животные помещались в прозрачные клетки из полистирола с зарешеченной крышкой. Наблюдение за их поведением, внешним видом, регистрацию гибели проводили в течение первых суток с применением системы видеофиксации (система для оценки поведенческих реакций с системой видеофиксации производства ООО «Открытая наука», Санкт-Петербург, Россия).

Период наблюдения за животными составил 14 суток, в течение которых ежедневно оценивали общее состояние мышей.

Подход к определению показателя ЛД₅₀ при внутрижелудочном введении соответствовал описанному выше с той лишь разницей, что вещества вводились в желудок животным при помощи специальной иглы для кормления производства «World Precision Instruments» (США) после их гомогенизации в 2% крахмальном клейстере в объеме, не превышающем 0,7 мл.

Токсичность при внутривенном пути введения определялась с расчетом показателя ЛД₁₀₀, вещества при этом вводили в хвостовую вену фиксированных в специальном холдере производства компании «Kent Scientific» (США) на подогреваемой площадке от системы неинвазивной регистрации АД «CODA» того же производителя. Растворы вводили с помощью аппаратной системы микроинъекций «GenieTouch» производства компании «Kent Scientific» (США).

В таблице 5 представлены результаты исследования острой токсичности исследуемых соединения при внутрибрюшинном пути введения.

Показатель острой токсичности ЛД₅₀ соединения ЛХТ-5-16 (5-этил-3-гидрокси-6-метилпиридиния 2,6-диаминогексаноата) при внутрибрюшинном введении составила 785±21 мг/кг, при внутрижелудочном – 1 024±24 мг/кг. Показатель острой токсичности ЛД₁₀₀ вещества ЛХТ-5-16 при внутривенном введении был равен в среднем 1 378±17 мг/кг. При этом между данными показателями установлены статистически значимые различия, которые с учетом сведений о хорошей растворимости соединения в воде (см. главу 2) могут свидетельствовать о том, что биодоступность вещества при введении в желудок снижается. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения, по классификации ОЕСД – к 4-му классу токсичности.

Показатель острой токсичности ЛД₅₀ соединения ЛХТ-5-18 (бис-(N-2-аминоэтансульфоноат магния) дипропил-2-этанамида) при внутрибрюшинном введении составил 674±37 мг/кг, при внутрижелудочном – 1 257±32 мг/кг. Показатель острой токсичности ЛД₁₀₀ вещества ЛХТ-5-18 при внутривенном введении был равен в среднем 994±20 мг/кг. При этом между указанными показателями установлены статистически значимые различия, которые с учетом данных о невысокой растворимости соединения в воде (см. главу 2) могут свидетельствовать о том, что биодоступность

Таблица 5 - Острая токсичность производных пиридинкарбоновых кислот при внутрибрюшинном пути введения лабораторным мышам

№ п/п	Шифр соединения	Химическая структура	n	ЛД ₅₀ / ЛД ₁₀₀ *		СІ при 95%
				M±m		
1	2	3	4	5	6	7
1	ЛХТ-5-16	5-этил-3-гидрокси-6-метилпиридиния 2,6-диаминогексаноат	65	в/б	785±21	[743÷827]
			80	в/ж	1 024±24 ^B	[976÷1 072]
			7	в/в	1 378±17 ^A	[1 334÷1 412]
2	ЛХТ-5-18	бис-(N-2-амино-этансульфоноат магния) дипропил-2-этанамид	70	в/б	674±37	[600÷748]
			65	в/ж	1 257±32 ^B	[1 193÷1 321]
			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	1 768±35 ^B	[1 698÷1 838]
			7	в/в	399±10 ^B	[379÷419]

Продолжение Таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7
5	ЛХТ-15-19	5-метил-2,4(1Н,3Н)-пиридиндиона N-ацетилпентанодиоат	55	в/б	584±13	[558÷610]
			55	в/ж	827±18 ^В	[791÷913]
			6	в/в	994±17 ^А	[960÷1028]
6	ЛХТ-16-19	2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо [d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрил 4-нитробензамидо-2-аминоэтансульфоновой к-ты	125	в/б	2 564±38	[2 488÷2 644]
			75	в/ж	3 585±35 ^В	[3 515÷3 655]
			8	в/в	2 996±54 ^А	[2 888÷3 104]
7	ЛХТ-17-19	9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2Н)-она 2-гидроксипентанодиоата	65	в/б	160±8	[144÷176]
			70	в/ж	176±10	[156÷196]
			7	в/в	207±11 ^А	[276÷319]
8	ЛХТ-18-19	дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,О цинка	55	в/б	231±12	[206÷255]
			65	в/ж	354±16 ^В	[322÷386]
			6	в/в	424±12 ^А	[400÷448]

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

вещества при введении в желудок резко снижается. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения, по классификации ОЕСД – к 4-му классу токсичности.

Показатель острой токсичности LD_{50} соединения ЛХТ-13-19 (3-пиридинкарбамид 2-амино-5-метилпиридина) при внутрибрюшинном введении составил 146 ± 6 мг/кг, при внутрижелудочном – 189 ± 4 мг/кг. Показатель острой токсичности LD_{100} вещества ЛХТ-13-19 при внутривенном введении был равен в среднем 254 ± 11 мг/кг. При этом между указанными показателями установлены статистически значимые различия, которые с учетом данных о плохой растворимости соединения в воде и хорошей растворимости в липидных эмульсиях (см. главу 2) могут свидетельствовать о том, что биодоступность вещества при введении в желудок возрастает. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения. По классификации ОЕСД – к 3-му классу токсичности для внутривенного и внутрибрюшинного пути и ко 2-му классу – для внутрижелудочного пути введения.

Показатель острой токсичности LD_{50} соединения ЛХТ-14-19 (3-(N-ацетил-6-аминогексаноат) церия) при внутрибрюшинном введении составил 358 ± 12 мг/кг, при внутрижелудочном – $1\ 768 \pm 35$ мг/кг. Показатель острой токсичности LD_{100} вещества ЛХТ-14-18 при внутривенном введении был равен в среднем 399 ± 10 мг/кг. При этом между показателями LD_{50} при внутрибрюшинном введении и LD_{100} при внутривенном введении и индексом токсичности при введении в желудок установлены статистически значимые различия, которые с учетом данных о плохой растворимости соединения в воде и слабой растворимости в липидных эмульсиях (см. главу 2) позволяют утверждать, что биодоступность вещества при введении в желудок резко

снижается. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения, по классификации ОЕСД – к 3-му классу токсичности для внутривенного и внутрибрюшинного путей введения.

Показатель острой токсичности LD_{50} соединения ЛХТ-15-19 (3-5-метил-2,4(1Н,3Н)-пиридиндиона N-ацетилпентанодиоата) при внутрибрюшинном введении составил 584 ± 13 мг/кг, при внутрижелудочном – 827 ± 18 мг/кг. Показатель острой токсичности LD_{100} вещества ЛХТ-15-19 при внутривенном введении был равен в среднем 994 ± 17 мг/кг. При этом между данными показателями установлены статистически значимые различия, которые с учетом сведений о плохой растворимости соединения в воде и хорошей растворимости в липидных эмульсиях (см. главу 2) могут свидетельствовать о том, что биодоступность вещества при введении в желудок возрастает и сопоставима с острой токсичностью при внутривенном пути введения. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения, по классификации ОЕСД – к 4-му классу для внутрижелудочного и внутрибрюшинного пути и к 5-му классу – для внутривенного пути введения.

Показатель острой токсичности LD_{50} соединения ЛХТ-16-19 (2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо [d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрил 4-нитробензамидо-2-аминоэтансульфоновой кислоты) при внутрибрюшинном введении составил 2564 ± 38 мг/кг, при внутрижелудочном – 3585 ± 35 мг/кг. Показатель острой токсичности LD_{100} вещества ЛХТ-16-19 при внутривенном введении был равен в среднем 2996 ± 54 мг/кг. При этом между показателями LD_{50} при внутрибрюшинном введении и LD_{100} при внутривенном введении и индексом токсичности при введении в желудок установлены статистически значимые различия, которые с учетом данных о

плохой растворимости соединения в воде и слабой растворимости в липидных эмульсиях (см. главу 2) позволяют утверждать, что биодоступность вещества при введении в желудок существенно снижается. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении внутрижелудочного пути введения и к 4-му классу веществ (малотоксичные) для внутрибрюшинного и внутривенного путей введения, по классификации ОЕСД соединение ЛХТ-16-19 относится к 5-му классу токсичности для всех изученных путей введения.

Показатель острой токсичности LD_{50} соединения ЛХТ-17-19 (9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипутандиоата) при внутрибрюшинном введении составил 160 ± 8 мг/кг, при внутрижелудочном введении – 176 ± 10 мг/кг. Показатель острой токсичности LD_{100} вещества ЛХТ-17-19 при внутривенном введении был равен в среднем 207 ± 11 мг/кг. При этом между указанными показателями установлены статистически значимые различия, которые с учетом данных о невысокой растворимости соединения в воде и хорошей растворимости в липидных эмульсиях (см. главу 2) могут свидетельствовать о том, что биодоступность вещества при введении в желудок сопоставима с острой токсичностью при внутрижелудочном пути введения. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения, по классификации ОЕСД – к 4-му классу токсичности для каждого пути введения.

Показатель острой токсичности LD_{50} соединения ЛХТ-18-19 (дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,O цинка) при внутрибрюшинном введении составил 231 ± 12 мг/кг, при внутрижелудочном – 354 ± 16 мг/кг. Показатель острой токсичности LD_{100} вещества ЛХТ-17-19 при внутривенном введении был равен в среднем 424 ± 12 мг/кг. При этом между указанными

показателями установлены статистически значимые различия, которые с учетом данных о хорошей растворимости соединения в воде и плохой растворимости в липидных эмульсиях (см. главу 2) могут свидетельствовать о том, что биодоступность вещества при введении в желудок снижается по сравнению внутрибрюшинным введением. По действующей классификации в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 соединение относится к 3-му классу веществ (умеренно токсичные) в отношении каждого изученного пути введения, по классификации ОЕСД – к 4-му классу токсичности для каждого пути введения.

Таким образом, 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.

5.2 Скрининг противоопухолевой цитотоксичности производных пиридинкарбоновых кислот в культуре клеток человеческих эпителиальных опухолей

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 моделей *in vitro* использовали три культуры человеческих эпителиальных опухолей – культуру рака толстого кишечника HT29, культуру 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.

Клеточную культуру культивировали в среде ДМЕМ с прибавлением 2 mM глутамина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки во влажной атмосфере с 5% содержанием углекислого газа при температуре 37⁰ C.

Первоначально клетки каждой опухолевой линии рассеивались в количестве 8×10^3 штук на лунку в 96-ячеечный планшет. Фармакотоксикологическое воздействие на культуру проводили в экспоненциальной фазе роста клеток. Для этого водные растворы соединений (в ряде случаев содержащие твин-80) добавляли в среду культивирования спустя 24 часа после начала культивации в диапазоне концентраций от 10^{-3} до 10^{-9} M с порядковым шагом. 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). Для каждого вещества в каждой культуре были рассчитаны средние

ингибирующие концентрации (IC_{50}) в тех случаях, где это условие было применимо.

Результаты изучения цитотоксичности производных пиридинкарбоновых кислот в культуре рака толстого кишечника HT29 представлены на рисунках 30 и 31. В качестве препарата сравнения выступал антрациклиновый антибиотик доксорубицин.

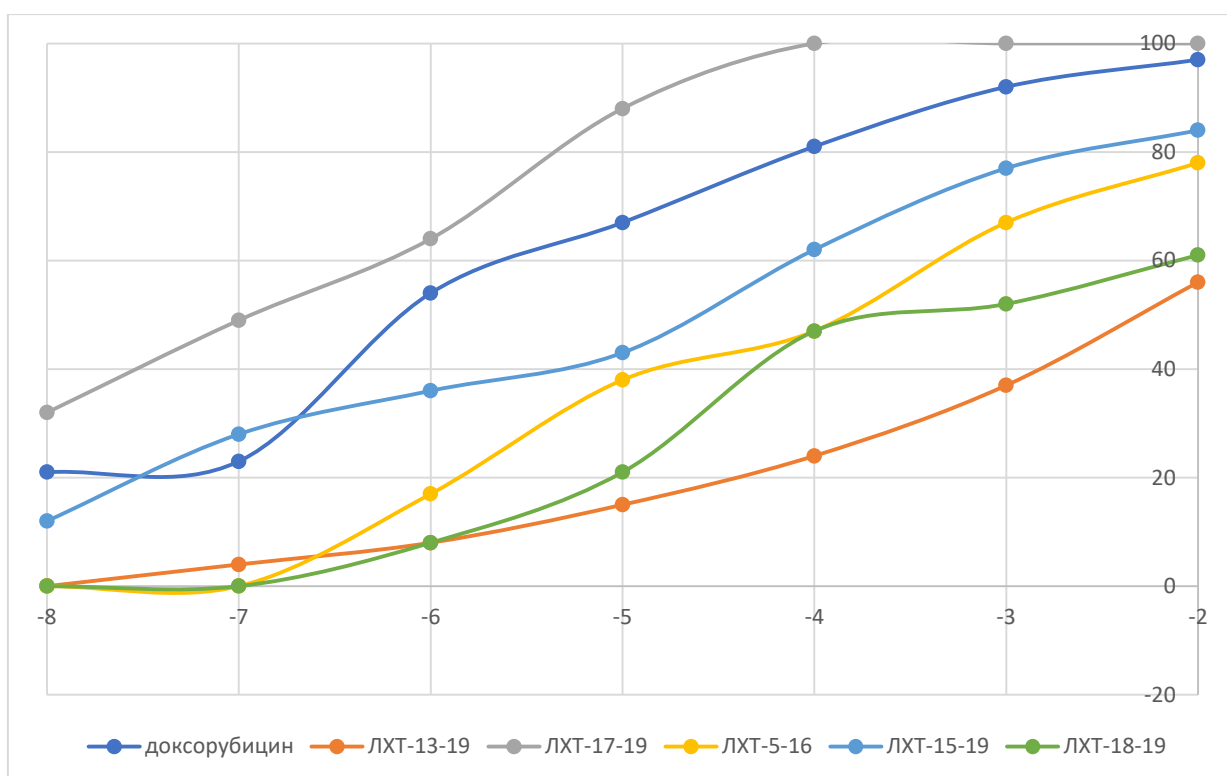


Рисунок 30 – Зависимость цитотоксического действия производных пиридинкарбоновых кислот и референтного противоопухолевого препарата доксорубицина от их концентраций (в диапазоне от 10^{-2} до 10^{-8} М) в линейных координатах при культивировании культуры клеток человеческого рака толстой кишки HT29; по оси ординат – процент погибших клеток в тесте МТТ, по оси абсцисс – порядок концентрации

Расчетное значение показателя эффективной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для производных пиридинкарбоновых кислот при их добавлении в культуру HT29 проиллюстрирован на рисунке 30: величина показателя средней подавляющей концентрации для соединения ЛХТ-5-16

(5-этил-3-гидрокси-6-метилпиридиния 2,6-диаминогексаноата) составила $3,3 \times 10^{-4}$ М, величина показателя средней подавляющей концентрации для соединения ЛХТ-17-19 (9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2Н)-он

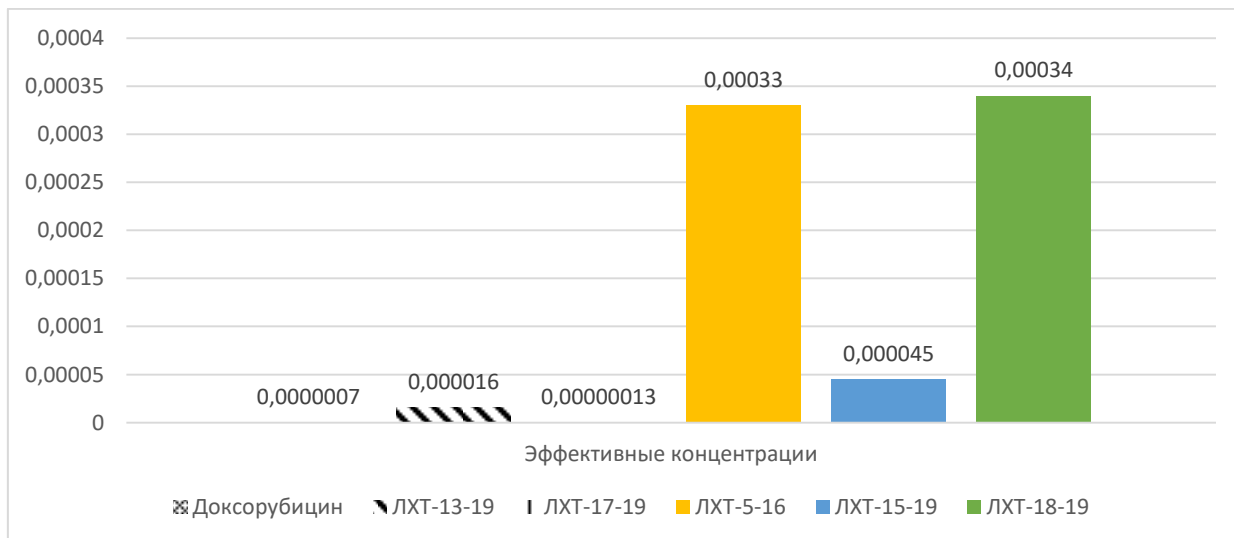


Рисунок 31 – Расчетные значения показателя эффективной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для производных пиридинкарбоновых кислот при их добавлении в культуру NT29

2-гидроксисукцината) была равна $1,3 \times 10^{-7}$, для ЛХТ-15-19 (5-метил-2,4 (1Н,3Н)-пиридиндиона N-ацетилпентанодиоата) была равна $4,5 \times 10^{-5}$, для ЛХТ-18-19 (дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,O цинка) – $3,4 \times 10^{-4}$ для препарата сравнения доксорубина – 6×10^{-7} и для вещества N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (соединение ЛХТ-13-19) – $7,6 \times 10^{-3}$ М.

Исследование на культуре человеческого рака толстого кишечника NT29 позволило установить, что наибольшую цитотоксическую активность проявляют следующие производные пиридинкарбоновых кислот: ЛХТ-13-19, ЛХТ-15-19 и ЛХТ-17-19, при этом эффективная подавляющая концентрация последнего соединения была наименьшей. Соединения ЛХТ-5-16 и ЛХТ-18-19 обладают слабым цитотоксическим действием на представленной модели.

Результаты наблюдений в культуре клеток инвазивного рака мочевого пузыря проиллюстрированы на рисунках 32 и 33.

Расчетное значение показателя эффективной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для производных пиридинкарбоновых кислот при их добавлении в культуру клеток инвазивного рака мочевого пузыря EJ представлено на рисунке 32: величина показателя средней подавляющей концентрации для соединения ЛХТ-5-16 (5-этил-3-гидрокси-6-метилпиридиния 2,6-диаминогексаноата) составила $1,2 \times 10^{-3}$ М, величина показателя средней подавляющей концентрации для соединения ЛХТ-17-19

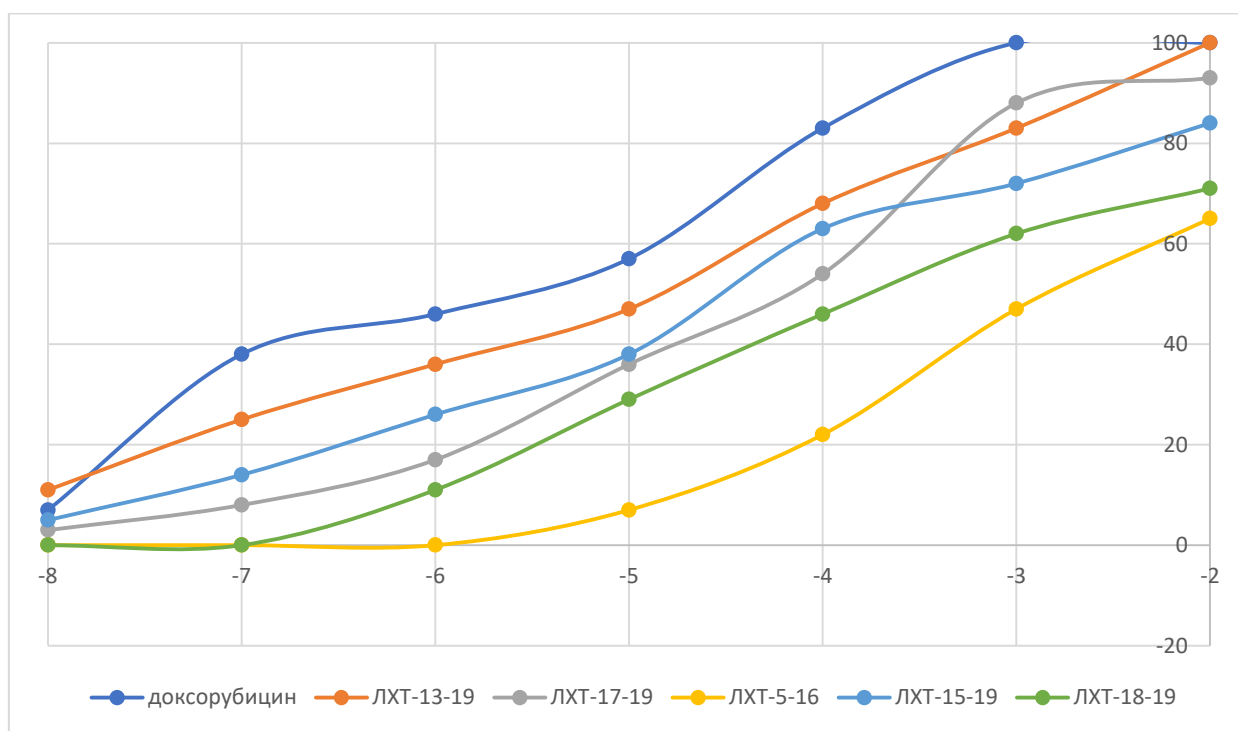


Рисунок 32 – Зависимость цитотоксического действия производных пиридинкарбоновых кислот и референтного противоопухолевого препарата доксорубина от их концентраций (в диапазоне от 10^{-2} до 10^{-8} М) в линейных координатах при культивировании культуры клеток инвазивного рака мочевого пузыря EJ; по оси ординат – процент погибших клеток в тесте МТТ, по оси абсцисс – порядок концентрации

(9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2H)-он 2-гидроксисукцината) была равна $4,8 \times 10^{-5}$, для ЛХТ-15-19 (5-метил-2,4 (1H,3H)-пиридиндиона N-

ацетилпентаноидоата) была равна $5,5 \times 10^{-5}$, для ЛХТ-18-19 (дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,O цинка) – $2,8 \times 10^{-4}$ для препарата сравнения доксорубицина – $1,4 \times 10^{-5}$ и для вещества N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (соединение ЛХТ-13-19) – $8,4 \times 10^{-5}$ М.

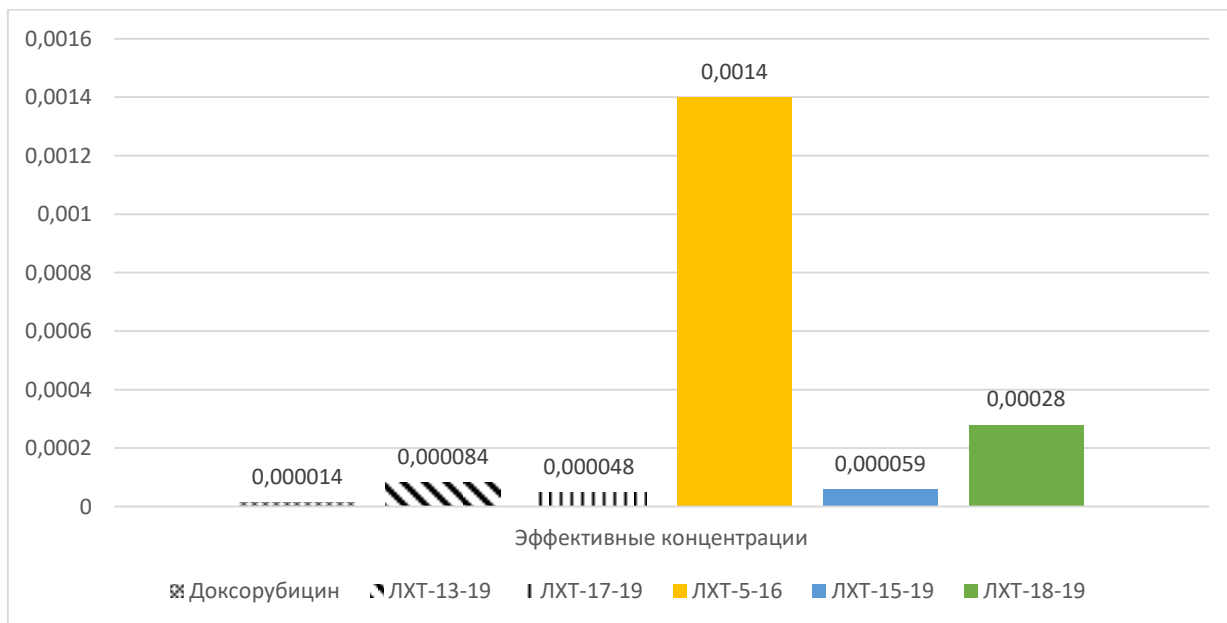


Рисунок 33 – Расчетное значение показателя эффективной ингибирующей концентрации (IC₅₀) для производных пиридинкарбоновых кислот при их добавлении в культуру клеток человеческого рака мочевого пузыря (ЕJ)

Исследование на культуре клеток инвазивного рака мочевого пузыря EJ позволило установить, что наибольшую цитотоксическую активность проявляют следующие производные пиридинкарбоновых кислот: ЛХТ-13-19, ЛХТ-15-19 и ЛХТ-17-19, при этом эффективная подавляющая концентрация последнего соединения была наименьшей, сопоставимой с IC₅₀ референтного противоопухолевого средства доксорубицина и ЛХТ-15-19. Соединения ЛХТ-5-16 и ЛХТ-18-19, так же как и на предыдущей модели, обладают слабым цитотоксическим действием.

Третья культура, выбранная нами в качестве модели цитотоксического скрининга, была представлена клетками эстроген-зависимого рака молочной железы MCF-7.

Результаты изучения противоопухолевой цитотоксичности производных пиридинкарбоновых кислот в культуре эстроген-зависимого рака молочной железы MCF-7 приведено на рисунках 34 и 35. В качестве препарата сравнения выступал препарат платины цисплатин в том же диапазоне концентраций.

Расчетное значение показателя эффективной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для производных пиридинкарбоновых кислот при их добавлении в культуру рака молочной железы MCF-7 проиллюстрирован на рисунке 34: величину показателя средней подавляющей концентрации для соединения ЛХТ-5-16 (5-этил-3-гидрокси-6-метилпиридиния 2,6-диаминогексаноата) определить не удалось в силу низкой эффективности соединения, для соединения ЛХТ-17-19 (9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2H)-он 2-гидроксисукцината) она была равна $1,6 \times 10^{-5}$, для ЛХТ-15-19 (5-метил-2,4 (1H,3H)-пиридиндиона N-ацетилпентанодиоата) была равна $2,1 \times 10^{-5}$, для ЛХТ-18-19 (дихлоро-(гидразид-4-пиридиноата)-N,O цинка) – $3,0 \times 10^{-3}$ для препарата сравнения цисплатина – $2,1 \times 10^{-5}$ и для вещества N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (соединение ЛХТ-13-19) – $3,8 \times 10^{-5}$ M.

Исследование на культуре человеческого эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7 позволило установить, что наибольшую цитотоксическую активность проявляют следующие производные пиридинкарбоновых кислот: ЛХТ-13-19, ЛХТ-15-19 и ЛХТ-17-19, при этом эффективная подавляющая концентрация последнего соединения была наименьшей. Соединение ЛХТ-5-16 не проявляет цитотоксических свойств в отношении указанной клеточной линии, тогда как вещество ЛХТ-18-19 обладает слабым цитотоксическим действием на представленной модели.

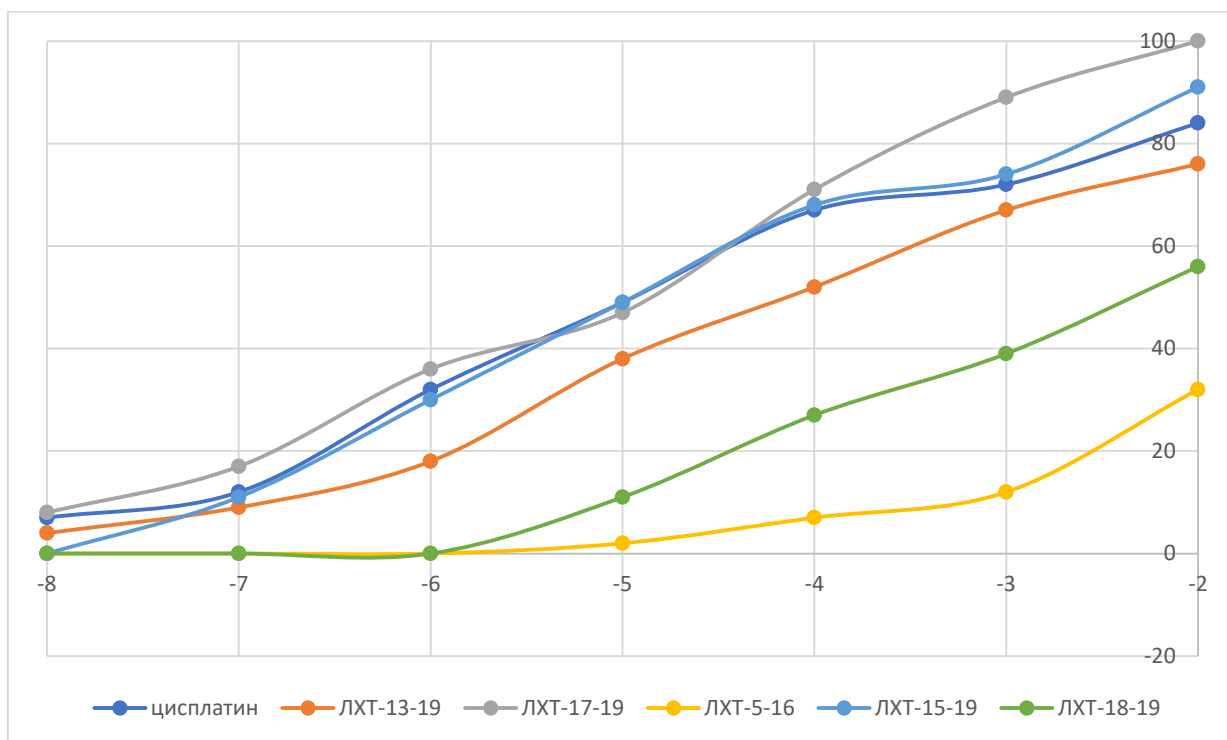


Рисунок 34 – Зависимость цитотоксического действия производных пиридинкарбоновых кислот и референтного противоопухолевого препарата цисплатина от их концентраций (в диапазоне от 10^{-2} до 10^{-8} М) в линейных координатах при культивировании культуры клеток эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7; по оси ординат – процент погибших клеток в тесте МТТ, по оси абсцисс – порядок концентрации

В связи с полученными результатами для последующего исследования на животной модели сингенной опухоли с целью определения противоопухолевого потенциала были отобраны вещества ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 как наиболее перспективные – проявляющие активность в отношении широкого спектра клеточных линий человеческих опухолей, в том числе линии эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7.

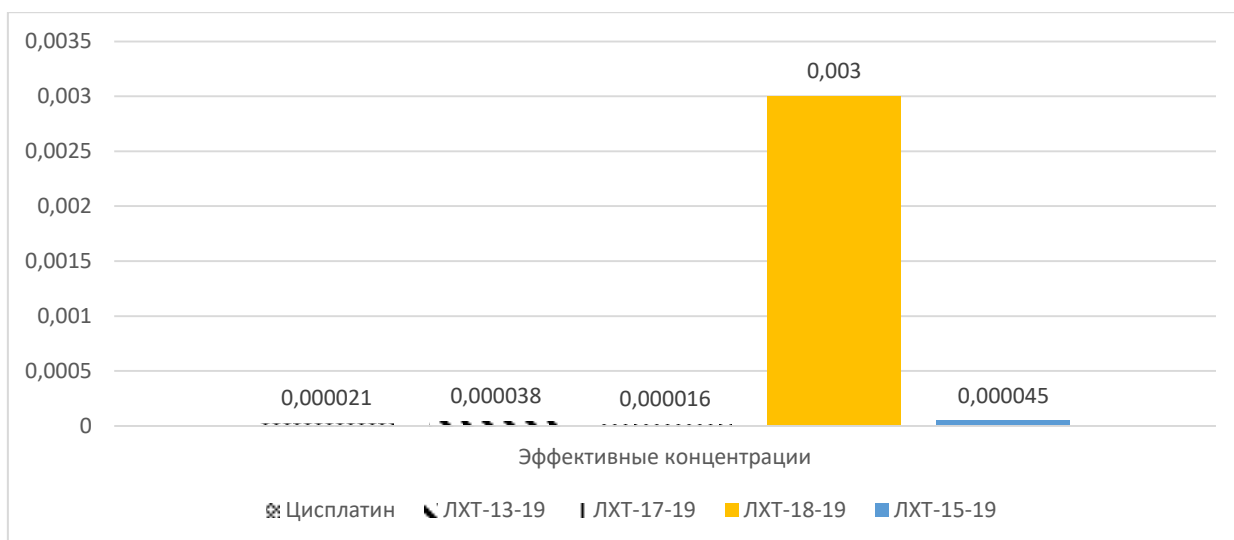


Рисунок 35 – Расчетное значение показателя эффективной ингибирующей концентрации (IC₅₀) для производных пиридинкарбоновых кислот при их добавлении в культуру MCF-7

5.3 Определение эффективных противоопухолевых доз некоторых соединений пиридинкарбоновых кислот

Для предварительного обоснования противоопухолевой активности у отобранных на предыдущем этапе нашего исследования соединений ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 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.

Выбор опухолевой системы был обусловлен высокой злокачественностью опухолевого штамма, его радио- и химиорезистентностью, тотальным метастазированием в брюшину с развитием асцитного варианта лимфолейкоза и гибелью 100 % животных после инокуляции опухолевых клеток.

Вещества ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 вводили внутривенно и внутрижелудочно в дозах, пропорциональных 1, 5 и 10 % от показателя ЛД₅₀ (половины значения показателя ЛД₁₀₀ у мышей при внутривенном введении), определенного у данного вида животных при соответствующем пути введения. Продолжительность курса составляла 5 суток для обоих путей введения. Противоопухолевый потенциал рассчитывали на основании определения динамики коэффициента K (соответствует интегральному показателю торможения роста опухоли) на 3, 5 и 10-е сутки наблюдения, а также оценки продолжительности жизни животных – носителей опухоли по данным построения кривой Каплана - Мейера. Результаты представлены в таблице 6 и на рисунке 36.

Внутривенное введение препарата сравнения цисплатина в трех терапевтических дозах, охватывающих диапазон переносимых и эффективных доз, вызывало формирование противоопухолевого эффекта на представленной модели, что соответствует литературным данным и позволяет, таким образом, валидизировать модель. Наблюдается рост эффективности подавления увеличения размера опухоли при повышении вводимой суточной дозы от 2,5 до 8,0 мг/кг, при этом в максимальной дозе индекс K к 10-м суткам достигал значения 70, что является общепризнанным критерием эффективности. Что касается антиметастатической активности, то на фоне курсового 5-суточного введения препарата сравнения достоверной антиметастатической активности зарегистрировать не удалось, лишь в максимальной дозе наблюдалась тенденция к снижению частоты метастазирования.

Соединение ЛХТ-13-19 при внутривенном введении проявляло сопоставимый с цисплатином противоопухолевый эффект на модели лимфолейкоза мышей Р388.

Таблица 6 - Противоопухолевая активность ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 при внутривенном и внутрибрюшинном введении у мышей DBA₂ × C57Bl/6j с перевитым сингенным лимфолейкозом P388 (*n*=10 в каждой группе)

Вещество	Доза, мг/кг в сутки	Индекс <i>K</i>			Частота метастазирования, %
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки	
Внутривенное введение					
Контроль	-	-	-	-	100
Цисплатин	2,5	23	35	54	100
	5,3	27	41	68	90
	8,0	34	55	70	80
ЛХТ-13-19	1,3	17	21	34	100
	6,4	21	37	47	100
	12,7	35	48	64	80
ЛХТ-17-19	1,5	32	54	67	90
	7,7	39	68	73	70
	15,4	45	72	77	60*
Внутрижелудочное введение					
Контроль	-	-	-	-	100
Цисплатин	3,7	3	12	14	100
	7,4	7	15	24	100
	11,2	18	25	43	100
ЛХТ-13-19	1,9	10	15	28	100
	9,5	15	31	42	100
	18,9	28	43	57	80
ЛХТ-17-19	1,8	29	46	59	90
	8,8	32	58	64	90
	17,6	38	56	71	70

Примечание: **p*<0,05 при сравнении с контролем (точный критерий Фишера).

Так же как и у препарата сравнения, мы не отмечали формирования антиметастатической активности. У вещества ЛХТ-17-19 значимый с точки зрения перспектив дальнейшего изучения антибластомный эффект по подавлению роста первичного опухолевого узла регистрировали при курсовом введении в дозе 7,7 и 15,4 мг/кг в сутки, когда значение индекса *K* к 10-м суткам превышало 70 %. У данного вещества при введении в высшей

переносимой дозе, составлявшей 10 % от половинного значения LD_{100} при внутривенном пути введения у мышей, установили статистически значимый антиметастатический эффект, проявившийся снижением частоты метастазирования до 60 %.

Внутрижелудочное введение референтного противоопухолевого лекарственного средства сопровождалось выраженной потерей активности, что обусловлено его низкой биодоступностью при данном пути введения.

В то же время курсовое внутрижелудочное введение экспериментальным животным исследуемых веществ в дозах, пропорциональных LD_{50} , определенному при данном пути введения у мышей, не отражалось на ингибировании роста сингенной опухоли: значения индекса К снижались незначительно, однако соединение ЛХТ-17-19 при данном пути введения продемонстрировало высокую эффективность только в максимальной вводимой дозе – 17,6 мг/кг в сутки. Антиметастатическая активность при этом также снижалась и не достигала порога статистической значимости.

ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 также оказывали заметное позитивное влияние на выживаемость лабораторных животных с перевитым сингенным лимфолейкозом Р388 (рисунок 36). Так, в частности, в контрольной группе медиана выживаемости мышей с опухолевым процессом составляла $7,5 \pm 0,6$ сут., что соответствует литературным данным.

Внутривенное введение соединения ЛХТ-13-19 в течение 5 сут. в зависимости от вводимой дозы сопровождалось прогрессивным увеличением продолжительности жизни: медиана выживаемости при введении вещества в дозе 1,3 мг/кг в сутки была равна $8,3 \pm 1,1$ сут., при введении 6,4 мг/кг в сутки – $10,2 \pm 1,0$ сут. и при введении в суточной дозе 12,7 мг/кг – $10,2 \pm 0,9$ сут. (таблица 7).

Внутривенное введение соединения ЛХТ-17-19 в течение 5 сут. в зависимости от вводимой дозы также приводило к статистически значимому

росту продолжительности жизни: медиана выживаемости при введении вещества в дозе 1,5 мг/кг в сутки была равна $10,5 \pm 0,8$ суток, при введении 7,7 мг/кг в сутки – $11,2 \pm 0,9$ сут. и при суточной дозе 15,4 мг/кг – $11,8 \pm 0,7$ сут. (см. таблица 7).

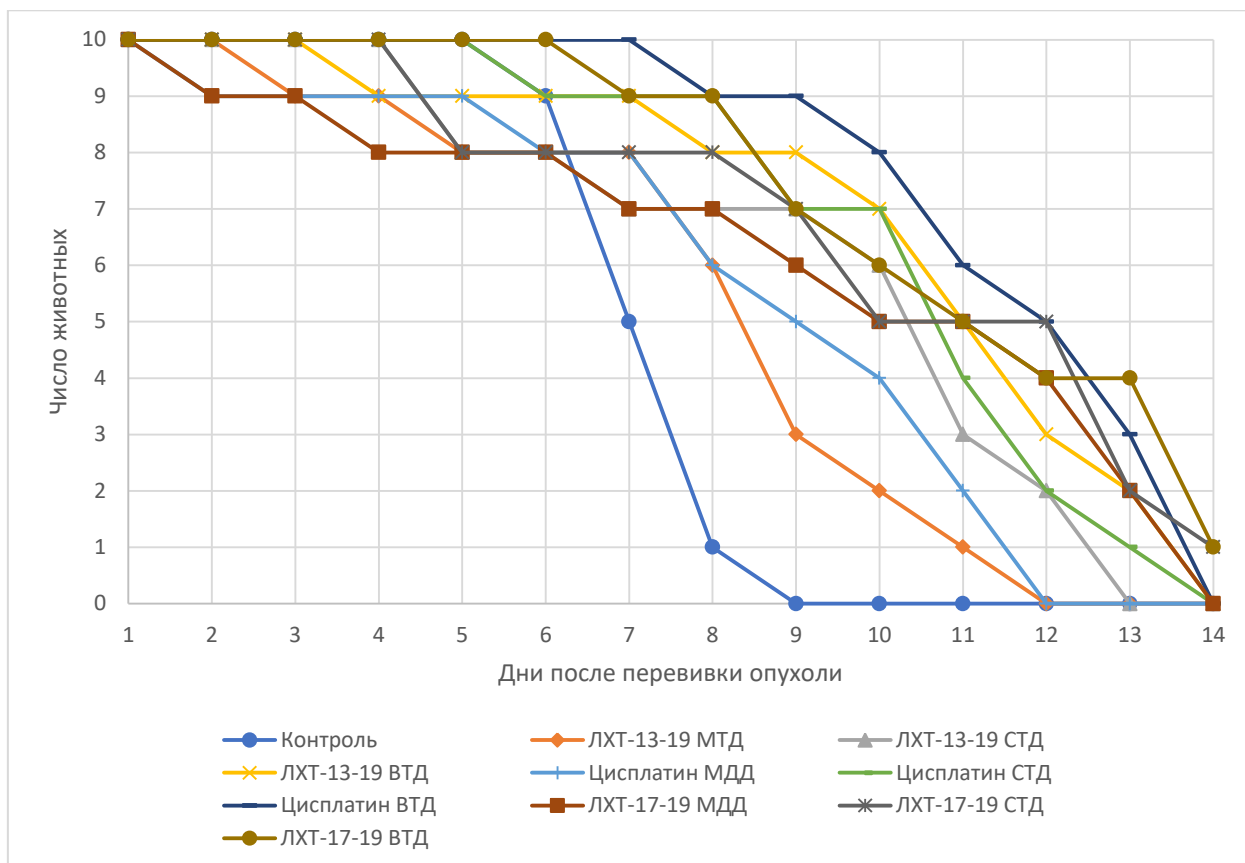


Рисунок 36 – Продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом Р388 мышей на фоне экспериментальной терапии некоторыми производными пиридинкарбоновых кислот (внутривенное введение)

Таблица 7 - Медиана выживаемость мышей DBA₂ × C57Bl/6j с перевитым сингенным лимфолейкозом P388 (n=10 в каждой группе) на фоне экспериментальной терапии исследуемыми веществами при внутривенном и внутрижелудочном введении

Вещество	Доза, мг/кг в сутки	Медиана±SD	p*
Внутривенное введение			
Контроль	-	7,5±0,6	-
Цисплатин	2,5	9,2±0,7	p=0,06
	5,3	10,7±1,1	p=0,04
	8,0	11,9±0,8	p=0,005
ЛХТ-13-19	1,3	8,3±1,1	p=0,08
	6,4	10,2±1,0	p=0,05
	12,7	10,2±0,9	p=0,04
ЛХТ-17-19	1,5	10,5±0,8	p=0,04
	7,7	11,2±0,9	p=0,005
	15,4	11,8±0,7	p=0,005
Внутрижелудочное введение			
Контроль	-	7,4±0,5	
Цисплатин	3,7	7,6±0,6	p=0,5
	7,4	8,4±1,0	p=0,1
	11,2	8,9±0,7	p=0,08
ЛХТ-13-19	1,9	7,5±0,9	p=0,8
	9,5	8,1±1,1	p=0,05
	18,9	9,4±0,8	p=0,06
ЛХТ-17-19	1,8	8,5±0,7	p=0,4
	8,8	9,3±0,9	p=0,06
	17,6	10,2±0,8	p=0,04

Примечание: * при сравнении с контролем (log-rank).

В контрольной группе животных с лимфолейкозом Р388, получавших крахмальный клейстер внутрижелудочно, медиана выживаемости мышей с опухолевым процессом составляла $7,4 \pm 0,5$ сут., что также соответствует литературным данным и может служить доказательством валидизации модели (рисунок 37).

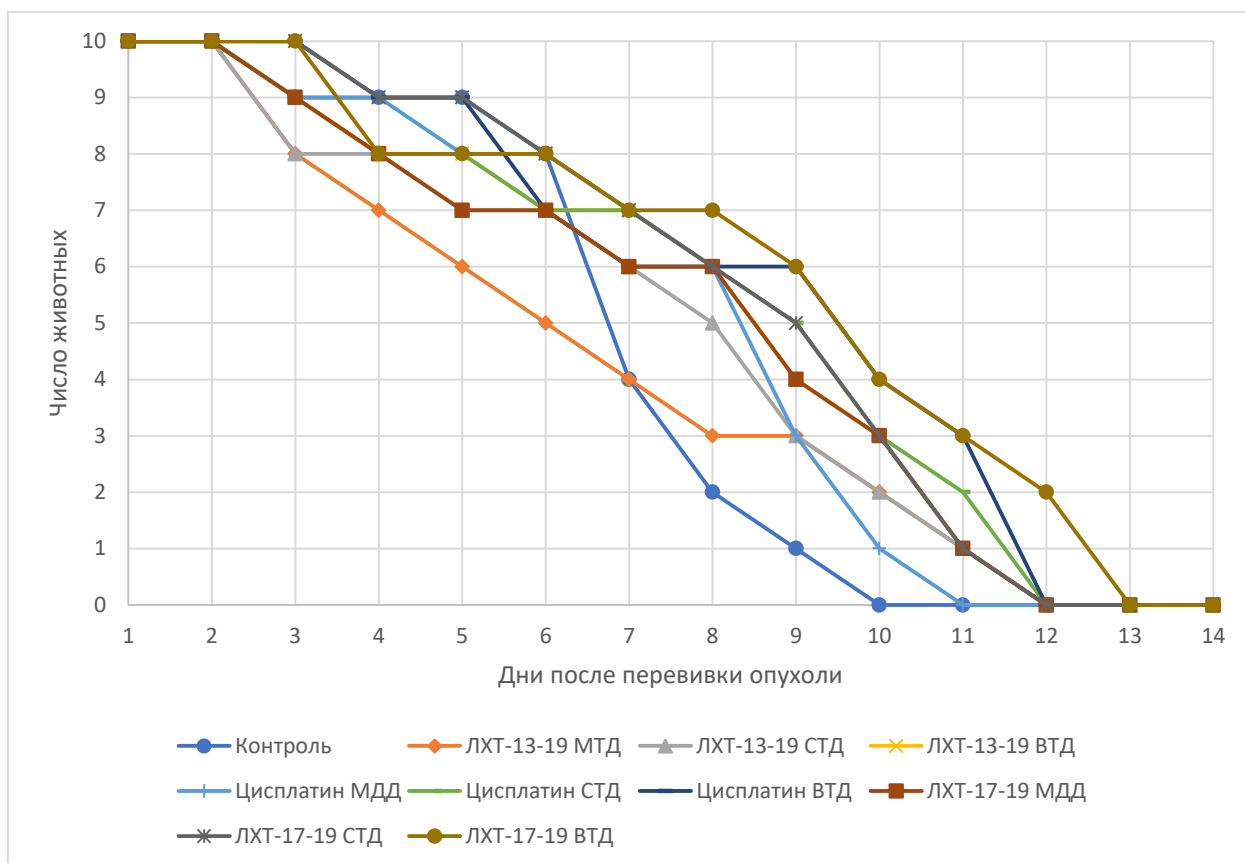


Рисунок 37 – Продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом Р388 мышей на фоне экспериментальной терапии некоторыми производными пиридинкарбоновых кислот (внутрижелудочное введение)

Внутрижелудочное введение соединения ЛХТ-13-19 в течение 5 сут в зависимости от вводимой дозы сопровождалось потерей темпов увеличения продолжительности жизни при сравнении с внутривенным путем введения: медиана выживаемости при введении вещества в дозе 1,9 мг/кг в сутки была равна $7,5 \pm 0,9$ сут, при введении 9,5 мг/кг в сутки – $8,1 \pm 1,1$ суток и при введении в суточной дозе 18,9 мг/кг – $9,4 \pm 0,8$ сут (см. таблица 7, рисунок 36).

Внутрижелудочное введение соединения ЛХТ-17-19 в течение 5 сут в зависимости от вводимой дозы также приводило к статистически значимому росту продолжительности жизни, однако меньшему, чем в группах животных, получавших соединение внутривенно: медиана выживаемости при введении вещества в дозе 1,8 мг/кг в сутки была равна $8,5 \pm 0,7$ сут, при введении 8,8 мг/кг в сутки – $9,3 \pm 0,9$ суток и при введении в суточной дозе 17,6 мг/кг – $10,2 \pm 0,8$ суток (см. таблица 7, рисунок 37).

При сравнении с референтным препаратом цисплатином при внутривенном пути введения полученные результаты были сопоставимы с данными о подавлении роста опухоли. При внутрижелудочном введении потеря клинического эффекта препарата сравнения была обусловлена низкой биодоступностью действующего вещества.

Подводя итог настоящему разделу исследования, необходимо подчеркнуть, что все исследуемые соединения – производные пиридинкарбоновых кислот по показателям токсичности при внутривенном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении относятся к умеренно или малотоксичным соединениям. 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 LD_{50} при данном пути введения. Оптимальными по сочетанию показателей LD_{50} при внутрижелудочном и внутривенном/внутрибрюшинном путях введения являются молекулы ЛХТ-17-19, ЛХТ-15-19 и ЛХТ-13-19.

Именно эти соединения были протестированы нами в рамках цитотоксического скрининга в культурах клеток рака толстого кишечника, инвазивного рака мочевого пузыря и эстроген - зависимой карциномы молочной железы. По результатам исследования были определены эффективные подавляющие концентрации соединений и на основе анализа их цитотоксического эффекта сделан вывод о том, что наиболее

перспективными для дальнейшего изучения как источник создания таргетного препарата для преодоления первичной или вторичной химиорезистентности при тройном негативном РМЖ являются молекулы ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19. В исследовании на мышах DBA₂ × C57Bl/6j с перевитым сингенным лимфолейкозом P388 наши предположения нашли научно - доказанное подтверждение.

ГЛАВА 6. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМЕНА И ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРАХ РЕЗИСТЕНТНОГО ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В предыдущих разделах нашего исследования мы установили ряд важных закономерностей, во многом определяющих формирование нечувствительности тройного негативного РМЖ к препаратам антрациклинового ряда, платины, представителям таксанов, а также таргетных препаратов – ингибиторов рецепторных протеинкиназ (EGFR).

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

Такой подход продиктован несколькими обстоятельствами: во-первых, строгим следованием современным принципам организации и проведения биомедицинских исследований по неклиническому (доклиническому) изучению лекарственных средств, а во-вторых, накопленными данными о биологических свойствах как опухолевых клеток тройной негативной неоплазии, так и ряда перспективных молекул – производных аминохромена, пиридина и пиридинкарбонновых кислот, полученных нами и в нашей лаборатории при выполнении настоящей работы и ранее кандидатами наук М. О. Дудиной, И. Р. Суловой, М. Ю. Кудрявцевым, доктором медицинских наук Е. А. Самышиной [273, 323].

Результатом настоящего этапа работы будет отбор наиболее перспективных молекул для проведения исследования его эффективности и механизма действия на ксенографтной модели тройного негативного рака молочной железы у гуманизированных мышей – иммунодефицитных носителей опухоли.

6.1 Пути преодоления первичного молекулярного эффлюкса в модельной системе тройного негативного рака молочной железы

В настоящем разделе нашей работы мы воспользовались тем же приемом, что и в главе 4, где для определения роли обратного транспорта молекул противоопухолевых препаратов – цисплатина, доксорубицина, паклитаксела и эрлотиниба – мы использовали две клеточные линии тройного негативного РМЖ человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (НТВ-26), АТСС, США), а другая не экспрессирует протеин обратного транспорта рака молочной железы BCRP (BT20, АТСС, США). Применение указанных культур позволяет оценить роль обратного транспорта как механизма первичной резистентности опухолевых клеток к новым противоопухолевым агентам, с которыми субстрат опухоли никогда не встречался.

В качестве объекта исследования изучены 3 соединения: первая молекула – производное 4Н-хромена – N-ацетиламиноэтаноат 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, который далее будет применяться в работе, – АХ-554), две другие – производные пиридинкарбоновых кислот – N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (соединение ЛХТ-13-19) и 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2Н)-он 2-гидроксисукцинат (соединение ЛХТ-17-19). Противоопухолевый потенциал соединения АХ-554 был детально изучен при моделировании немелкоклеточного рака легкого [273], тогда как

эффективные подавляющие концентрации соединений ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 были определены на предыдущем этапе настоящего исследования совместно с М. Ю. Кудрявцевым [323]. Опухолевые линии инкубировали в течение 24 часов в присутствии исследуемых веществ в следующих средних подавляющих концентрациях: для соединения ЛХТ-17-19 - $4,8 \times 10^{-5}$ М, для ЛХТ-13-19 – $8,4 \times 10^{-5}$ М, для АХ-554 - $2,3 \times 10^{-4}$ М.

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 CO_2 -инкубаторе в затемненных условиях в течение 24 часов. Оценку выживаемости клеток проводили с помощью колориметрического теста с трифенилтетразолия хлоридом (МТТ-тест).

На рисунках 38 - 40 показаны результаты исследований по инкубированию исследуемых соединений в культурах клеток тройного негативного рака молочной железы.

Как хорошо видно, инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей BCRP-протеин, отвечающий за эффлюкс молекул лекарственных соединений, в присутствии $2,3 \times 10^{-4}$ М соединения 4Н-аминохромена АХ-554 сопровождалась формированием значительного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 83% опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации фармацевтической субстанции соединения в культуре BCRP-позитивного РМЖ MDA-MB-231 также вызывала сопоставимое цитотоксическое действие (различия при межгрупповом сравнении недостоверны, $p = 0,8$). Это свидетельствует о том, что на представленной модели резистентного тройного негативного рака

молочной железы в отношении довольно крупной молекулы АХ-554 не происходит активации механизма обратного транспорта молекулы лекарственного вещества.

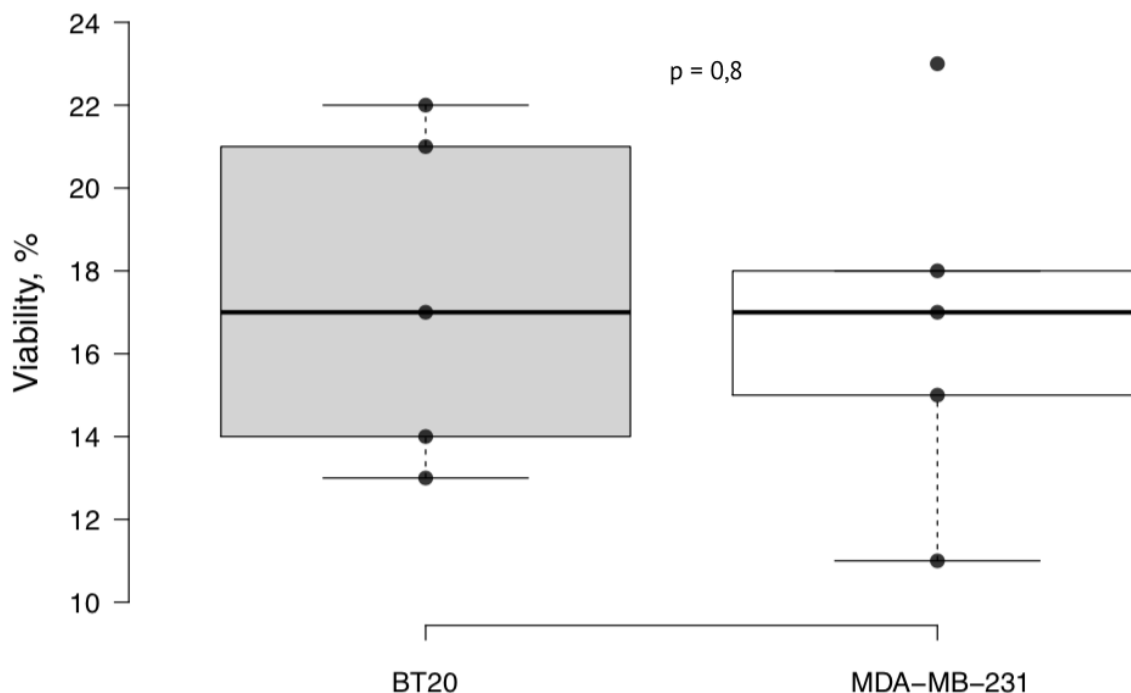


Рисунок 38 – Зависимость цитотоксического действия АХ-554 в концентрации $2,3 \times 10^{-4}$ М в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием критерия Манна - Уитни

Инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей BCRP-протеин, с $8,4 \times 10^{-5}$ М соединения ЛХТ-13-19 также сопровождалась формированием заметного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 77 % опухолевых клеток. Однако экспозиция той же концентрации действующего вещества исследуемого соединения в культуре BCRP-позитивного тройного негативного РМЖ MDA-MB-231 не вызвала цитотоксического действия (различия при межгрупповом сравнении достоверны при $p = 0,001$), следовательно, молекула N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид подвергается обратному переносу из

опухолевых клеток культуры тройного негативного РМЖ и не может рассматриваться в качестве альтернативы препаратам, к которым сформирована первичная или вторичная резистентность.

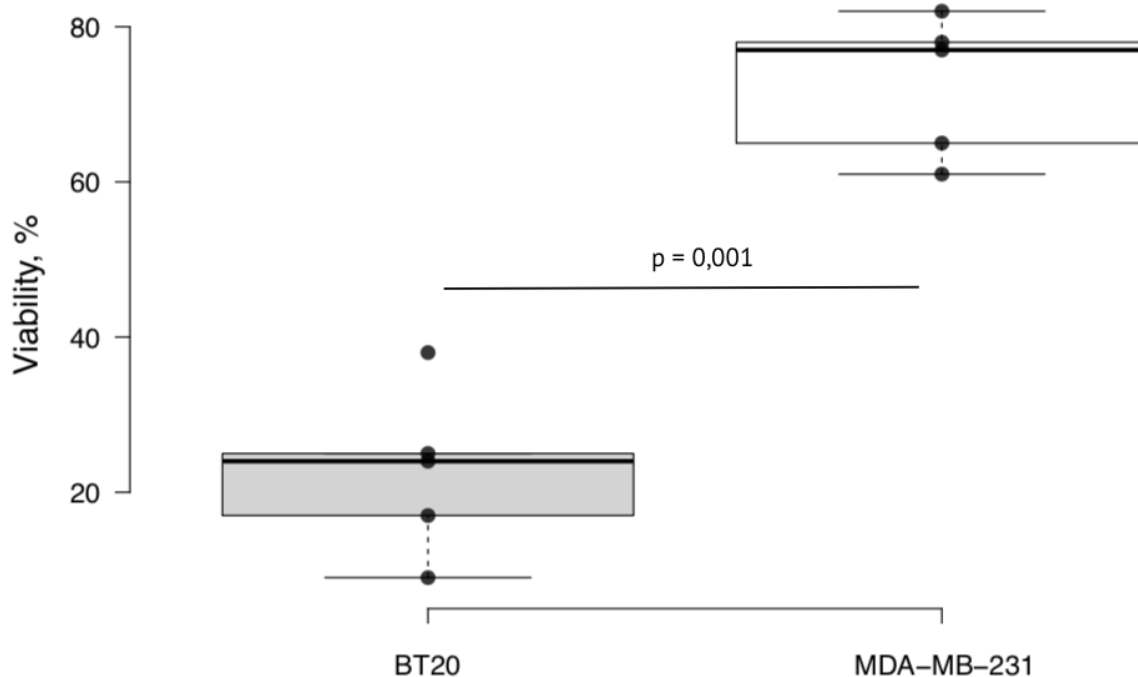


Рисунок 39 – Зависимость цитотоксического действия соединения ЛХТ-13-19 в концентрации $8,4 \times 10^{-5}$ М в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием критерия Манна - Уитни

На фоне инкубации клеточных культур исследуемых типов РМЖ с соединением ЛХТ-17-19 в концентрации $4,8 \times 10^{-5}$ М в течение 24 часов нами были получены следующие результаты (рисунок 40).

В частности, инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей VSCR-протеин, сопровождалась формированием значительного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 86,5 % опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации фармацевтической субстанции соединения в культуре VSCR-позитивного РМЖ MDA-MB-231 также вызывала формирование сопоставимого

цитотоксического действия (различия при межгрупповом сравнении недостоверны, $p = 0,06$). Это свидетельствует о том, что на представленной модели резистентного трижды негативного рака молочной железы в отношении 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1 (2H)-он 2-гидроксисукцината не происходит активации механизма обратного транспорта молекулы лекарственного вещества.

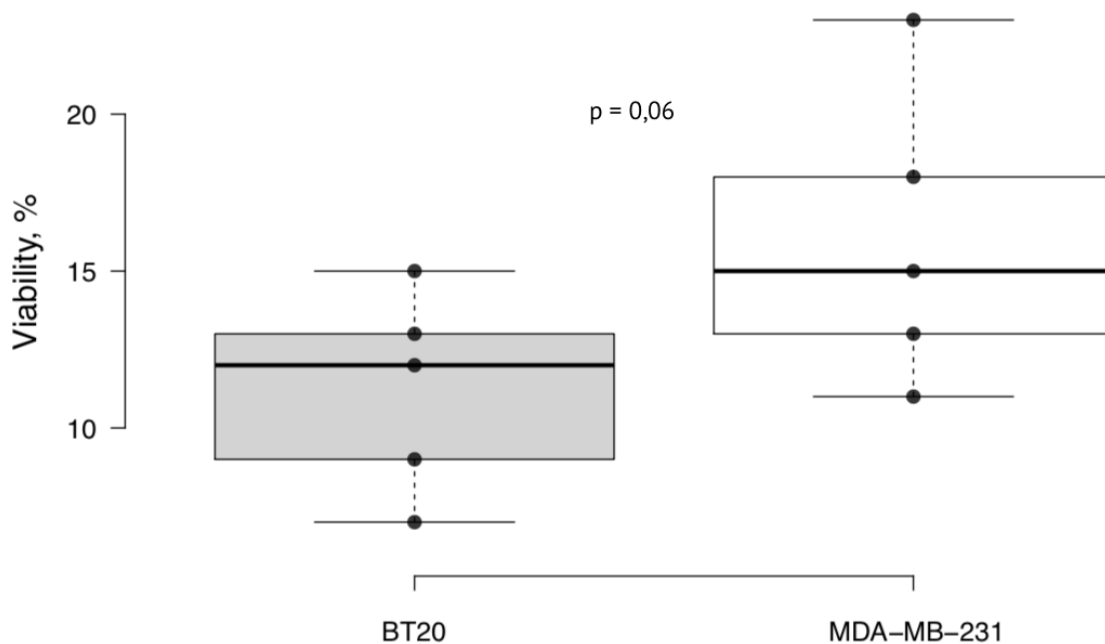


Рисунок 40 – Зависимость цитотоксического действия соединения ЛХТ-17-19 в концентрации $4,8 \times 10^{-5}$ М в линейных координатах при культивировании культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; о оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием критерия Манна - Уитни

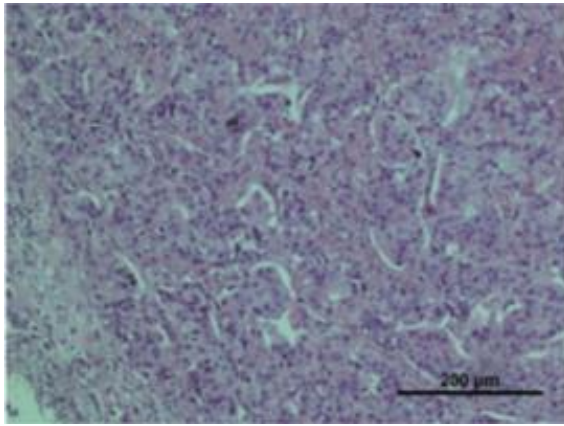
При анализе полученных результатов можно сделать вывод о том, что сила цитотоксического действия исследуемых веществ на молекулярно подобных культурах тройного негативного РМЖ человека, имеющих различия, обусловленные экспрессией BCRP-протеина, способствующего обратному транспорту молекул из опухолевой 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 ее отсутствие к соединениям ЛХТ-17-19 и АХ-554, обусловленное обратным ВСРР-опосредованным транспортом молекул активного вещества.

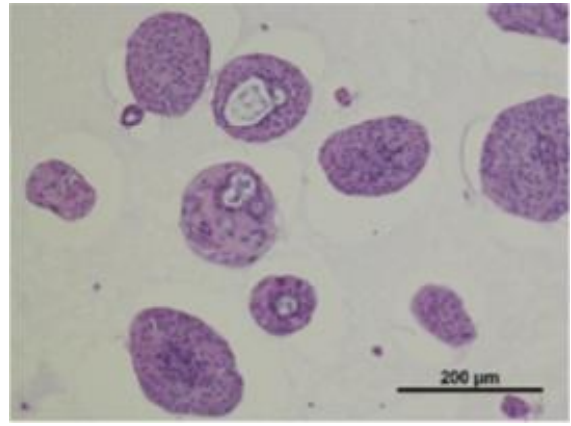
6.2 Изучение роли обратного транспорта АХ-554 и ЛХТ-17-19 в формировании вторичной резистентности на инновационной органоидной модели тройного негативного рака молочной железы

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 механизма формирования резистентности использовали трехмерную высокотехнологичную инновационную органоидную модель тройного 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. Также выбор метода был обусловлен тем, что ранее в нашей лаборатории была разработана аналитическая методика определения действующего вещества АХ-554 и ЛХТ-17-19 в плазме крови. Рисунок 41 демонстрирует морфологическую и иммунофенотипическую характеристику исходного опухолевого материала и полученных на его основе трехмерных органоидных конструкторов.

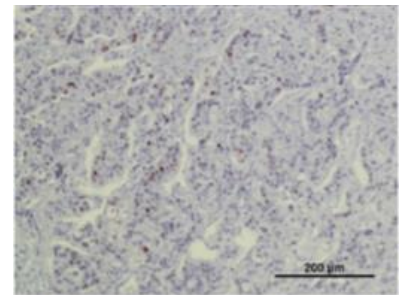
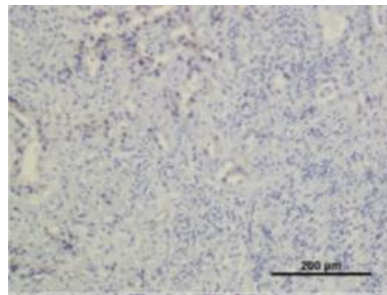
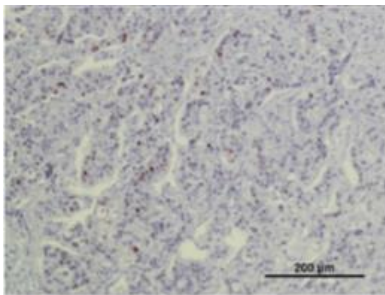


Субстрат опухоли

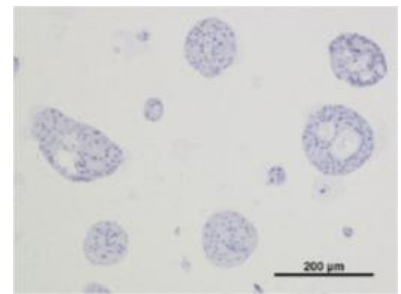
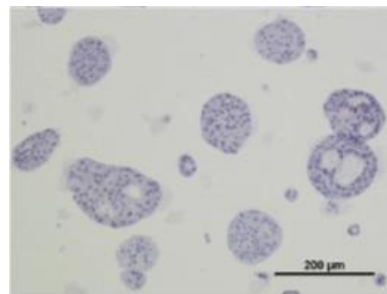
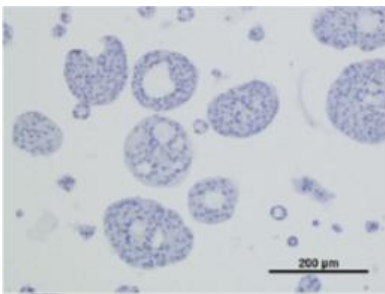


Органоидная культура

А. Гематоксилин и эозин, ув. 200



Субстрат опухоли



Органоидная культура

Б. Иммунофенотип, ув. 200

Рисунок 41 – Гистологическая и иммунофенотипическая характеристика трехмерных органоидных конструкций тройного негативного рака молочной железы и исходной опухоли: А – гематоксилином и эозин; Б – иммунофенотипирование с анти-эстрогеновыми, анти прогестероновыми антителами и анти-HER2, ув. 200

Как видно на рисунке, трехмерная культура представлена только опухолевыми клетками и не содержит клеточных элементов микроокружения.

Иммунофенотипически клетки не экспрессируют эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, проявляют HER2-негативизм, следовательно, культура представлена клетками тройного негативного РМЖ.

Схема постановки нашего эксперимента может быть представлена следующим образом: получение культур органоидов, резистентных к АХ-554 и ЛХТ-17-19, проводилось в три приема, разделенных двумя фазами восстановления. Каждый этап длился 6 дней, замена среды производилась каждые 3 дня. Концентрация действующих веществ была подобрана экспериментально, так, чтобы было можно достичь сублетальных значений.

Для сравнения обратного выведения АХ-554 и ЛХТ-17-19 были проанализированы образцы культуральной среды первичных и резистентных органоидов после инкубации с соединением в течение 24 часов, их трехкратной отмывки фосфатным буфером и последующего инкубирования в среде без соединения в течение 6 часов.

Определение содержания действующих веществ субстанций АХ-554 и ЛХТ-17-19 в культуральной среде проводили с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

На рисунке 42 представлены результаты измерения концентрации АХ-554 и ЛХТ-17-19 в среде культивирования после каждого этапа генерации резистентных органоидов (после трехкратной отмывки). Как хорошо видно на рисунке после первого раунда культивирования трехкратная отмывка выживших клеток органоидных конструкторов и последующая культивация культур в среде, не содержащей действующих веществ, не приводила к детекции в среде культивирования определяемых концентраций изучаемых веществ АХ-554 и ЛХТ-17-19.

После второго раунда, нам удалось обнаружить в среде культивирования $0,1 \times 10^{-6}$ М соединения ЛХТ-17-19 и $0,4 \times 10^{-6}$ М соединения

АХ-554, что говорит об активации механизма обратного транспорта молекул клетками опухоли.

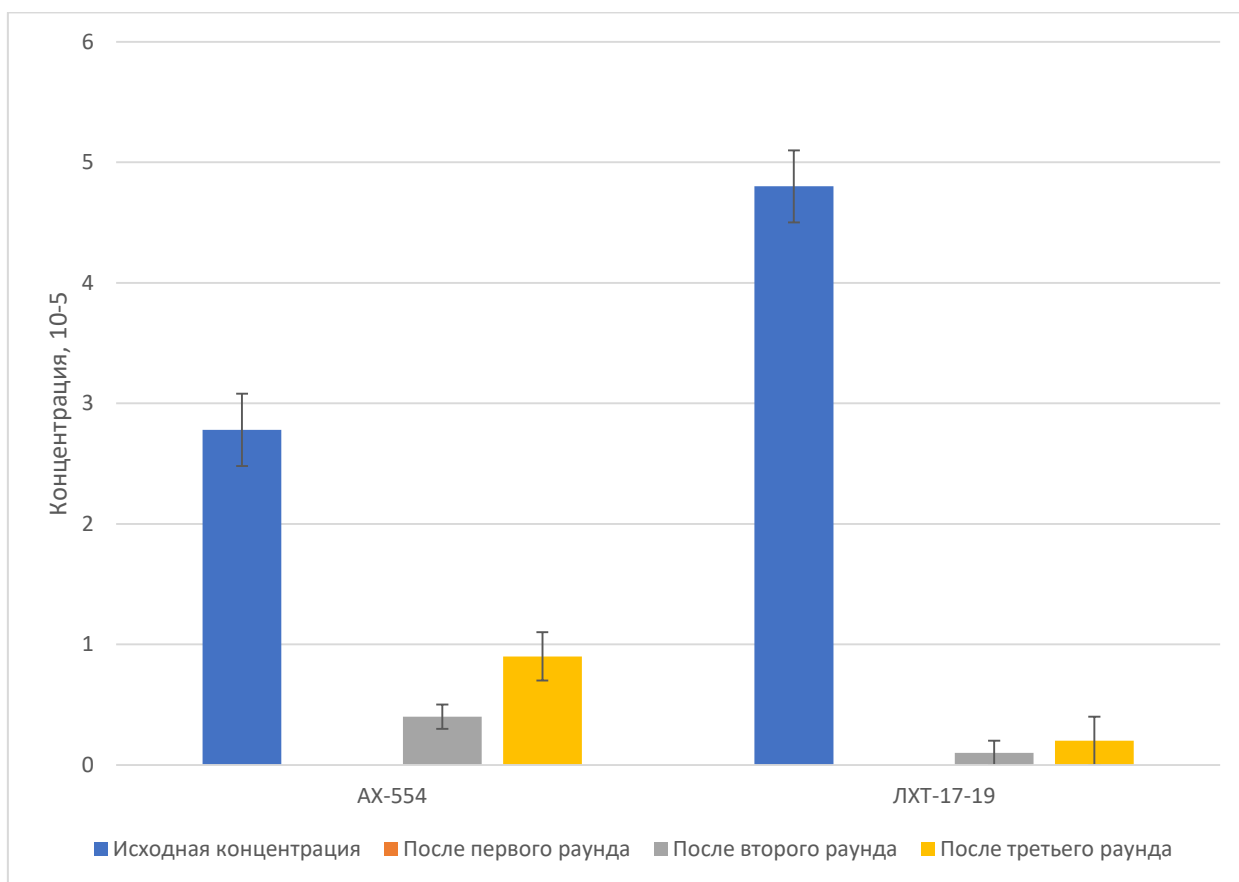


Рисунок 42 – Сравнительные значения концентраций АХ-554 и ЛХТ-17-19 в среде культивирования на различных этапах формирования резистентности органоидной культуры тройного негативного рака молочной железы. Для первого – третьего раундов концентрации соединений указаны в 10^{-6} М. Каждый эксперимент поставлен на 4 культурах (пояснение в тексте)

После третьего раунда в среде культивирования определялось соединение АХ-554 в концентрации $0,9 \times 10^{-6}$ М, тогда как соединение ЛХТ-17-19 присутствовало в следовых значениях.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в процессе формирования вторичной резистентности клеток тройного негативного РМЖ к АХ-554 происходит активация обратного транспорта молекул соединения, о чем свидетельствует рост концентрации вещества в

среде культивирования после отмывки трехмерной культуры. В тех же экспериментальных условиях вторичная резистентность к ЛХТ-17-19 хотя и формируется, но при этом не наблюдается эффлюкс молекул в среду. Это говорит о том, что в данном случае могут быть задействованы иные механизмы, не связанные с обратным транспортом.

6.3 Мутации гена *BRCA1* клеток тройного негативного рака молочной железы на фоне инкубации с производным пиридинкарбоновой кислоты ЛХТ-17-19 как возможный механизм формирования вторичной фармакорезистентности

Мы уже упоминали выше, что белок *BRCA1* взаимодействует как с активаторами, так и с 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 его запуску даже на фоне имеющегося повреждения клеточной ДНК. Подобные особенности регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках могут быть источником их первичной и вторичной резистентности к химио- и таргетным препаратам, вызывающим либо повреждение ДНК, либо изменения регуляции клеточного цикла. Поскольку соединение ЛХТ-17-19 по своей структуре является производным пиридинкарбоновой кислоты и у вещества внеэкспериментально спрогнозирована антикиназная таргетная активность, можно предположить, что в основе формирования вторичной резистентности опухоли лежит мутегенез в гене *BRCA1*.

Для проверки этой гипотезы в отношении соединения ЛХТ-17-19 провели серию исследований на двух специально созданных культурах клеток тройного негативного рака молочной железы, воспроизводящих мутации в гене *BRCA1*, и РМЖ с интактным геном *BRCA1*: НСС1937 (АТСС, США) и с мутантным геном соответственно НСС1937/^{WT}*BRCA1* (АТСС, США). Культуры инкубировали с соединением ЛХТ-17-19 в концентрации

$4,8 \times 10^{-5}$ М как описано в главе 2 и выше. 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. Применение мутантной культуры позволяет не формировать резистентность культуры в силу того, что типичные для фармакорезистентности мутации уже воспроизведены в клетках опухоли штамма НСС1937.

Вещество в каждой изученной концентрации вносили в 5 лунок. Культуры инкубировали в CO_2 -инкубаторе в затемненных условиях в течение 24 часов. Оценку выживаемости клеток осуществляли с помощью колориметрического теста с трифенилтетразолия хлоридом (МТТ-тест) (рисунок 43).

Мы установили, что подавление роста опухолевых клеток в указанных культурах статистически значимо не различалось: и в культуре мутантной опухоли по гену *BRCA1* наблюдали практически полное ингибирование роста, и в реконститутивном штамме культуры РМЖ НСС1937/^{WT}*BRCA1* было отмечено интенсивное подавление роста опухолевых клеток тройного негативного РМЖ под действием ЛХТ-17-19. Следовательно, феноменологически вторичная резистентность опухолевых клеток к соединению пиридинкарбоновой кислоты не может быть обусловлена мутациями в гене *BRCA1*.

Для получения молекулярных доказательств незначительной роли мутаций гена *BRCA1* в формировании резистентности РМЖ к ЛХТ-17-19 провели полногеномное секвенирование ДНК клеток культур, подвергшихся терапевтическому воздействию данным соединением. Мы установили, что между исследуемыми образцами существуют различия в экспрессии 54 генов.

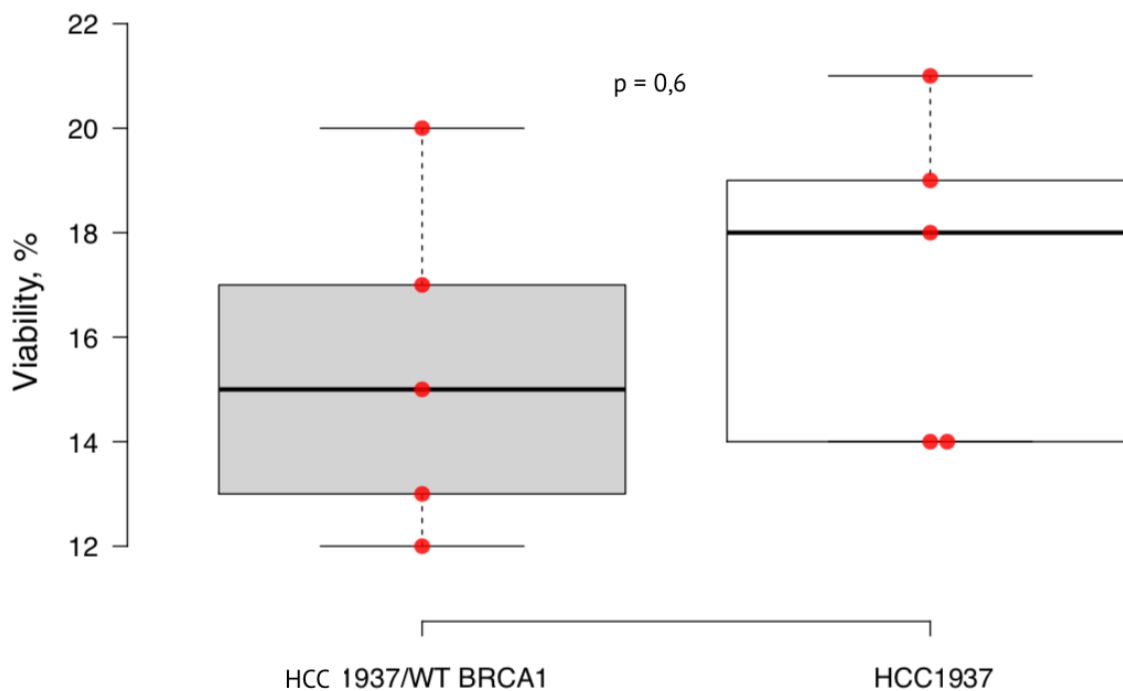


Рисунок 43 – Зависимость цитотоксического действия соединения ЛХТ-17-19 в концентрации $4,8 \times 10^{-5}$ М в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека HCC1937/^{WT}*BRCA1* и HCC1937; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием одномерного дисперсионного анализа и критерия Манн - Уитни

На основе проведенного анализа экспрессии генов мутантной линии, описанного в главе 4 настоящего исследования, можно также сделать заключение о том, что те гены, которые, по литературным и нашим собственным данным, участвуют в формировании химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы к препаратам платины и модулируются геном *BRCA1*, в частности гиперэкспрессированные гены *RAD52* и *XRCC4*, и гены с подавленной экспрессией *ERCC1* и *RRM1* при сравнении с линией HCC1937/^{WT}*BRCA1*, не могут быть задействованы в формировании резистентности к ЛХТ-17-19.

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.

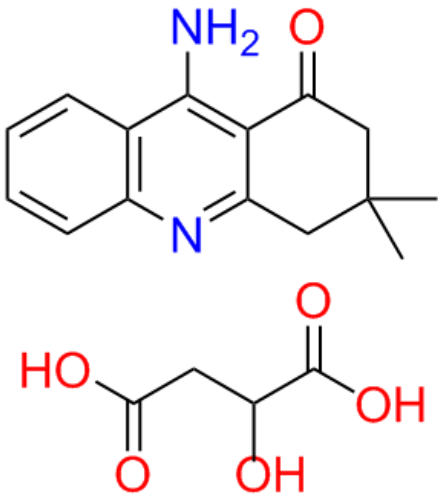
Формирование вторичной резистентности органоидных культур к производному АХ-554 также связано с активацией обратного транспорта молекулы вещества. Данные были получены на основе определения действующего вещества в среде культивирования опухоли после ее трехкратной отмывки. При этом инкубация органоидной 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 тройного 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.

ГЛАВА 7. ДОКИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИШЕНЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

7.1 Краткая характеристика объекта докинговых исследований

В качестве объекта докинговых исследований была выбрана молекула 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-он (ЛХТ-17-19) (таблица 8).

Таблица 8 - Характеристика молекулы – объекта докинговых исследований

Шифр	Химическое название	Структурная формула
ЛХТ 17-19*	9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-он 2-гидроксисукцинат CAS RN 130186-64-0	 <p style="text-align: center;">9-amino-3,3-dimethyl-3,4-dihydroacridin-1(2H)-one 2-hydroxysuccinate</p>

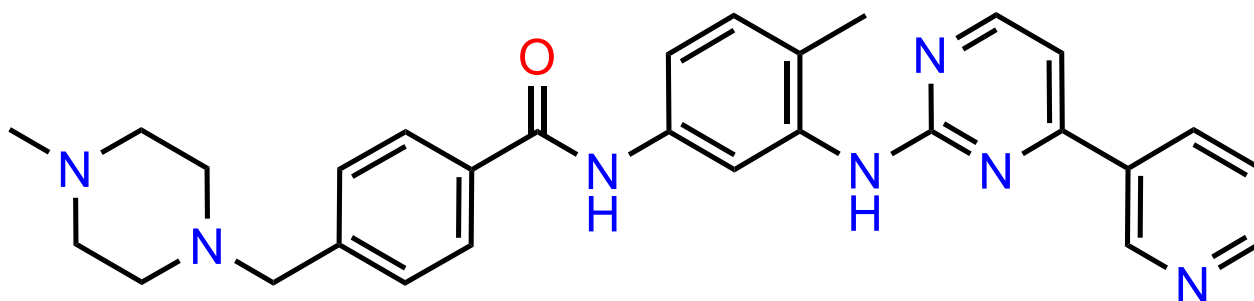
Примечание: * Для докинга использовалось основание молекулы ЛХТ 17-19 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-он (CAS RN 130186-64-0)

7.2 Органайзер кристаллографических моделей сокристаллизованных с препаратами сравнения

Для проведения докинговых исследований новых молекул направленного действия целесообразно сделать выборку биомишеней, опираясь на уже известные механизмы образования опухолевых клеток,

несмотря на многоэтапность этого процесса. В настоящее время существует множество лекарственных молекул, которые обладают мощным противоопухолевым действием. В качестве таких средств (препаратов сравнения) нами были выбраны цитостатики, влияющие на различные звенья онкогенеза, и проанализированы мишени, с которыми они связываются.

Иматиниб – производное 2-фениламинопиримидина, N-(4-метил-3-((4-пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)фенил)-4-((4метипиперазин-1-ил)метил) бензамид, противоопухолевое средство, используемое для лечения хронического миелолейкоза (рисунок 44).



N-(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)benzamide

Рисунок 44 – Структурная формула иматиниба

Иматиниб функционирует как специфический эффективный ингибитор ряда ферментов тирозинкиназы. При взаимодействии молекулы иматиниба с белком тирозинкиназы Абельсона Abl происходит взаимодействие его с Vcr (область кластерной точки). Блокируется Vcr-Abl – активная гибридная тирозинкиназа, ответственная за онкогенную трансформацию клеток, ген которой находится на «филадельфийской хромосоме» (Ph), образующейся вследствие реципрокной транслокации между 9-й и 22-й хромосомами, подавляется пролиферация, и индуцируется апоптоз в положительных клеточных линиях Vcr-Abl, а также в лейкозных клетках. Киназа Абельсона (с-Abl) – это нерцепторная тирозинкиназа (трансфераза), которая играет ключевую роль в дифференциации и выживании клеток. Существует

гипотеза, что переходная активация c-Abl-киназы за счет смещения N-концевого аутоингибитора может привести к усилению дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток. Этот процесс может увеличить количество циркулирующих нейтрофилов и таким образом стать эффективным методом лечения нейтропении, вызванной химиотерапией. На рисунках 45 и 46 приведены суперпозиция иматиниба и диаграмма межмолекулярных взаимодействий с киназой C-abl. Кристаллографическая 3D модель - структуры белка киназы C-abl получена рентгеноструктурным анализом с разрешением 2,15 Å и взята из Protein Data Bank (код мишени в базе – PDB ID: 6NPE).

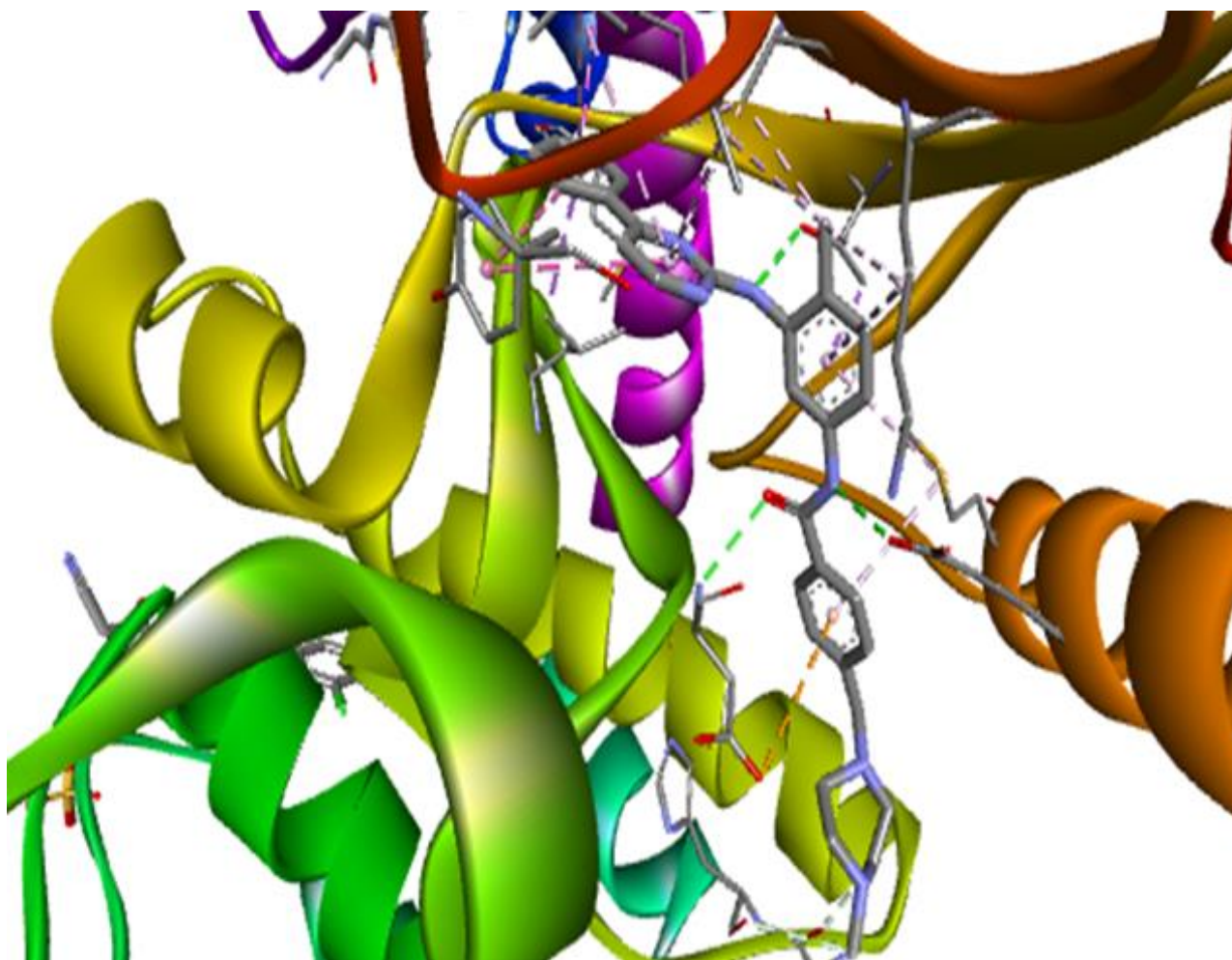


Рисунок 45 – Суперпозиция молекулы иматиниба в комплексе с киназой C-abl (PDB ID: 6NPE). Красный и светло-голубой цвета – атомы кислорода и азота соответственно; пепельно-серый – углеродная цепь

Иматиниб также может сенсibilизировать лимфоциты, опухолевые клетки при использовании его в комбинации с гемцитабином. В основе данной сенсibilизации лежит дезоксицитидинкиназа (dCK). Иматиниб взаимодействует с dCK и провоцирует активацию этой нуклеозидкиназы (зависимую от конформации), которая модулирует фосфорилирование нуклеозидных аналогов.

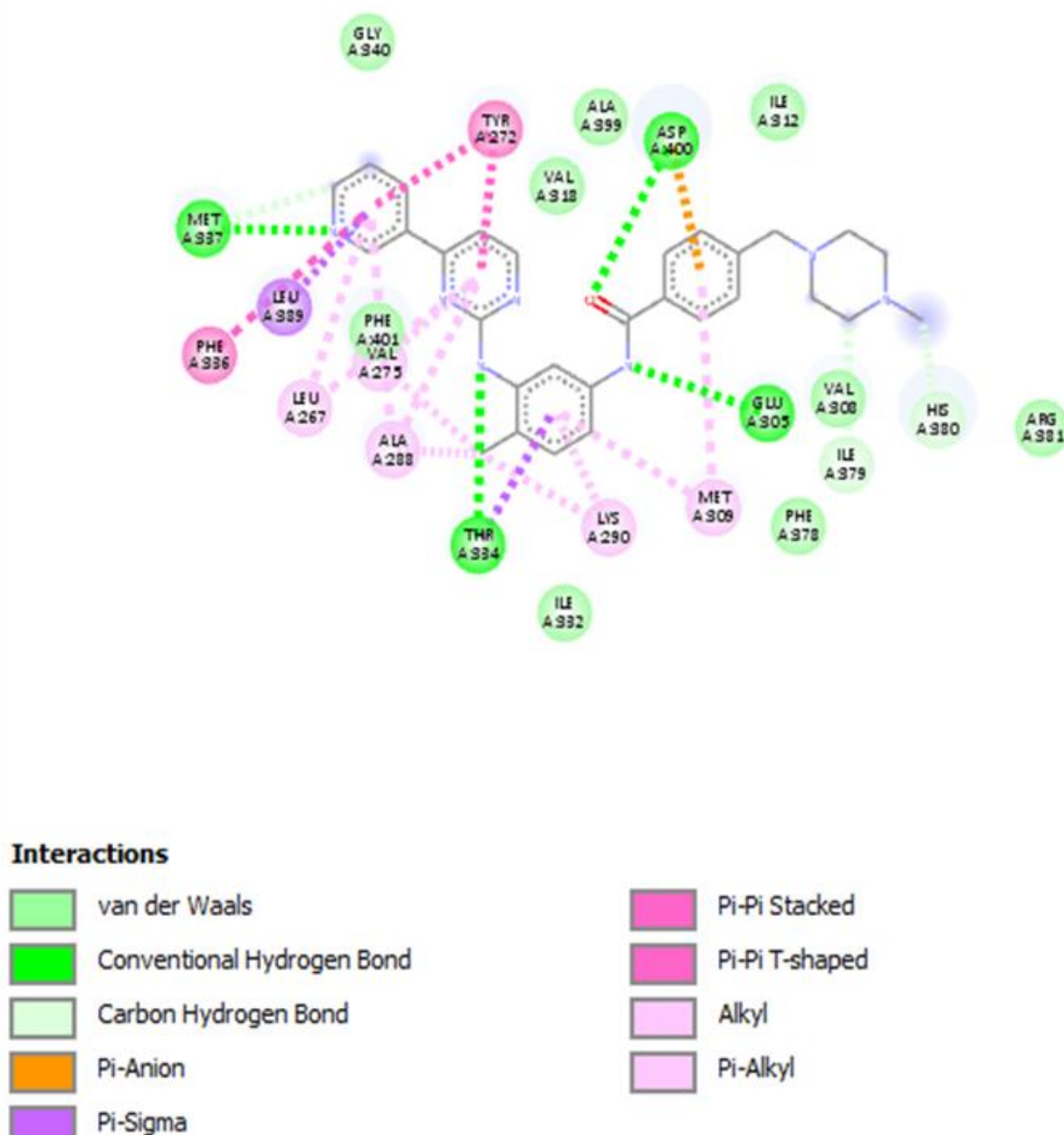


Рисунок 46 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы иматиниба в комплексе с киназой C-abl (Код мишени в PDB ID: 6NPE)

Это явление приводит к увеличению фосфорилирования «пролекарств» большинства химиотерапевтических препаратов. Двойная активность ингибирования протеинкиназы / активации нуклеозидкиназы может иметь большую терапевтическую пользу для уменьшения токсичности терапевтических агентов и как следствие - для поддержания эффективности в меньших дозах или противодействия резистентности к лекарственным средствам с помощью модуляции dCK-мишени.

На рисунке 47 приведена суперпозиция молекулы иматиниба в активном центре дезоксицитидинкиназы (dCK). Кристаллографическая 3D модель структуры белка dCK получена рентгеноструктурным анализом с разрешением 3,20 Å взята из Protein Data Bank, код мишени в базе – PDB ID: 5MQT.

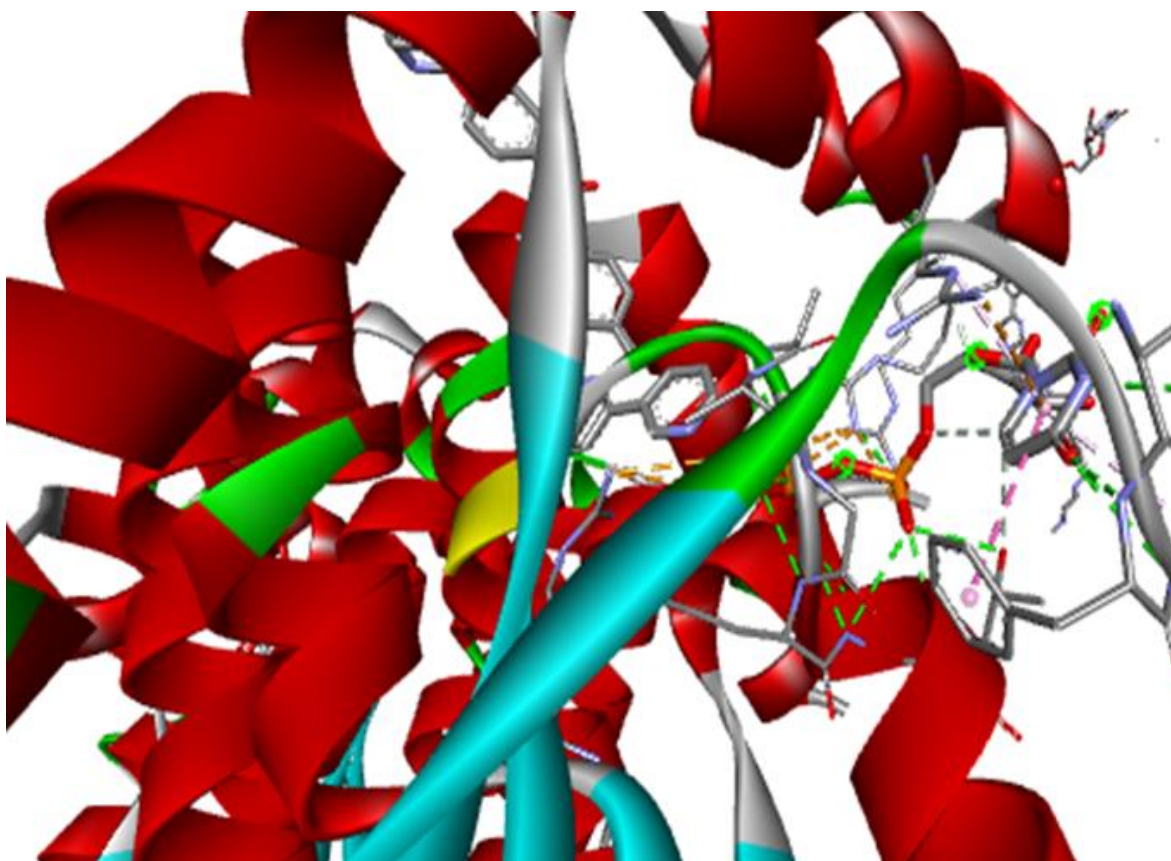


Рисунок 47 – Суперпозиция молекулы иматиниба в комплексе с дезоксицитидинкиназой (dCK) (PDB ID: 5MQT)

На рисунке 48 приведена диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы иматиниба с дезоксицитидинкиназой.

FMS – мембранный белок, представляющий собой тирозинкиназу рецептора типа III, которая связывается с макрофагами или моноцит-стимулирующим фактором (M-CSF или CSF 1). Трансдукция сигнала через это связывание приводит к выживанию, пролиферации и дифференциации моноцитарных / макрофаговых линий. Экспрессия гена, которая стимулирует колонию фактора 1 (CSF1), повышена в большинстве теносиновиальных гигантоклеточных опухолей. Это наблюдение привело к открытию и клиническому развитию терапии, ориентированной на рецептор CSF1 (CSF1R).

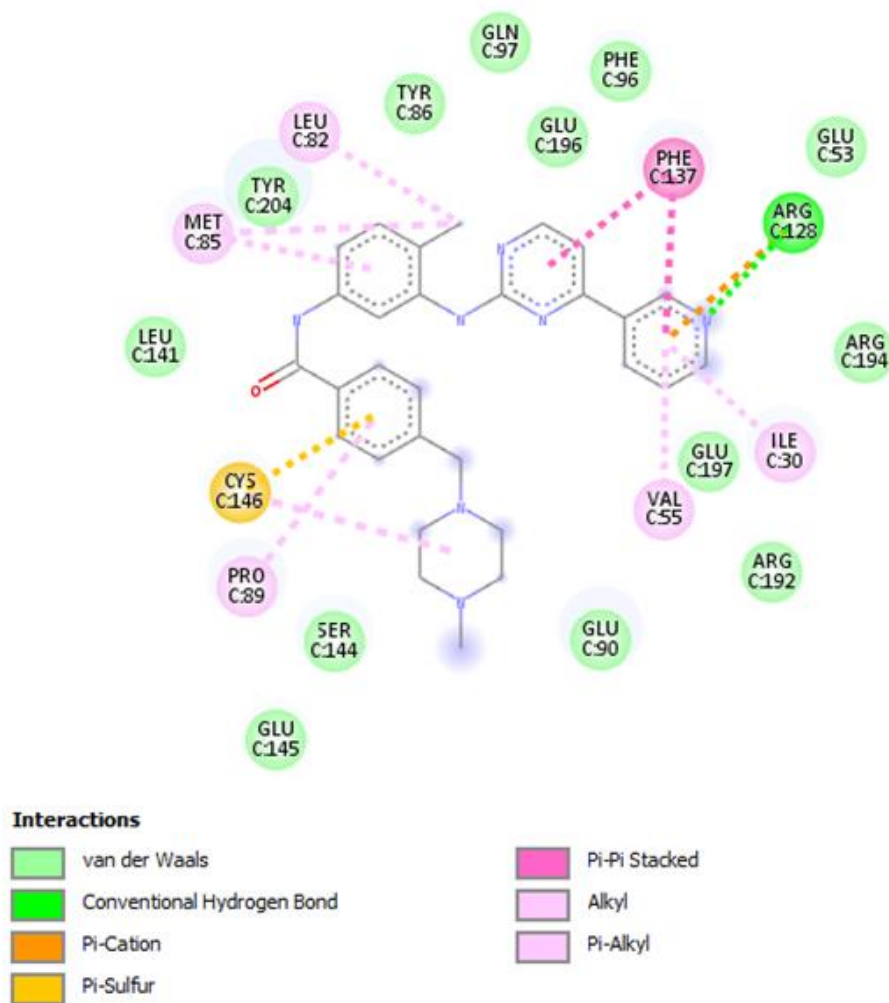


Рисунок 48 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий иматиниба в комплексе с дезоксицитидинкиназой (dCK) (PDB ID: 5MQT)

Впервые FMS был обнаружен как онкоген, вызывающий саркому. На рисунках 49 и 50 приведены суперпозиция молекулы иматиниба и диаграмма межмолекулярных взаимодействий с рецептором CSF1.

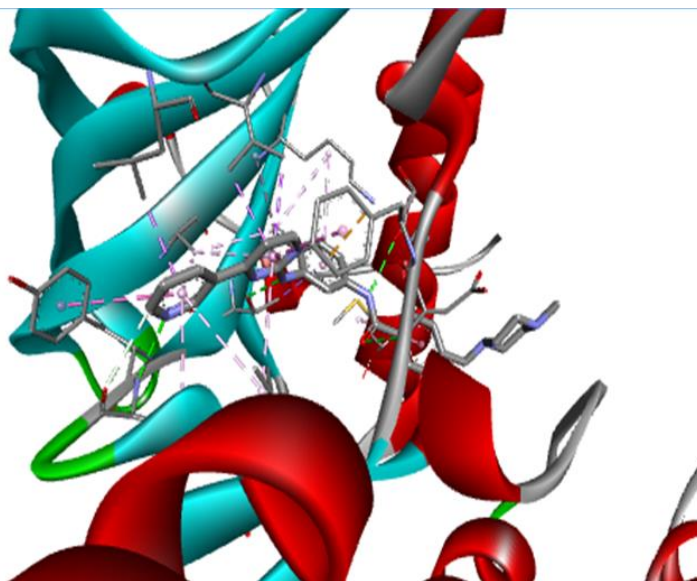


Рисунок 49 – Суперпозиция молекулы иматиниба в комплексе с рецептором CSF1 (PDB ID: 4R7I)

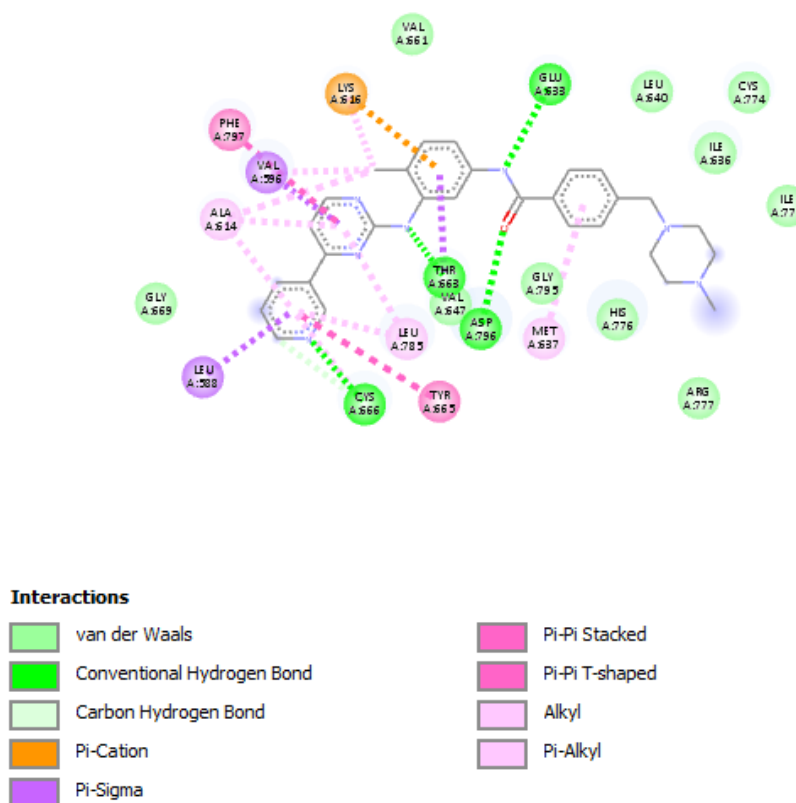


Рисунок 50 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий иматиниба в комплексе с рецептором CSF1 (PDB ID: 4R7I)

Эрлотиниб - N-(3-этинилфенил)-6,7-бис(2-метоксиэтокси)хиназолин-4-амин - является ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (ингибитор EGFR) (рисунок 51).

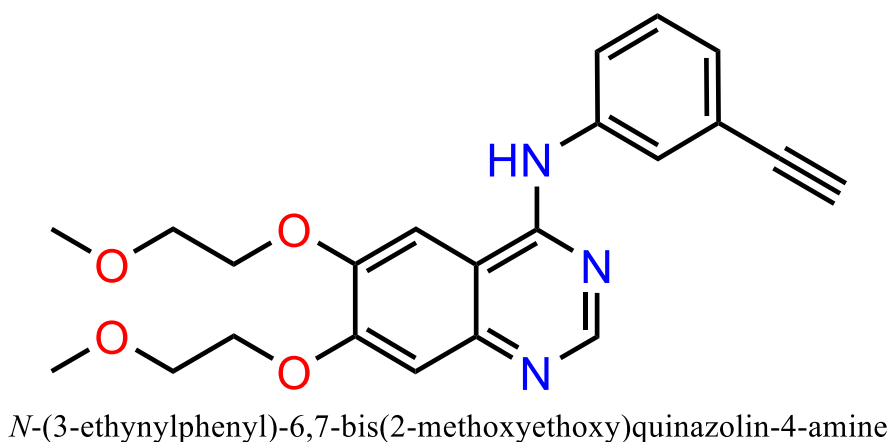


Рисунок 51 – Структурная формула эрлотиниба

Эрлотиниб специфически нацелен на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) тирозинкиназу (трансферазу), который высоко экспрессируется и иногда мутирует при различных формах рака. Он обратимо связывается с сайтом связывания аденозинтрифосфата (АТФ) рецептора. Для передачи сигнала две молекулы EGFR должны собраться вместе, чтобы сформировать гомодимер. Затем они используют молекулу АТФ для трансфосфорилирования друг друга по остаткам тирозина, что генерирует остатки фосфотирозина, привлекая фосфотирозин-связывающие белки к EGFR для сборки белковых комплексов, которые активируют клеточные биохимические процессы. В момент, когда молекула эрлотиниба связывается с EGFR, образование остатков фосфотирозина в EGFR невозможно и сигнальные каскады не иницируются. Кристаллическая структура киназного домена рецептора эпидермального фактора роста (EGFRK) с EGFRK-специфическим ингибитором эрлотинибом была определена рентгеноструктурным анализом с разрешением 2,6 Å. Все рецепторы эпидермального фактора роста EGFR отличаются от всех других

известных рецепторных тирозинкиназ тем, что обладают конститутивной киназной активностью без процесса фосфорилирования в их киназных доменах. На рисунках 52 и 53 приведены суперпозиция молекулы эрлотиниба и диаграмма межмолекулярных взаимодействий с рецептором EGFRK.

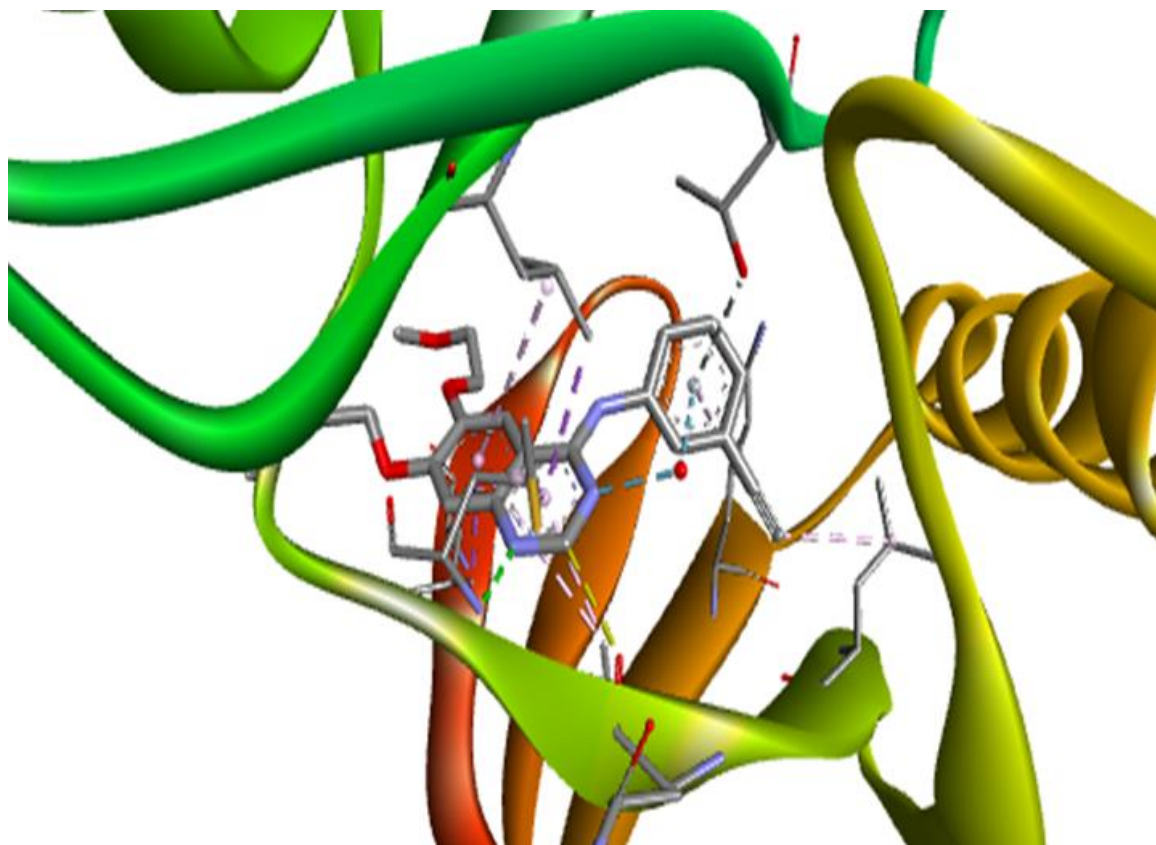


Рисунок 52 – Суперпозиция молекулы эрлотиниба в комплексе с рецептором EGFRK (PDB ID: 1M17)

Несмотря на отсутствие процесса фосфорилирования, было обнаружено, что петля активации EGFRK принимает конформацию, аналогичную конформации фосфорилированной активной формы киназного домена. Было обнаружено, что ключевые остатки предполагаемого мотива димеризации, лежащие между доменом EGFRK и сайтами стыковки карбоксильных концов субстрата, находятся в тесном контакте с доменом киназы. Существенные межмолекулярные контакты с участием карбоксильного концевых хвостов возникают в связи с олигомеризацией рецептора.

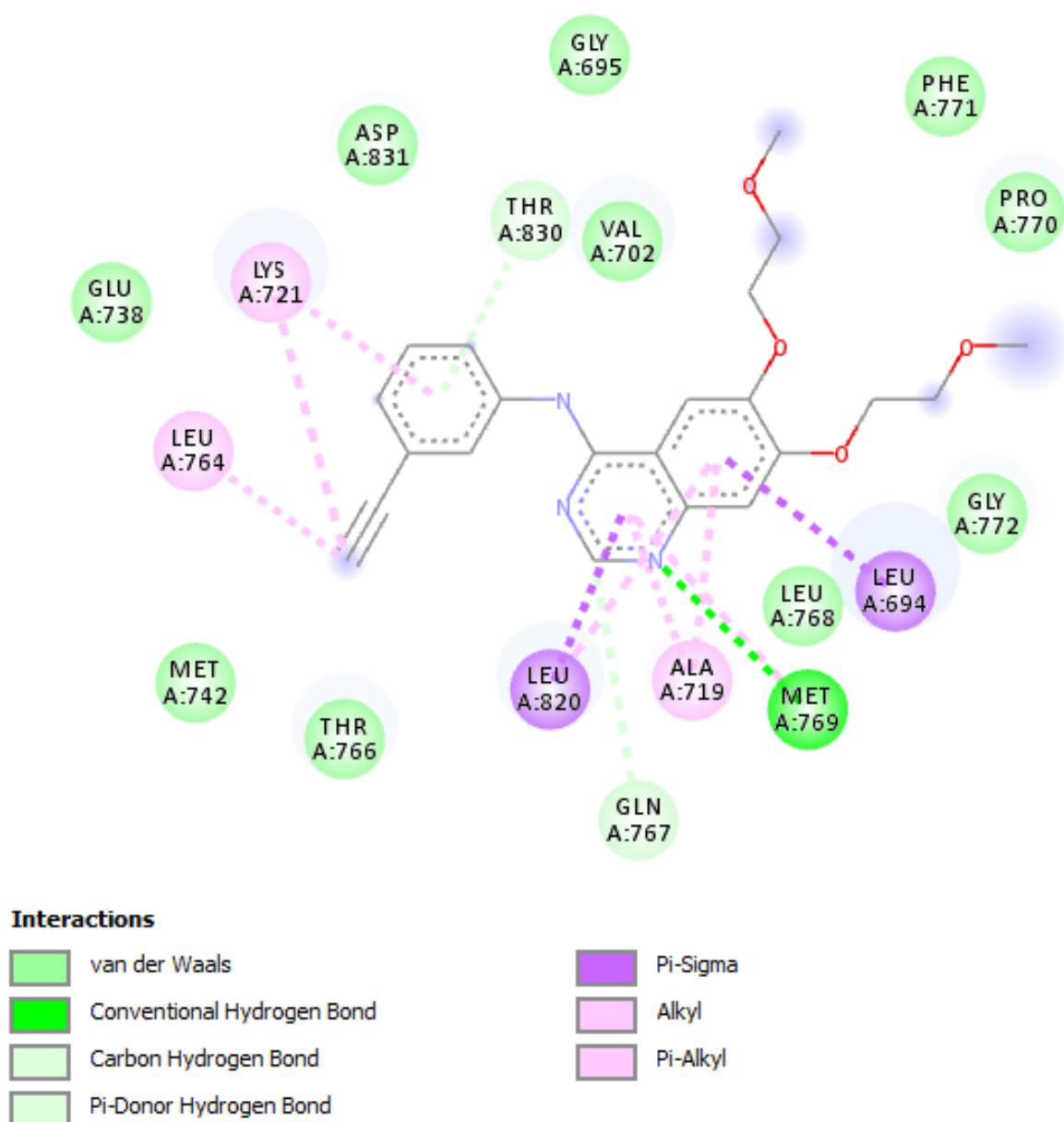
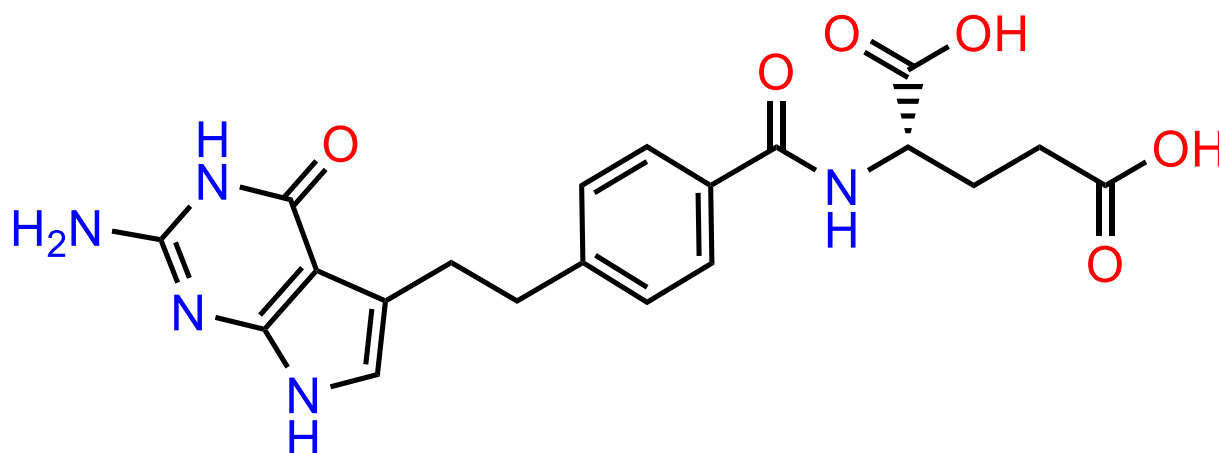


Рисунок 53 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы эрлотиниба в комплексе с рецептором EGFRK (PDB ID: 1M17)

Пеметрексед – (4-(2-(2-амино-4-оксо-4,7-дигидро-3H-пирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)бензоил)-L-глутамат – это антифолат, проявляющий антинеопластическую активность, в основе структуры которого лежит пирролопиримидин (рисунок 54).



(4-(2-(2-amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)ethyl)benzoyl)-L-glutamic acid

Рисунок 54 – Структурная формула пеметрекседа

Пеметрексед по химической структуре подобен фолиевой кислоте и относится к классу химиотерапевтических препаратов, называемых антиметаболитами фолиевой кислоты. Исследования *in vitro* показали, что он работает путем ингибирования трех ферментов, используемых в синтезе пурина и пиримидина, – тимидилатсинтазы (TS), дигидрофолатредуктазы (DHFR) и глицинамид рибонуклеотид формилтрансферазы (GARFT). Ингибируя образование предшественников пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, Пеметрексед предотвращает образование ДНК и РНК, которые необходимы для роста и выживания как нормальных клеток так, и раковых. Он нарушает метаболические процессы, которые зависят от наличия фолатов и необходимы для репликации клеток. Клеточное поглощение антифолатов в клиническом применении происходит прежде всего через мембранные транспортеры. Рецепторы фолатов человека (FR), в частности, мембранный протеин Human folate receptor beta (FOLR2), – рецепторы высокой аффинности, которые транспортируют фолат через эндоцитоз, были предложены учеными в качестве мишеней для специфической доставки новых классов антифолатов или конъюгированных фолатов к опухолевым клеткам. Существуют различные кристаллографические модели,

обеспечивающие понимание биологической роли фолатных рецепторов и четких сайтов связывания фолатов и антифолатов с этими рецепторами. Также выделены дискретные структурные конформации, которые являются репрезентативными на ключевых стадиях эндоцитарного обращения FR. Кроме того, уже описаны структуры комплексов FR человека в комплексах с пеметрекседом, аминоптерином и метотрексатом (определены рентгеноструктурным анализом с разрешением 2,6 Å). В целом полученные данные составляют основу для разработки и внедрения уникальных, нацеленных на FR препаратов для лечения раковых и воспалительных заболеваний.

На рисунках 55 и 56 приведены суперпозиция молекулы соединения пеметрекседа и диаграмма межмолекулярных взаимодействий с рецептором FOLR2.

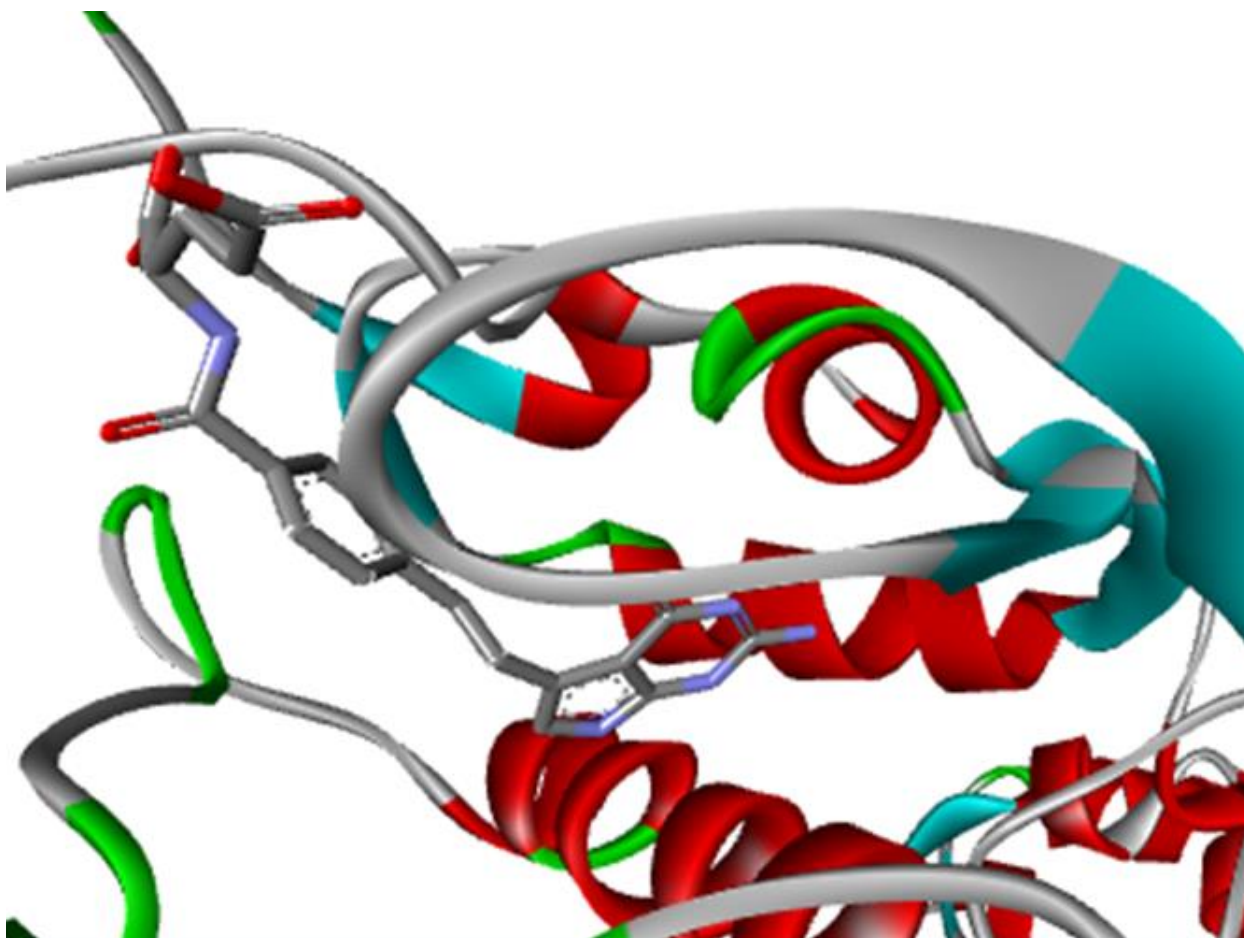


Рисунок 55 – Суперпозиция молекулы пеметрекседа в комплексе с рецептором FOLR2 (PDB ID: 4KN2)

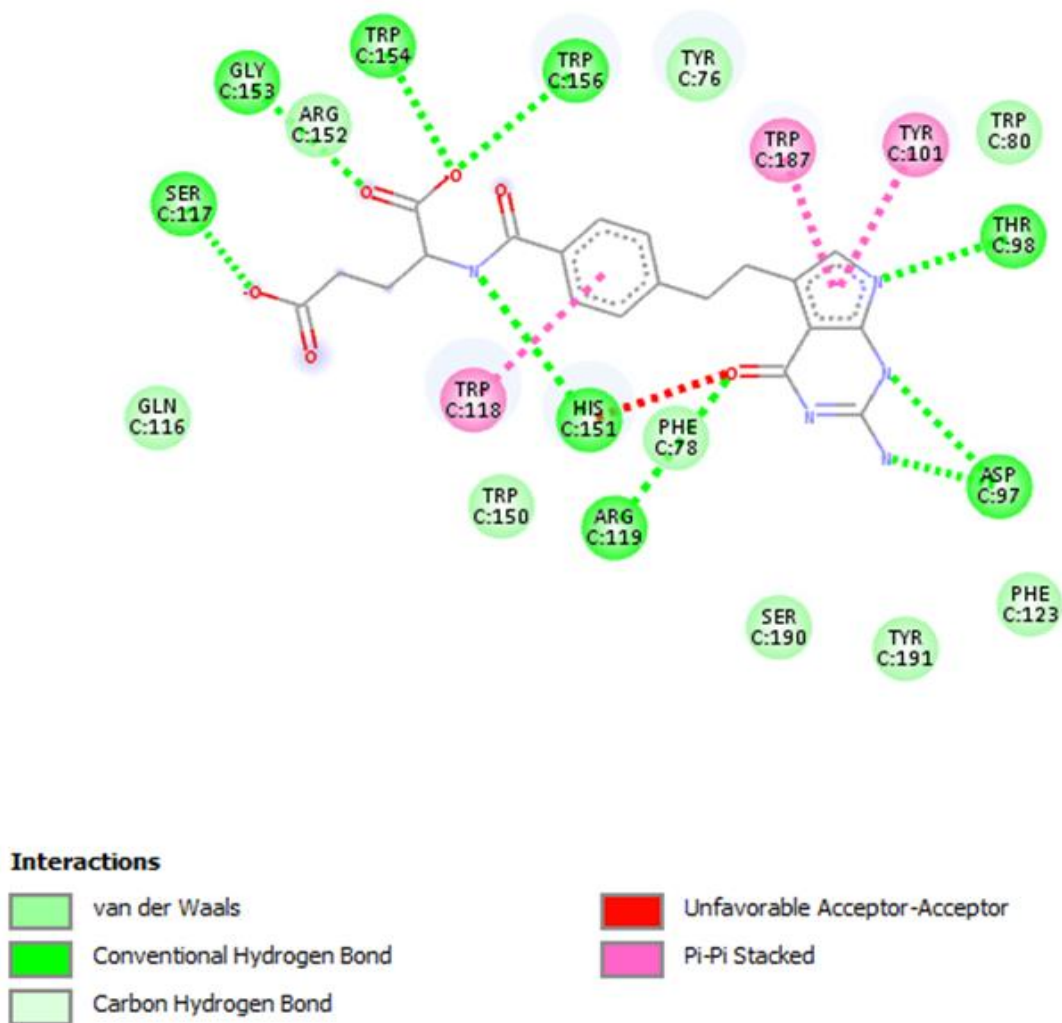
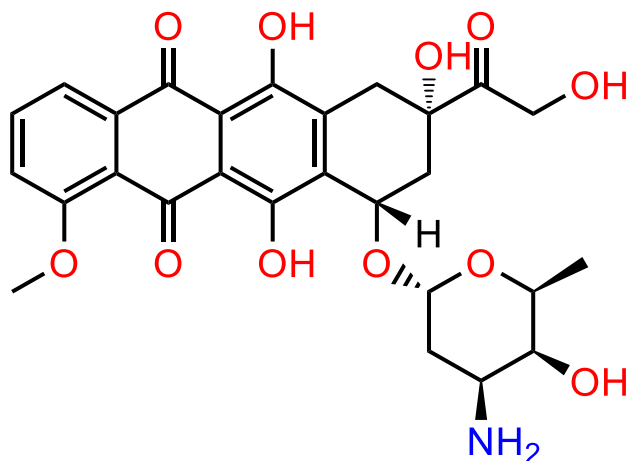


Рисунок 56 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы пеметрекседа в комплексе с рецептором FOLR2 (PDB ID: 4KN2)

Доксорубин – противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, оказывающий антимиотическое и антипролиферативное действие (рисунок 57). Механизм его действия заключается во взаимодействии с ДНК, образовании свободных радикалов и прямом воздействии на мембраны клеток с подавлением синтеза нуклеиновых кислот. Помимо ингибирования дупликации ДНК, ДНК-зависимого синтеза РНК и фермента топоизомеразы-II, противораковое лекарственное средство доксорубин вызывает дисфункцию теломеров и демонстрирует несколько стратегий воздействия на функционирование генов.



(8*S*,10*S*)-10-(((2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-dione

Рисунок 57 – Структурная формула доксорубицина

С помощью протонной спектроскопии ядерного магнитного резонанса и использования фосфора-31 представлены доказательства связывания доксорубицина с параллельной цепью межмолекулярной [d-(TTAGGGT)] 4G-квадруплексной ДНК, содержащей человеческую теломерную ДНК. Спектроскопия с упорядоченной диффузией показывает образование комплекса между двумя молекулами. Изменения химического сдвига и уширение линий протонов ДНК и доксорубицина предполагают участие определенных химических групп фрагментов во взаимодействии. Присутствие последовательных ядерных усилений Оверхаузера на всех этапах базового квартета и отсутствие больших сдвигов в слабое поле в ^{31}P -резонансе доказывают отсутствие интеркаляции хромофора доксорубицина между базовыми квартетами. Моделирование ограниченной молекулярной динамики с использованием 15 наблюдаемых коротких межмолекулярных межпротонных дистанционных контактов изображает укладку кольца D доксорубицина с концевым квартетом G6 за счет смещения основания T7 и связывания внешней бороздки близко к основаниям T1-T2-A3.

Полученные данные открывают путь к разработке альтернативных препаратов на основе производных антрацилина со специфическими модификациями в кольце D для усиления индуцированной термостабилизации и использования альтернативного механизма связывания с 4G-квадруплексной ДНК по сравнению с известной дуплексной ДНК.

На рисунке 58 показана суперпозиция молекулы доксорубицина с доменом 4G-квадруплексной ДНК.

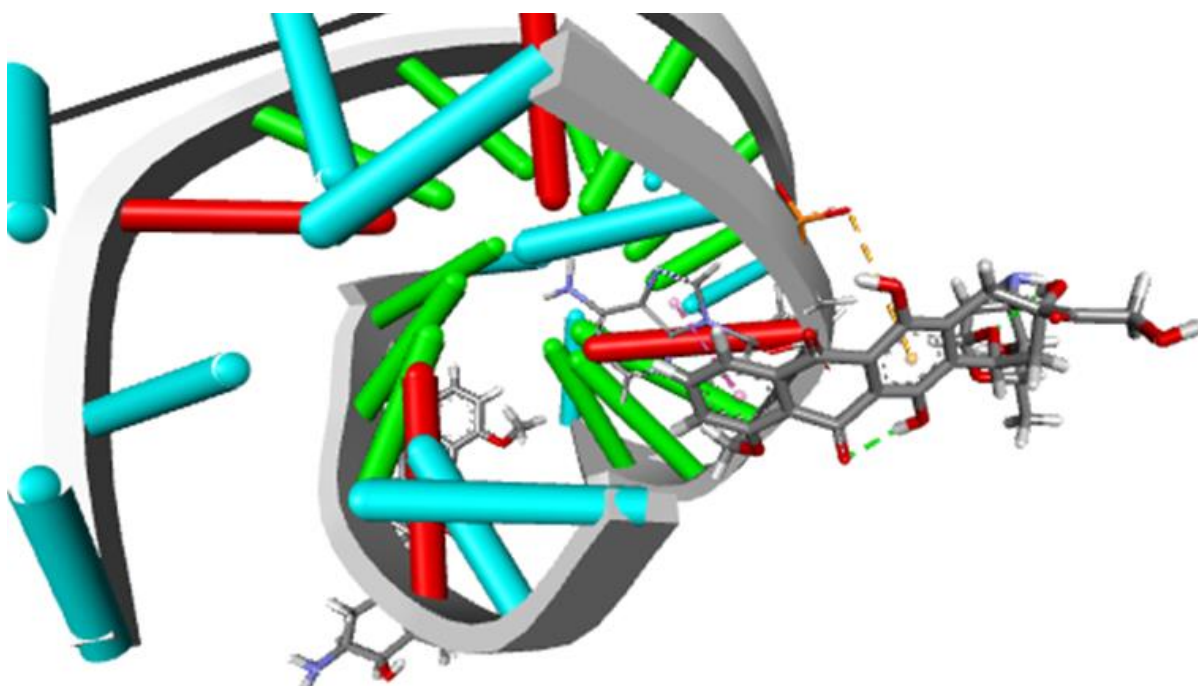


Рисунок 58 – Кристаллографическая модель 4G-квадруплексной ДНК, сокристаллизованной с молекулой доксорубицина (PDB ID: 6KN4)

7.3 Молекулярный докинг молекулы ЛХТ-17-19

По результатам докинговых исследований были вычислены:

- скоринговая функция, которая указывает энтальпийную составляющую величину свободной энергии связывания (Affinity DG) для лучших конформационных положений (таблица 9);
- величины свободной энергии связывания и константы связывания (EDoc

kcal/mol и K_i μM (micromolar) для определенного конформационного положения лиганда (таблица 10).

Данные значения позволяют определить степень сродства между лигандами и соответствующим рецептором, а также устойчивость образованных комплексов. Для сравнительной оценки, помимо молекулы ЛХТ-17-19, скоринговые функции, энергии и константы связывания были рассчитаны для известных цитостатиков (таблицы 9 и 10).

Таблица 9 - Значение Affinity DG для лучших конформационных положений тестируемых соединений в комплексе с биомишенями (PDB ID: 6NPE, 5MQT, 4R7I, 1M17, 4KN2, 6KN4)

Вещество	Affinity DG, kcal/mol					
	6NPE	5MQT	4R7I	1M17	4KN2	6KN4
ЛХТ-17-19	-8,3	-6,9	-8,2	-6,8	-9,0	-7,1
Иматиниб	-10,7	-10,0	-9,3	-	-	-
Эрлотиниб	-	-	-	-7,5	-	-
Пеметрексед	-	-	-	-	-11,3	-
Доксорубицин	-	-	-	-	-	-8,5

Активность тестируемых молекул относительно опухолевых мишеней может быть реализована путем создания между ними комплексов, устойчивость которых обеспечивается преимущественно за счет энергетически благоприятного геометрического расположения лигандов в активном центре соответствующей мишени, образования водородных связей между ними, межмолекулярных электростатических и донорно-акцепторных взаимодействий.

Таблица 10 - Значение свободной энергии связывания и коэффициентов связывания протестированных противоопухолевых агентов в комплексе с биомишенями (PDB ID: 6NPE, 5MQT, 4R7I, 1M17, 4KN2, 6KN4)

Вещество	Affinity DG, kcal/mol											
	6NPE		5MQT		4R7I		1M17		4KN2		6KN4	
	EDoc*	Ki uM**	EDoc*	Ki uM**	EDoc*	Ki uM**	EDoc*	Ki uM**	EDoc*	Ki uM**	EDoc*	Ki uM**
ЛХТ-17-19	-6,01	39,14	-4,49	514,38	-5,51	91,29	-5,21	151,46	-6,23	27,27	-5,96	43,03
Иматиниб	-7,82	1,84	-7,63	2,54	-5,87	50,18	-	-	-	-	-	-
Эрлотиниб	-	-	-	-	-	-	-4,38	611,59	-	-	-	-
Пеметрексед	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,93	38,19	-	-
Доксорубицин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-7,47	3,34

Примечания: *kcal/mol; **микромольные концентрации.

Как следствие, термодинамическая вероятность такого связывания подтверждается отрицательными значениями скоринговых функций (Affinity DG, kcal/mol), значениями свободной энергии связывания EDoc (kcal/mol) и константами связывания Ki (uM) (см. таблицы 9 и 10).

Согласно полученным результатам, молекула ЛХТ-17-19 по всем вычисленным значениям не превышает значения для препаратов сравнения, а соответственно обладает умеренным аффинитетом к выбранным мишеням.

Наиболее выраженный аффинитет 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 -8,2 kcal/mol, EDoc - 5,51 kcal/mol, Ki 91,29 uM; рецептора FOLR2 (PDB ID: 4KN2) со значениями Affinity DG -9,0 kcal/mol, EDoc – 6,23 kcal/mol, Ki 27,27 uM. Для того чтобы понять, каким образом возникает аффинитет исследуемой молекулы к данным мишеням, нами проведен детальный анализ ее геометрического расположения в активных сайтах мишеней.

Образованию комплекса молекулы ЛХТ-17-19 с киназой C-abl способствует водородная связь между гетероатомом азота одного из пиридиновых циклов с остатком метионина Met337. Комплекс также образуется за счет взаимодействий π - σ , которые возникают между пиридиновыми циклами и остатками треонина Thr334 и лейцина Leu389, Leu267. Стабилизации комплекса способствуют π - π , Alk- и π - Alk- взаимодействия между пиридиновыми ядрами и метильным заместителем с остатками аминокислот Tyr272, Phe336, Ala288, Val275, Val318, Lys290, Ile332, Met309 (рисунки 59 и 60).

Также образованию комплекса способствуют электростатическое π -катионное и гидрофобные π - σ взаимодействия с остатками аминокислот Lys616, Leu588 и Thr663 соответственно. Дополнительной стабилизации комплекса способствуют π - π , Alk- и π - Alk- взаимодействия между пиридинами и метильным фрагментом молекулы с остатками аминокислот

Tyr665, Val66, Val647, Val596, Met637, Ala614 и Leu785 (рисунки 61 и 62).

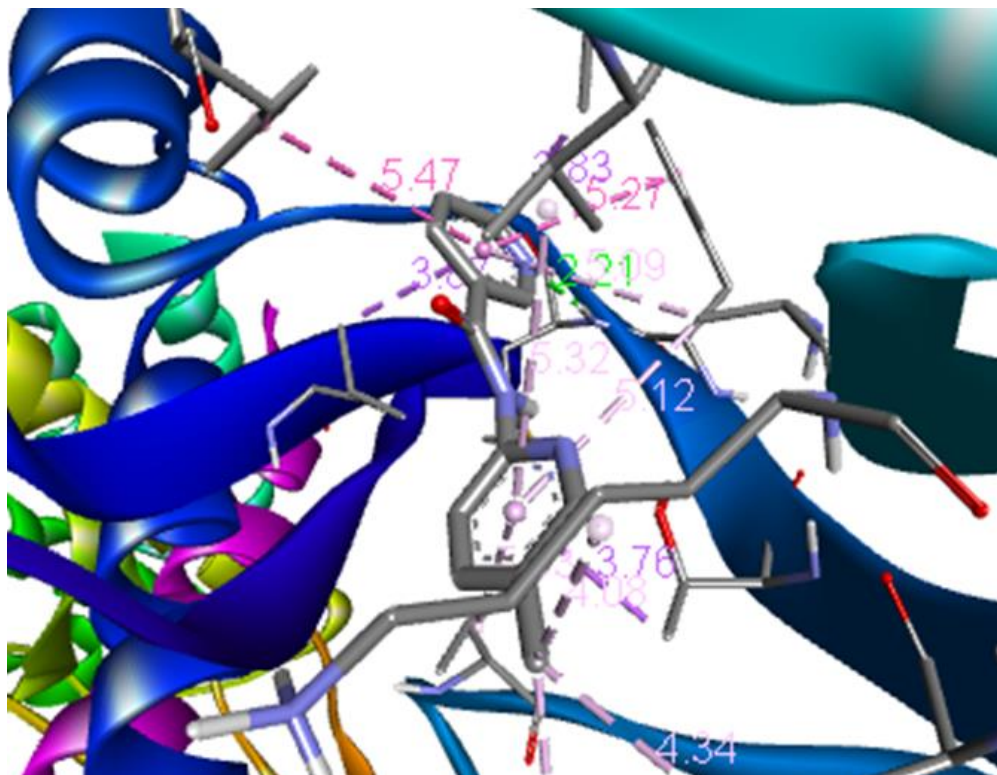


Рисунок 59 – Суперпозиция молекулы ЛХТ-17-19 в комплексе с киназой C-abl (PDB ID: 6NPE)

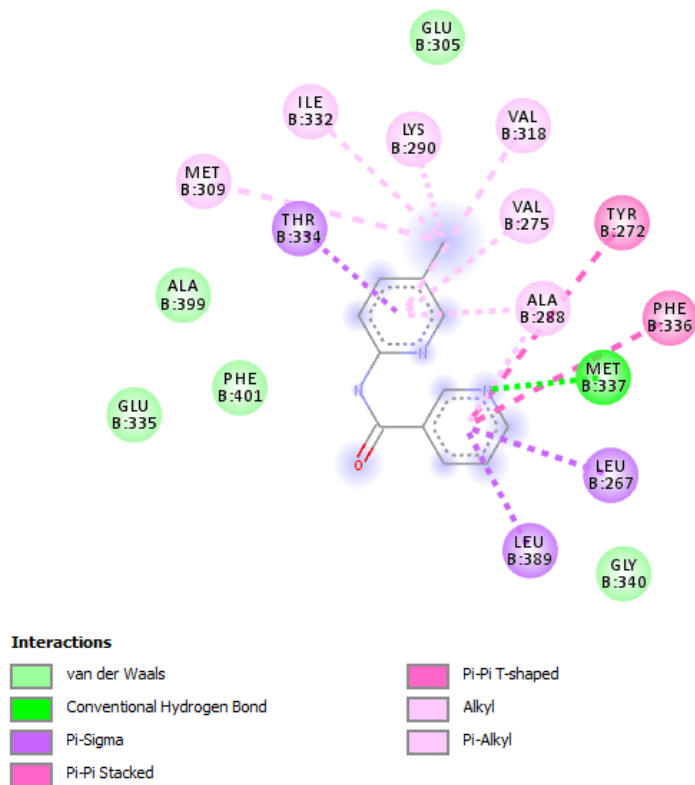
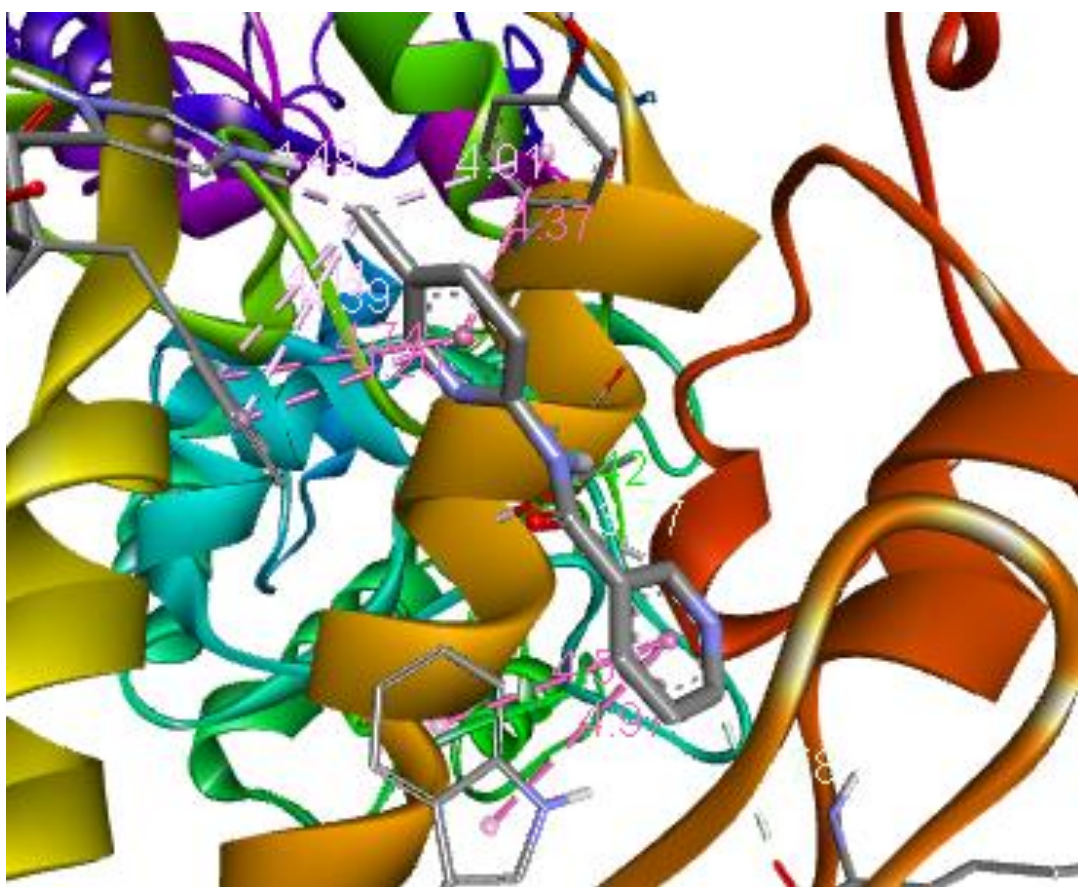


Рисунок 60 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы ЛХТ-17-19 в комплексе с киназой C-abl (PDB ID: 6NPE)

участием гетероатома азота пиридинового фрагмента и остатком цистеина Cys666. Молекула ЛХТ-17-19 образует комплекс с рецептором эпидермального фактора роста (сайтом связывания) EGFRK за счет водородных связей между протоном карбамидного фрагмента и пиридиновой системой с остатком треонина Thr98. Стабилизации комплекса способствуют гидрофобные контакты π - π и π -Alk, в которых принимают участие пиридиновые циклы, метильный заместитель и остатки аминокислот Trp187, Tyr101, Trp80, His151 (рисунки 63 и 64).



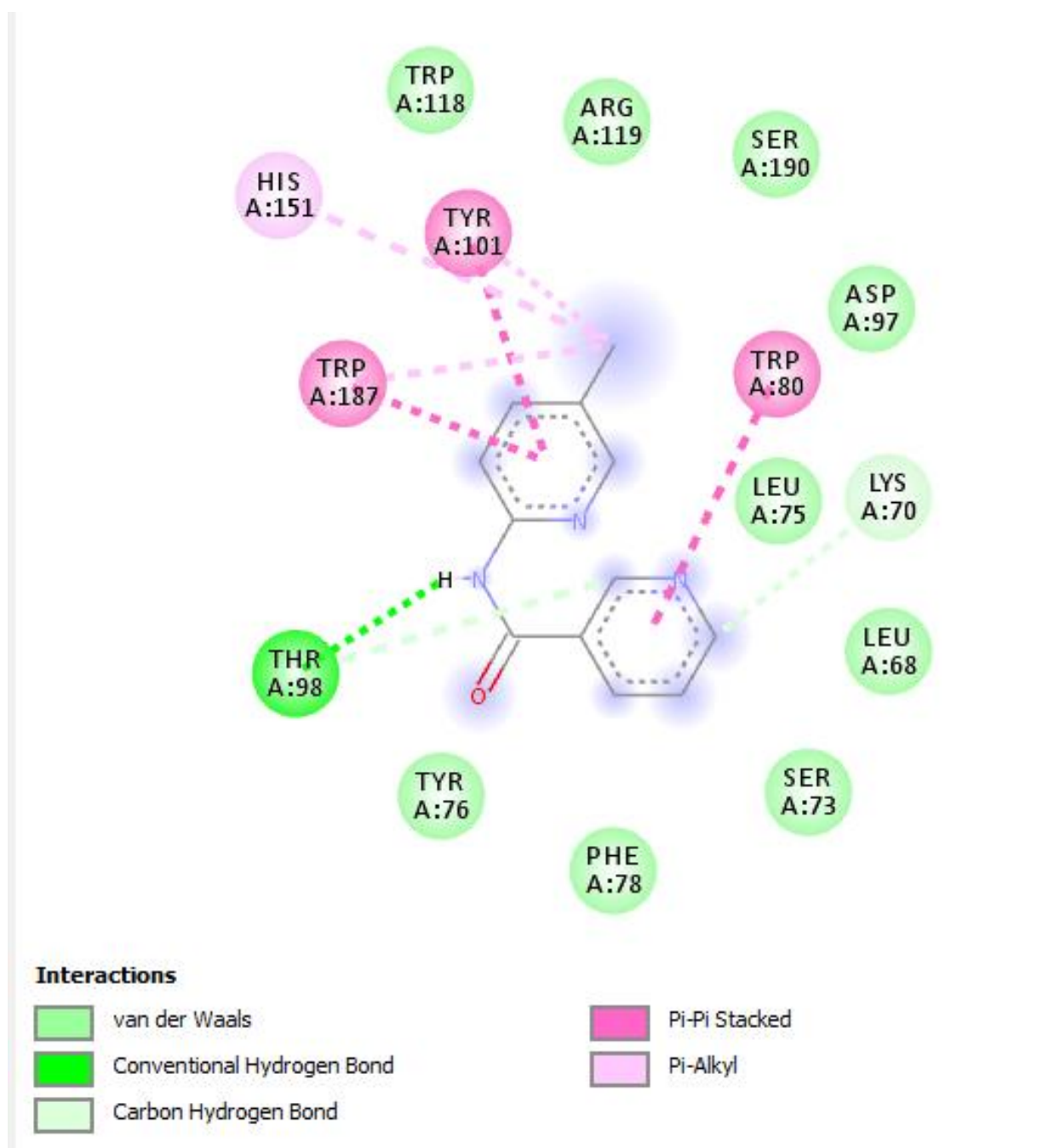


Рисунок 64 – Диаграмма межмолекулярных взаимодействий молекулы ЛХТ-17-19 в комплексе с активным центром EGFRK (PDB ID: 4KN2)

Таблица 11 - Значения межатомных расстояний, категорий и типов межмолекулярных взаимодействий ЛХТ-17-19 в активных сайтах биомишеней (PDB ID: 6NPE, 4R7I, 4KN2)

6NPE			4R7I			4KN2		
Расстояние Å	Категория	Тип	Расстояние Å	Категория	Тип	Расстояние Å	Категория	Тип
1	2	3	4	5	6	7	8	9
2,21	Водородная связь	Условная Водородная связь	2,39	Водородная связь	Условная Водородная связь	2,42	Водородная связь	Условная Водородная связь
3,84	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Sigma	4,67	Электростатические взаимодействия	Pi-Cation	3,78	Водородная связь	Карбон-водородная связь
3,76	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Sigma	3,83	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Sigma	3,77	Водородная связь	Карбон-водородная связь
3,87	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Sigma	3,89	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Sigma	4,97	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked
5,27	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked	5,74	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked	4,59	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked
5,47	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi T-shaped	4,09	Гидрофобные взаимодействия	Alkyl	4,37	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked

Продолжение Таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4,08	Гидрофобные взаимодействия	Alkyl	5,12	Гидрофобные взаимодействия	Alkyl	4,74	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked
5,08	Гидрофобные взаимодействия	Alkyl	4,58	Гидрофобные взаимодействия	Alkyl	4,20	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Pi Stacked
4,34	Гидрофобные взаимодействия	Alkyl	4,94	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl	4,01	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl
5,32	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl	4,85	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl	4,49	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl
5,12	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl	5,24	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl	4,11	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl
			5,27	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl	4,39	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl
			4,97	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl			
			5,17	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl			
			4,52	Гидрофобные взаимодействия	Pi-Alkyl			

Согласно полученным результатам докинговых исследований молекула ЛХТ-17-19 обладает выраженным аффинитетом к выбранным противоопухолевым мишеням. Все вычисленные значения превышают либо соответствуют значениям для препаратов сравнения (иматиниб, эрлотиниб, пеметрексед, доксорубицин).

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 μ M; рецептора CSF1 (PDB ID: 4R7I) со значениями Affinity DG -8,20 kcal/mol, Edoc -5,51 kcal/mol, Ki 91,29 μ M; рецептора EGFRK (PDB ID: 4KN2) со значениями Affinity DG -9,0 kcal/mol, EDoc -6,23 kcal/mol, Ki 27,27 μ M.

ГЛАВА 8. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИДИНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА КСЕНОГРАФТНОЙ МОДЕЛИ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ЭПИГЕНОМНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Тройной негативный рак молочной железы отличается отсутствием или низкой экспрессией эстрогеновых, прогестероновых рецепторов, рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), крайне агрессивным поведением в виде частого рецидивирования и метастазирования, первичной резистентностью к гормональным и классическим цитостатическим химиотерапевтическим средствам [324]. Для преодоления токсичности химиопрепарата используются разнообразные системы доставки лекарственного вещества к опухолевым клеткам, позволяющие изменить его биораспределение и фармакокинетические характеристики. Тем самым уменьшить цитотоксичность химиопрепарата по отношению к здоровой ткани. Наночастицы предлагаются в качестве одного из способов избирательной доставки фармацевтических агентов к тканям и органам, ограничивая при этом их воздействие на здоровую ткань [325] .

На протяжении последних десятилетий умы исследователей во всем мире волнует проблема поиска приемлемых мишеней для создания таргетных эффективных средств контроля заболевания, а также преодоления первичной и вторичной резистентности к существующим селективным лекарственным средствам направленного действия.

В доступной литературе широко обсуждают фармакологический потенциал лекарственных веществ, нацеленных на синтез ДНК и микротрубочек, сигнальные пути mTOR, ингибирование сурвивина, мутантный ген *TP53* и продукт его экспрессии – протеин p53, ингибирование Bcl-2 и NAMPT, протеасом и митотических протеинов (например, KSP)

[325]. Также в последнее время появляется все больше публикаций о высоком противоопухолевом потенциале таргетирования EGFR при тройном негативном раке молочной железы [327, 328].

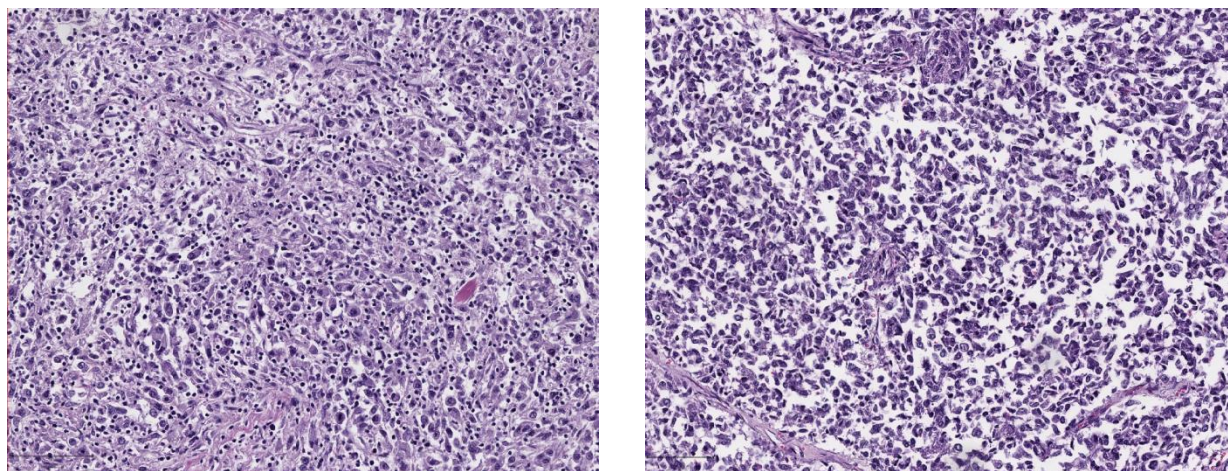
На предыдущих этапах нашего исследования мы установили, что производные пиридинкарбоновых кислот, и в частности соединение дигидроакридина ЛХТ-17-19, в экспериментах по молекулярному докингу продемонстрировали высокое ингибиторное сродство к активному сайту связывания EGFR; в культурах клеток трижды 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 выдвинутого предположения, а также получения доказательств эффективности ЛХТ-17-19 мы провели исследование вещества при курсовом внутрибрюшинном введении на ксенографтной модели рецидивного тройного негативного рака молочной железы человека.

8.1 Разработка ксенографтной модели рецидивного тройного негативного рака молочной железы

Для формирования базовой модели мы воспользовались методом, описанным Powell с соавт. (2020), в нашей модификации [270]. Животным первой группы (контроль без лечения) ежедневно в течение 5 сут внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического 0,9% раствора хлорида натрия и внутрь 0,2 мл 2% крахмального клейстера; животным второй группы (контроль с эрлотинибом) в течение 5 сут внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического 0,9% раствора хлорида натрия и внутрь 0,5 мг/кг эрлотиниба (Erlotinib hydrochloride, субстанция номер CDS022564 с чистотой более 98 %, «Merck Sigma-Aldrich», Германия) в 0,2 мл 2% крахмального клейстера; животным третьей группы (ЛХТ-17-19) ежедневно в течение 5 сут

внутрибрюшинно вводили соединение ЛХТ-17-19 в суточной дозе 3,7 мг/кг (Кудрявцев М.Ю., 2022) в 0,2 мл физиологического 0,9% раствора хлорида натрия и внутрь 0,2 мл 2% крахмального клейстера. Таким образом, каждое животное в исследуемых группах получало ежедневно в течение 5 дней одинаковый набор интервенций (внутрибрюшинное введение и введение внутрь).

Мы провели морфологическое и иммуногистохимическое типирование опухоли в каждой из исследуемых групп для определения корректности ее отнесения к типу тройного негативного рака молочной железы. Результаты представлены на рисунках 65-69.



А

Б

Рисунок 65 – Морфологическая характеристика образцов опухолей: А – материнская опухоль, Б – ксенографтная опухоль. Гематоксилин и эозин, ув. 200.

На увеличении $\times 200$ в молочной железе определяется опухолевый узел с карциномой солидного характера роста. Клетки опухоли с выраженным клеточным полиморфизмом, большим количеством митозов. Tils опухоли выраженный (более 40 %). Десмопластическая реакция стромы выраженная. Аналогичная картина наблюдалась в ксенографтном опухолевом узле, полученном от самок - носителей опухоли иммунодефицитных мышей BALB/c *nu/nu*, после выведения последних из эксперимента.

При окрашивании антителами против рецепторов Estrogen по шкале Allred балл пропорции составлял 0, балл интенсивности – 0. В качестве положительного внешнего контроля использовали потовые железы материнской опухоли (ядерное окрашивание рецепторов Estrogen от слабого до выраженного) (рисунок 66).

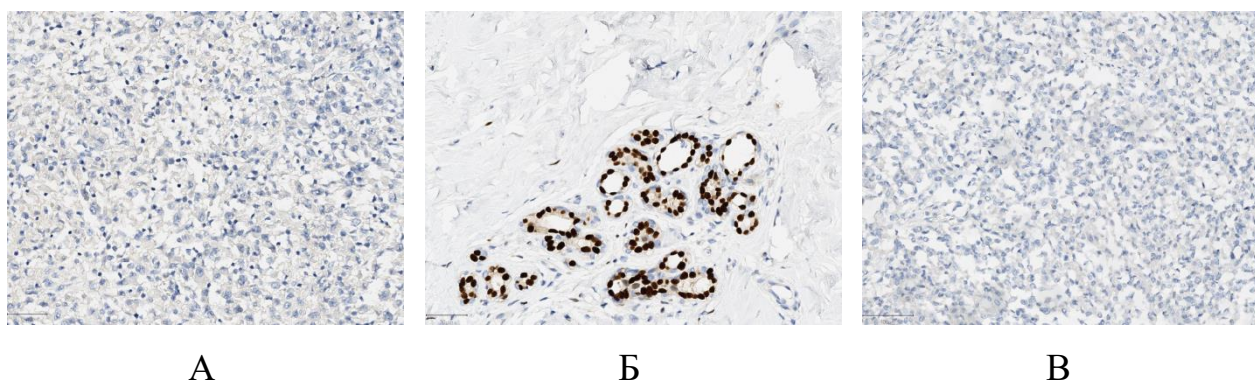


Рисунок 66 – Иммуногистохимическая характеристика образцов опухолей. Окрашивание с анти-ER1 антителами: А – материнская опухоль, Б – положительный внешний контроль (потовые железы), В – ксенографтная опухоль, ув. 200

Окрашивание антителами против рецепторов Progesteron. Балл пропорции – 0, балл интенсивности – 0 (по шкале Allred) при положительном внешнем контроле (потовые железы). Ядерное окрашивание рецепторов Progesteron от слабого до выраженного (рисунок 67).

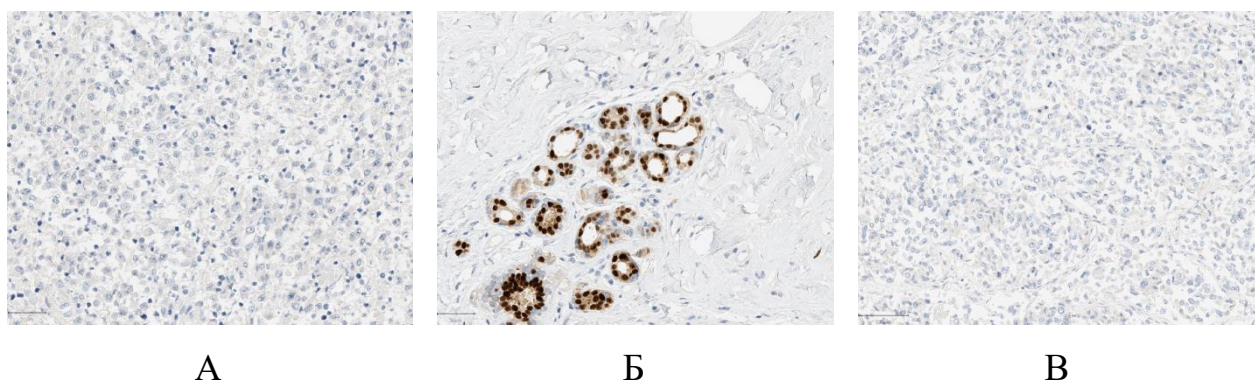


Рисунок 67 – Иммуногистохимическая характеристика образцов опухолей. Окрашивание с анти-PR антителами: А – материнская опухоль, Б – положительный внешний контроль (потовые железы), В – ксенографтная опухоль, ув. 200

При окрашивании антителами против HER-2/neu было показано отсутствие мембранного окрашивания клеток карциномы как в материнской опухоли, так и в ксенографтной. Контрольная реакция с антителами против HER-2/neu в протоках потовой железы характеризовалась слабым неполным, местами гранулярным субмембранным окрашиванием клеток протоков (рисунок 68).

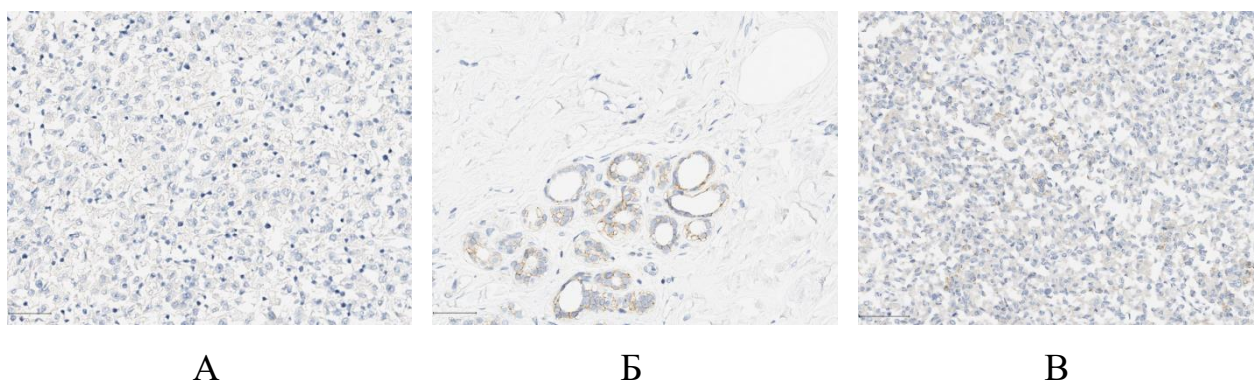


Рисунок 68 – Иммуногистохимическая характеристика образцов опухолей. Окрашивание с анти-HER-2/neu антителами: А – материнская опухоль, Б – положительный внешний контроль (потовые железы), В – ксенографтная опухоль, ув. 200

При окрашивании опухолевого узла с антителами анти-Ki-67 в качестве позитивного внутреннего контроля использовали протоки потовой железы, характеризующиеся единичными клетками эпителия с позитивным ядерным окрашиванием. На рисунке 69 хорошо видно высокую экспрессию маркера Ki-67 во всех образцах опухолевой ткани, что свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале, а следовательно, о высокой агрессивности опухоли. Индекс пролиферации Ki-67 составил 97 %.

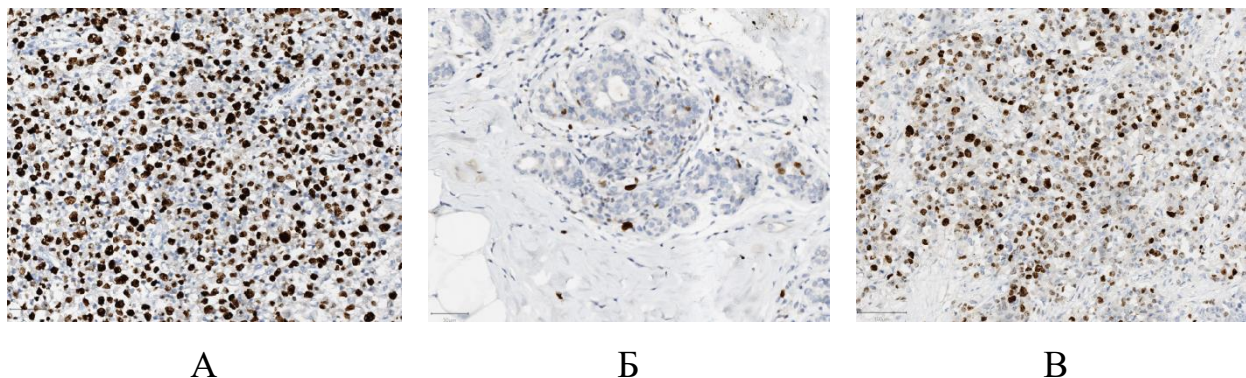


Рисунок 69 – Иммуногистохимическая характеристика образцов опухолей. Окрашивание с анти-Ki-67 антителами: А – материнская опухоль, Б – положительный внешний контроль (потовые железы), В – ксенографтная опухоль, ув. 200

Таким образом, на основании полученных морфологических и иммуногистохимических данных созданные ксенографтные опухоли тройного негативного рака молочной железы являются идентичными материнской, что открывает возможности для использования данной модели при изучении противоопухолевой активности новых лекарственных веществ.

8.2 Противоопухолевое действие ЛХТ-17-19 на модели ксенографтного тройного негативного рака молочной железы у гуманизированных мышей

В контрольной группе животных наблюдали прогрессивный рост опухолевого узла (таблица 12), который к 35-м суткам достигал в среднем объема $1\,546\text{ мм}^3$ и массы в среднем $1,36\text{ г}$ (рисунок 66). На фоне пятидневного курсового внутрижелудочного введения таргетного препарата эрлотиниба наблюдали значительное торможение роста опухолевого узла: к 35-м суткам после трансплантации опухоли ее объем составлял в среднем 787 мм^2 и масса – $0,83\text{ г}$, что было статистически значимо при сравнении с контролем без лечения ($p = 0,001$ и $0,005$ соответственно).

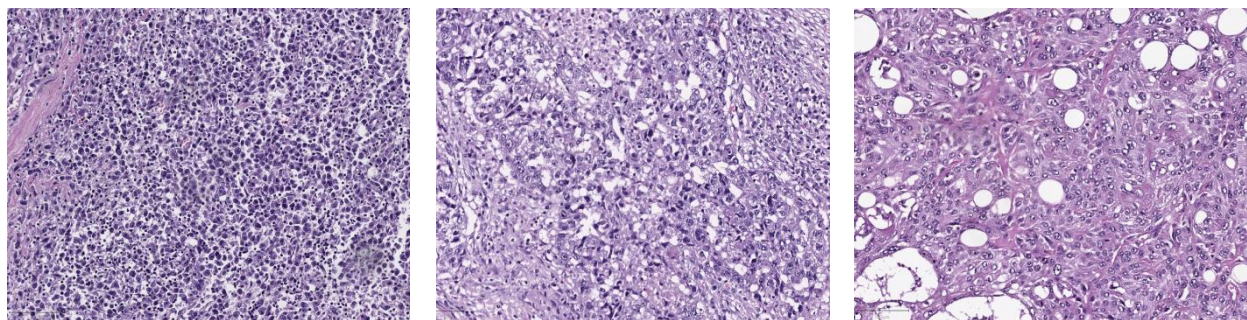
Морфологическая картина опухолевого узла характеризовалась наличием атипичных эпителиальных клеток с крупными круглыми и овальными ядрами, находящихся в фазе активного деления (рисунок 70А), что подтверждается высокой экспрессией маркера Ki-67- 90 %. Tils опухоли выраженный (более 40 %).

В группе экспериментальной терапии производным пиридинкарбоновой кислоты – соединением ЛХТ-17-19 были установлены следующие феномены динамики количественных характеристик ксенографтной опухоли: к 35-м суткам после трансплантации опухоли ее объем составлял в среднем 504 мм² и масса – 0,52 г, что статистически значимо при сравнении с контролем без лечения ($p = 0,001$ и $0,005$ соответственно) и при лечении эрлотинибом.

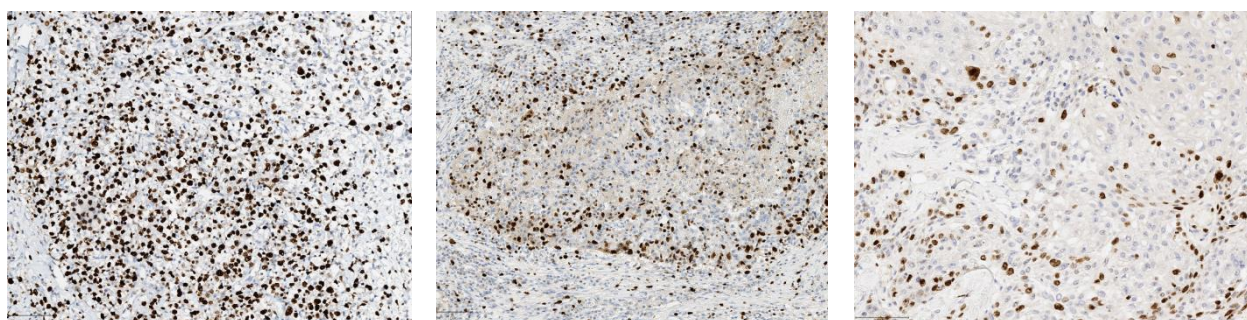
При морфологическом исследовании опухолевого узла у животных, получавших эрлотиниб, было показано сохранение атипичных клеток в центре опухолевого узла, которые не изменяли свою структуру, однако количество клеток в стадии митоза заметно сокращалось, индекс пролиферации по Ki-67 составил 40 %. По периферии опухоли клетки находились в состоянии дистрофии, регистрировали очаги некроза, составляющие 60 % (рисунок 70Б).

Данная морфологическая картина свидетельствует о патоморфозе 2-й степени согласноклассификации Е. Ф. Лушников в отношении трижды негативной опухоли молочной железы.

При анализе динамики объема опухоли следует обратить внимание на то, что начиная с 25-х суток экспериментальной терапии было установлено достоверное отставание в объеме подкожного узла у носителей, получавших в качестве экспериментальной терапии препарат сравнения эрлотиниб в суточной дозе 0,5 мг/кг внутривенно и исследуемое соединение ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг внутривенно в течение 5 дней.



Гематоксилин и эозин, увеличение 200



Окрашивание с анти-Ki-67 антителами, увеличение 200

А

Б

В

Рисунок 70 – Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика образцов опухолей в исследуемых группах: А – контроль без лечения, Б – контроль с эрлотинибом, В – группа с применением ЛХТ-17-19

Начиная с 30-х суток наблюдения мы обнаружили статистические различия между объемом опухоли и ее массой в группах мышей, получавших эрлотиниб и ЛХТ-17-19 (рисунки 71 и 72).

Важнейшим элементом оценки терапевтического эффекта противоопухолевых лекарственных средств, в том числе в условиях экспериментальной патологии, является оценка выживаемости. Мы в своем исследовании провели анализ выживаемости с определением ее медианы (рисунок 73, таблица 12).

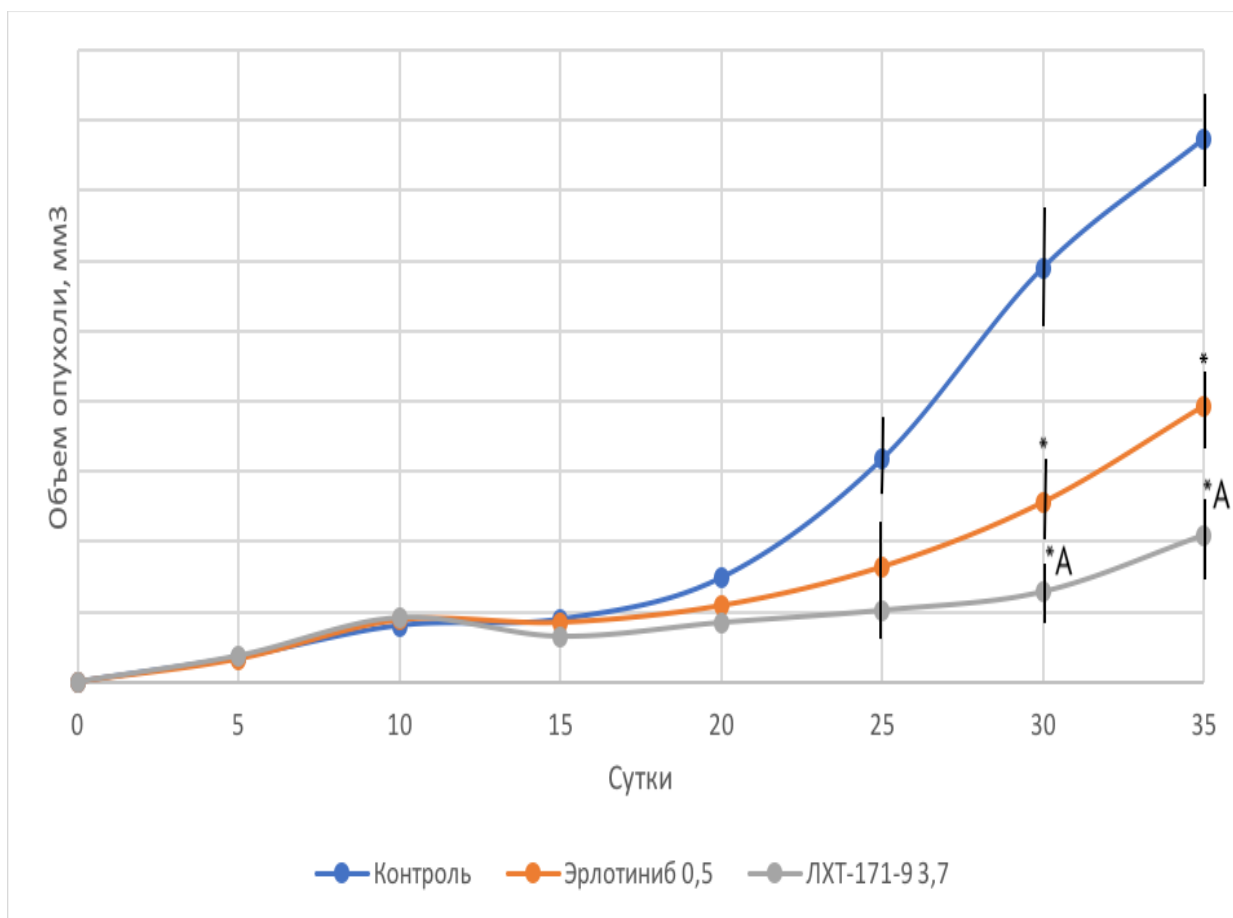


Рисунок 71 – Динамика объема опухолевого узла ксенографтного рака молочной железы мышей BALB/c *nu/nu* на фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 и препаратом сравнения. Значимость различий оценивали при помощи ANOVA с последующим межгрупповым анализом по Тьюки: * $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля без лечения; A $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля, получавшей эрлотиниб ($n = 10$ в каждой экспериментальной группе)

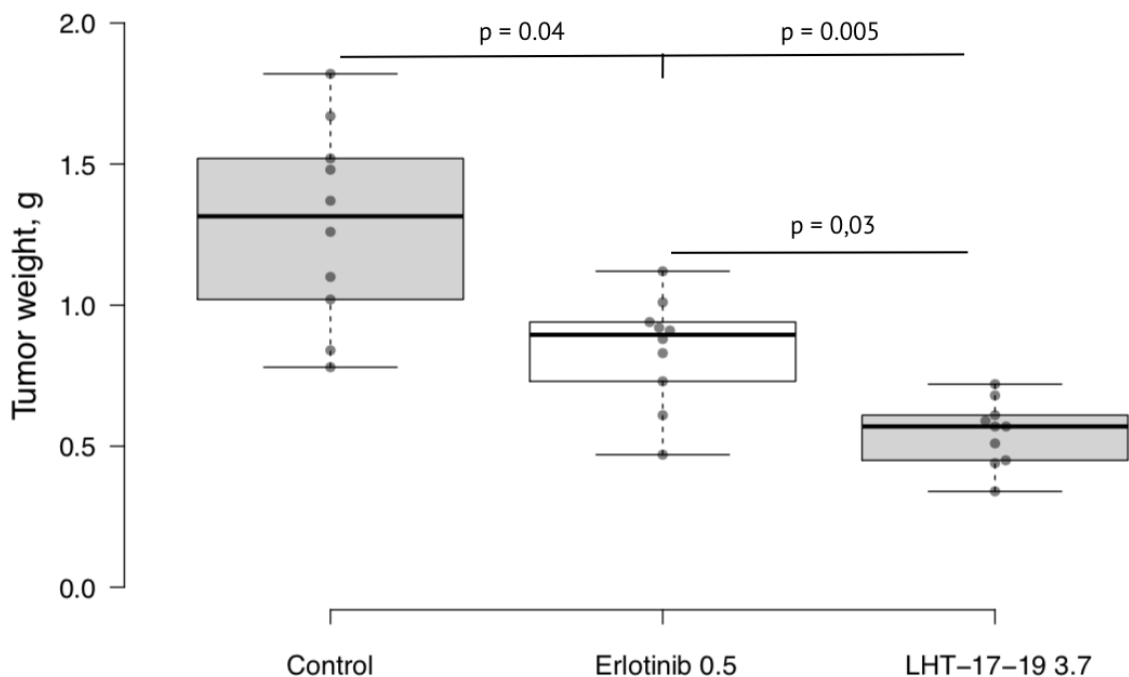


Рисунок 72 – Масса опухолевого узла ксенографтного рака молочной железы у мышей BALB/c *nu/nu* на 35-е сутки наблюдения на фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 и препаратом сравнения. Значимость различий оценивали при помощи ANOVA с последующим межгрупповым анализом по Тьюки: * $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля без лечения; $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля, получавшей эрлотиниб ($n = 10$ в каждой экспериментальной группе)

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

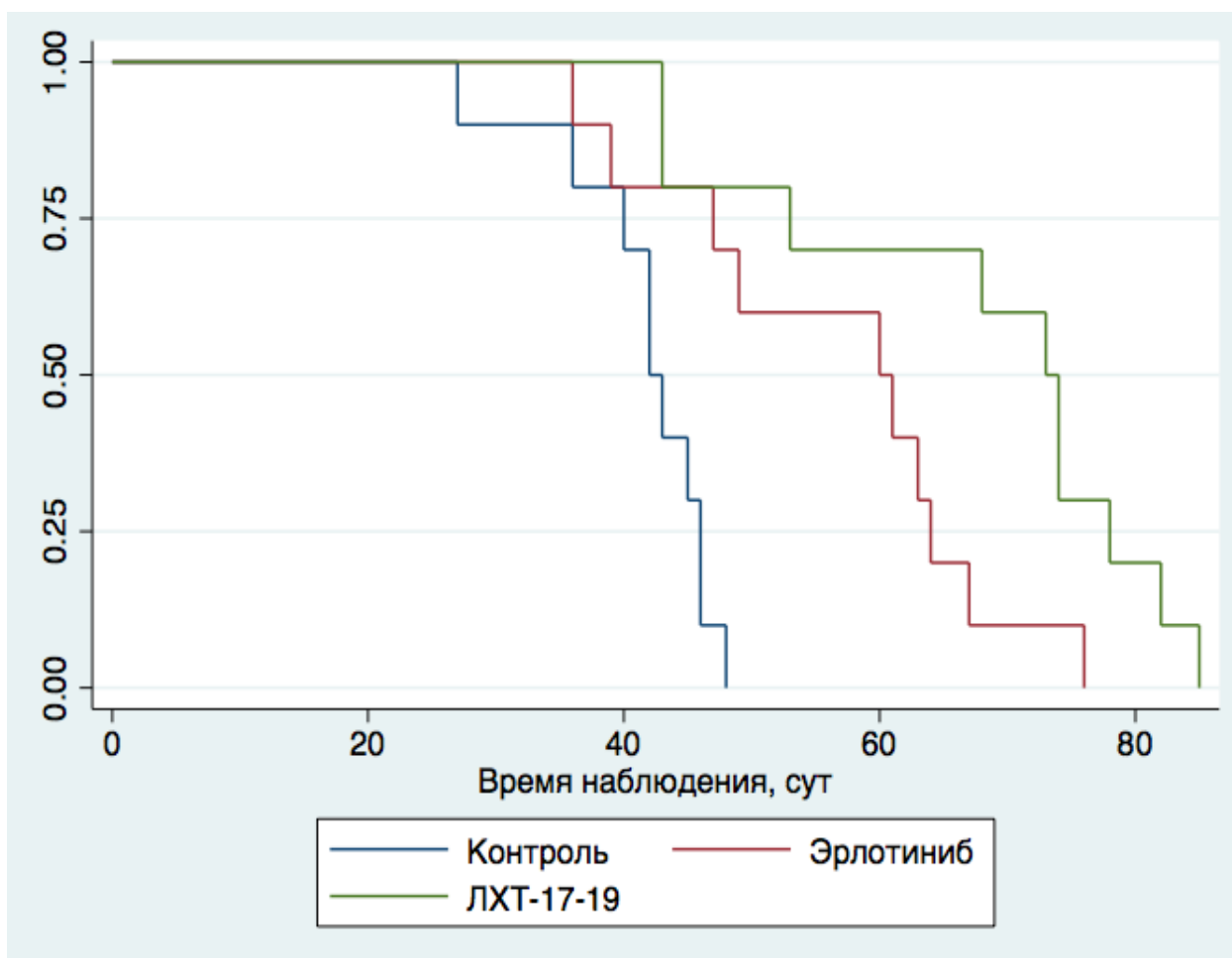


Рисунок 73 – Кривая Каплана - Майера выживаемости экспериментальных животных – мышей BALB/c *nu/nu*– с ксенографтным раком молочной железы спустя 25 дней после начала специфической противоопухолевой терапии (пояснения в тексте)

Для анализа метастазирования подсчитывали количество поверхностных метастазов в легких и почках экспериментальных животных – носителей ксенографтной опухоли. Мы установили в контрольной группе $18,3 \pm 2,5$ поверхностных метастазов различной локализации в пересчете на одно животное. В группе препарата сравнения показатель был равен $4,3 \pm 2,6$ ($p = 0,005$ при сравнении с контролем), а в экспериментальной группе ЛХТ-17-19 – $5,1 \pm 3,4$ ($p = 0,005$ при сравнении с контролем, отсутствуют достоверные различия с группой эрлотиниба).

Таблица 12 - Противоопухолевая активность ЛХТ-17-19 и выживаемость животных с ксенографтной моделью трижды негативного рака молочной железы у мышей BALB/c *nu/nu* (M±SD)

Группа, доза, мг/кг/сут.	n	Время удвоения размеров опухоли, сут	Число метастазов	Медиана выживаемости, сут
Контроль	10	22,3±1,4	18,3±2,5	42
Эрлотиниб, 0,5	10	27,6±1,2*	4,3±2,6*	60 ^B
ЛХТ-17-19, 3,7	10	31,8±1,3 ^a	5,1±3,4*	73 ^c

Примечания: *- различия при сравнении с контролем достоверны при $p < 0,05$; ^a различия при сравнении с контролем и эрлотинибом достоверны при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Тьюки); ^B различия при сравнении с контролем достоверны при $p < 0,05$; ^c различия при сравнении с контролем и эрлотинибом достоверны при $p < 0,05$ (анализ выживаемости по Каплану-Майеру, критерий лог-ранк)

Таким образом, соединение дигидроакридина из группы производных пиридинкарбоновых кислот ЛХТ-17-19 при курсовом внутрибрюшинном введении продемонстрировало противоопухолевую активность на ксенографтной модели тройного негативного рака молочной железы: подавляло рост опухолевого узла при сравнении как с контролем, так и с таргетным препаратом эрлотинибом, повышало выживаемость животных и ограничивало метастатический процесс.

8.3 Некоторые генетические и эпигенетические механизмы действия ЛХТ-17-19 на ксенографтной модели тройного негативного рака молочной железы

В рамках исследования возможных механизмов противоопухолевого эффекта соединения ЛХТ-17-19 на генетическом и эпигенетическом уровне учитывали ранее проведенные докинговые исследования. Мы показали, что наибольшее сродство соединение проявляет в отношении сайта связывания (каталитического центра) фермента из группы киназ EGFR. В этой связи

изучили экспрессию гена *EGFR*, частоту мутаций в нем, а также экспрессию микроРНК-200а и микроРНК-145, участвующих в онкогенной трансформации клеток молочной железы.

8.3.1 Экспрессия гена *EGFR* и частота мутаций в нем на фоне курсового введения ЛХТ-17-19 мышам с ксенографтной моделью опухоли

Исходно экспрессия гена *EGFR* в образцах трансплантируемой опухоли молочной железы была высокая, уровень его гиперэкспрессии составлял в среднем 10,1 % (рисунки 74 и 75). На фоне экспериментальной терапии наблюдали рост экспрессии гена в контроле и ее снижение в исследуемых группах – до 3,9 % в среднем при введении таргетного ингибитора киназы *EGFR* и до 1,8 % - при пятисуточном введении исследуемого соединения пиридинкарбоновой кислоты ЛХТ-17-19.

Полученные результаты могут говорить о том, что экспериментальное воздействие анти-*EGFR*-агентом эрлотинибом приводит к гибели *EGFR*-экспрессирующих опухолевых клеток, с чем связано торможение роста опухоли в течение первых 10 - 15 сут во время и после окончания терапии. Возобновление роста указывает на селекцию неэкспрессирующих опухолевых клонов в процессе опухолевого роста.

Экспериментальная терапия соединением ЛХТ-17-19 в дозе 3,7 мг/кг в сутки сопровождается еще более глубоким подавлением экспрессии гена эпидермального фактора роста – до 1,8 %, что может рассматриваться как доказательство наличия таргетной анти-*EGFR* активности в спектре противоопухолевого действия изучаемого соединения.

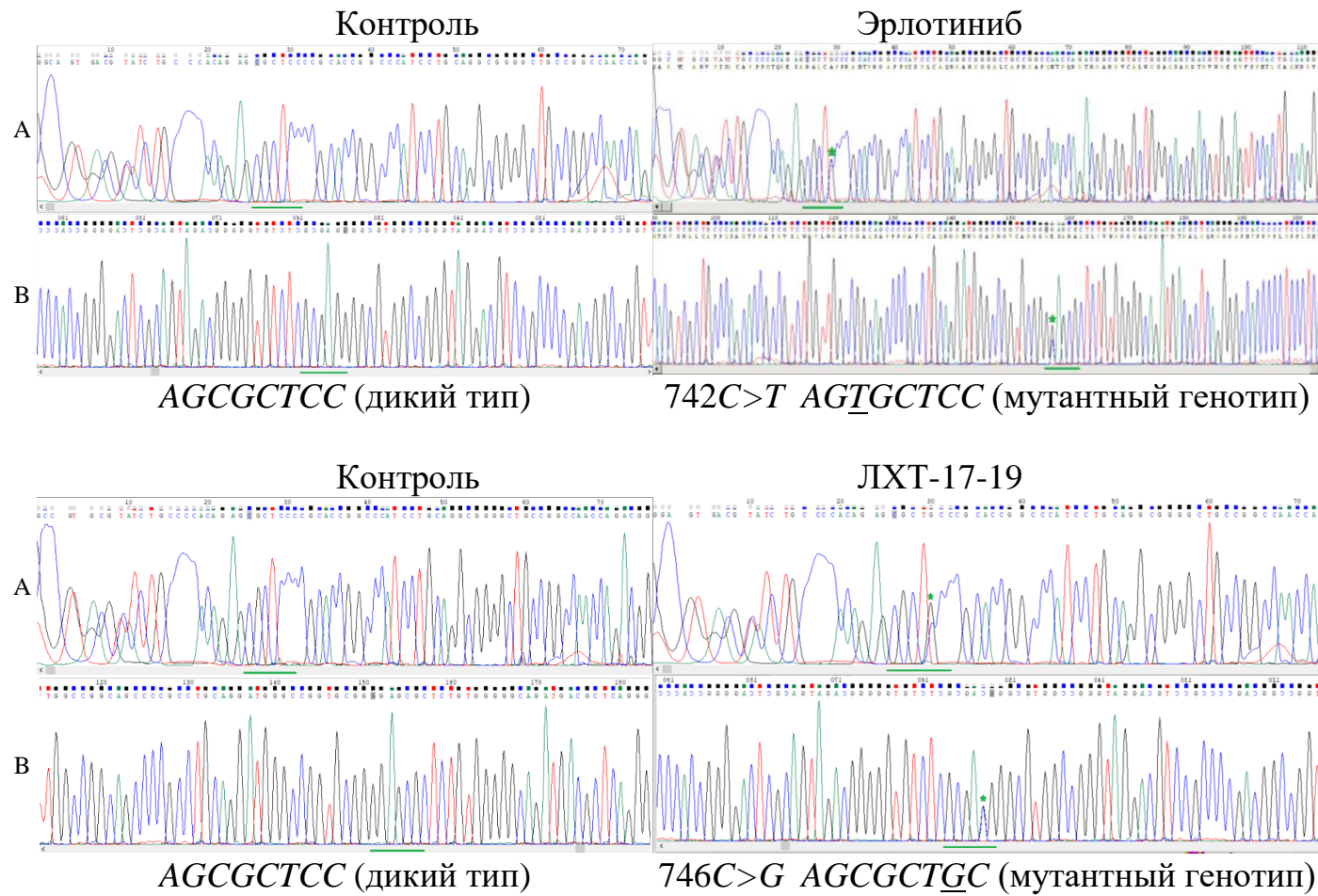


Рисунок 74 – Мутации в экзоне 3 гена *EGFR* ксенографта трижды негативного рецидивного рака молочной железы в зависимости от фармакологического воздействия (секвенирование по Sanger, rtPCR)

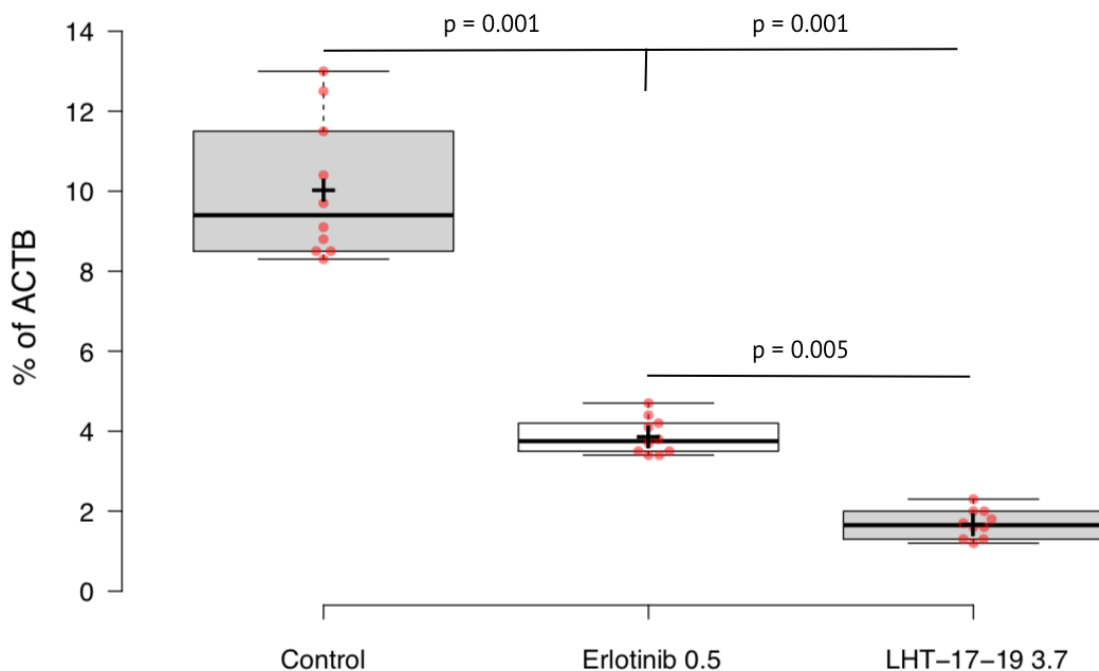


Рисунок 75 – Экспрессия гена *EGFR* клетками ксенографтного тройного негативного рецидивного рака молочной железы в зависимости от фармакологического воздействия (секвенирование по Sanger, rtPCR), ANOVA, критерий Тьюки

При анализе мутаций гена *EGFR* в клетках ксенографтного тройного негативного рецидивного рака молочной железы в зависимости от проведенного фармакологического воздействия получили следующие результаты (рисунки 74 и 76). Наибольшее число мутаций, сопровождающихся формированием опухолевой резистентности к таргетной фармакотерапии, связаны с заменой аминокислотных остатков в экзоне 3 гена *EGFR*, а также инсерциями, сопровождающимися сдвигом рамки считывания и нокаутом гена. Следовательно, накопление мутаций ведет к появлению резистентных клонов опухолевых клеток.

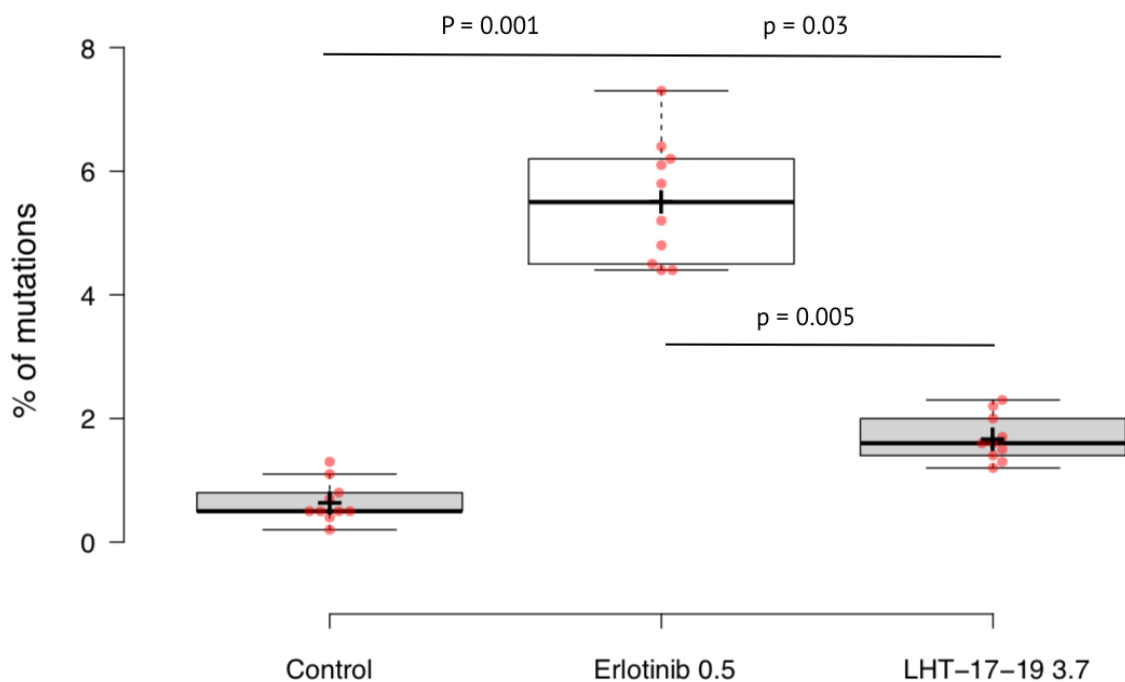


Рисунок 76 – Частота мутаций в кодоне 3 гена *EGFR* в клетках ксенографтного тройного негативного рецидивного рака молочной железы в зависимости от проведенного фармакологического воздействия, критерий Крускалла - Уолиса

В контроле частота мутаций в кодоне 3 гена *EGFR* в клетках ксенографтного тройного негативного рецидивного рака молочной железы не превышала в среднем 0,6 %. На фоне 5 сут курсового внутрижелудочного введения таргетного препарата сравнения эрлотиниба в виде химически чистой субстанции наблюдали значительный рост частоты мутаций – в среднем до 5,4 % ($p = 0,001$ при сравнении со значениями в контроле), тогда как на фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 хотя и наблюдался достоверный рост до 1,7 % ($p = 0,03$ при сравнении со значениями в контроле), тем не менее он был значимо ниже, чем в группе препарата сравнения ($p = 0,005$ при сравнении со значениями в группе препарата сравнения). Таким образом, курсовое внутривентральное введение производного дигидроакридина ЛХТ-17-19 в меньшей степени приводит к формированию мутантных вариантов гена *EGFR*, а следовательно, снижается

вероятность клональной трансформации опухоли в сторону развития вторичной резистентности.

8.3.2 Результаты эпигеномных исследований механизма действия соединения ЛХТ-17-19

В последние десятилетия человечество совершило большой шаг вперед в понимании биологической природы и молекулярных механизмов регуляции опухолевого роста. Внутриклеточная сигнализация опухолевой трансформации чрезвычайно разнообразна. Одним из элементов, непосредственно задействованных в этом процессе, является экспрессия так называемых некодирующих молекул РНК или микроРНК, которые тем не менее могут оказывать разнонаправленное влияние на клеточный гомеостаз. В частности, было показано, что при раке молочной железы, его тройном негативном варианте, важную роль в формировании лекарственной резистентности играют микроРНК-200 и микроРНК-145.

В своей работе мы провели анализ экспрессии указанных микроРНК в образцах опухолевой ткани, полученных у животных – носителей ксенографтной опухоли – в исследуемых группах. Результаты анализа представлены на рисунке 77.

Мы установили, что вне зависимости от экспериментальной группы экспрессия микроРНК-145 колеблется в диапазоне от 35 до 42 % и при межгрупповом сравнении значимо не меняется. В то же время экспрессия микроРНК-200а претерпевает существенные изменения в зависимости от исследуемой группы. Так, в контроле она равна в среднем 18 %. В группе мышей, получавших в качестве терапии препарат сравнения эрлотиниб, уровень экспрессии увеличивался более чем втрое – до 57 %. Экспрессия микроРНК-200а в группе ЛХТ-17-19 также росла, однако масштаб был не столь значительным.

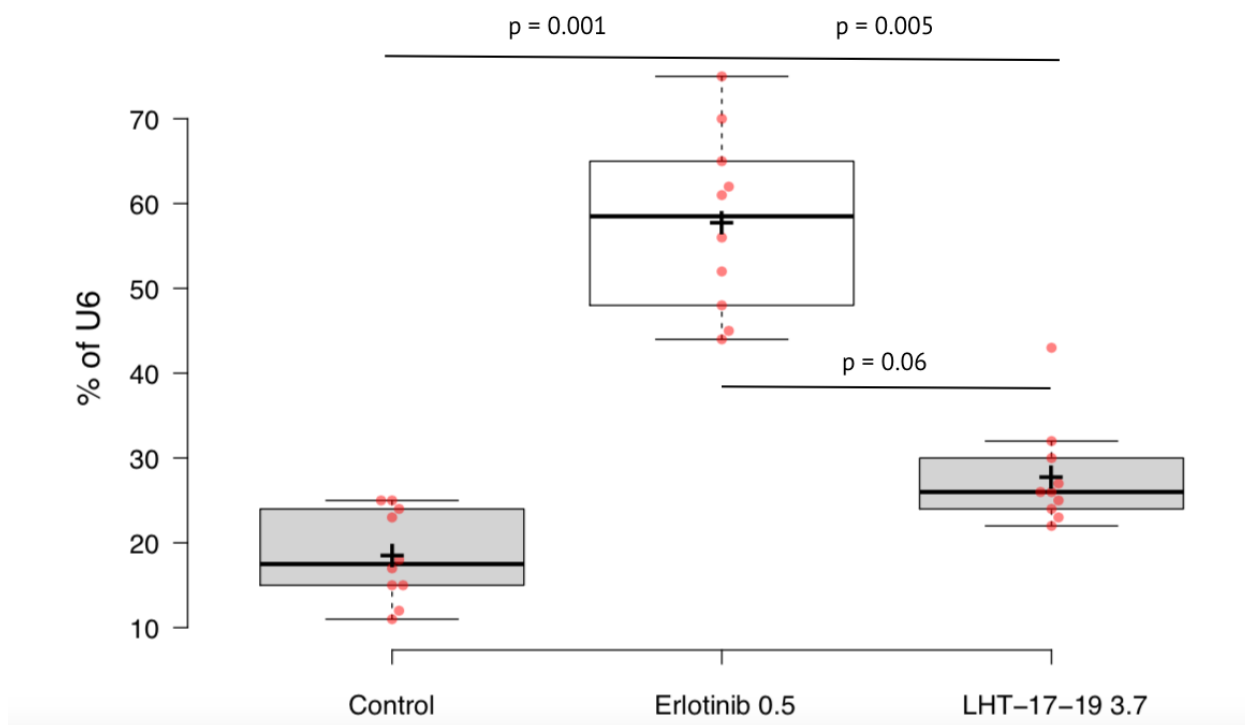


Рисунок 77 – Уровень экспрессии микроРНК-200а в клетках ксенографтного тройного негативного рецидивного рака молочной железы в зависимости от проведенного фармакологического воздействия, критерий Крускалла - Уолиса

Полученные результаты также доказывают роль микроРНК-200а в формировании резистентности рассматриваемого вида опухоли к таргетному анти-EGFR-воздействию эрлотинибом, что соответствует литературным данным. В то же время применение ЛХТ-17-19 в суточной дозе 3,7 мг/кг позволяет избежать активации данного механизма, что, безусловно, является обнадеживающим результатом с позиций возможности получения нового перспективного отечественного кандидата в лекарственные средства.

ГЛАВА 9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак молочной железы является одной из наиболее часто выявляемой формой злокачественных заболеваний (занимает первое место по распространенности у женщин): ежегодно в мире регистрируется около 1,3 млн. новых случаев заболевания и более 450 тыс. смертей от него [22]. Гистологическая классификация РМЖ основывается на его происхождении и локализации. Так, протоковые опухоли встречаются почти в 80 % случаев, лобулярные, формирующиеся в железистых дольках, занимают от 10 до 15 % в структуре опухолей. Другие формы регистрируются гораздо реже и в совокупности не превышают 10 -15 % в структуре заболеваемости [24]. При этом у пациенток с инвазивной протоковой опухолью наблюдаются высокая вовлеченность лимфатической системы в прогрессию заболеваемости и неблагоприятный прогноз по сравнению с менее часто встречающимися формами заболевания [25]. При стадировании опухоли широко используется система TNM, рекомендованная UICC и базирующаяся на анатомической распространенности первичного опухолевого узла, поражении лимфатического аппарата и наличии или отсутствии метастатического поражения. Оценка указанных параметров позволяет выделить 4 стадии развития заболевания [26].

Формирование РМЖ включает последовательную прогрессию через прохождение ряда промежуточных патологических процессов, начиная с дуктальной гиперпролиферации, эволюции в *carcinoma in situ* (CIS), инвазивную карциному и, наконец, метастазирующую опухоль [27]. Учитывая широкую вариабельность клинического течения и прогрессии РМЖ, определение маркеров, которые бы могли надежно отражать клиническое течение опухоли, представляется чрезвычайно важным обстоятельством при изучении природы РМЖ. Кроме того, идентификация молекулярных механизмов прогрессии РМЖ лежит в основе построения

современных лечебных технологий, выработки химиотерапевтических стратегий, детекции рецидивирования и метастазирования опухоли, прогнозирования выживаемости [28, 29].

Вместе с тем идентификация отдельных молекулярных механизмов, выявление внешних и внутренних обстоятельств развития опухоли представляются проблемой чрезвычайной актуальности, далекой от разрешения. Выделение и обоснование надежных маркеров, определяющих с одной стороны, клиническое течение и прогноз РМЖ, а с другой – ответ на те или иные фармакотерапевтические воздействия, в рамках отдельных клинических групп является тем более сложной задачей, поскольку вносит дополнительные лимитации в научно-клинический поиск.

Популяционные исследования, проводимые в мире и в нашей стране, показывают наличие как общемировых общих закономерностей развития и течения патологии, так и национальных, этнических, географических особенностей заболевания, в том числе ответа на специфическое лекарственное лечение. Во многом эти особенности определяются генетической и мутационной гетерогенностью РМЖ. Большую транснациональную проблему в последние десятилетия приобрел тройной негативный РМЖ, характеризующийся потерей мишеней для классической неoadьювантной и адьювантной химиотерапии. Большую актуальность рассматриваемая проблема имеет для Республики Мордовия – субъекта Российской Федерации, входящего в Приволжский федеральный округ.

В этой связи мы поставили перед собой цель на основании комплексного эпидемиологического, экспериментально-фармакологического и молекулярно-морфологического исследования обосновать перспективные направления преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы на примере коренной популяции Республики Мордовия.

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 являющиеся максимально адекватными измерителями народного благополучия. Проведенный анализ динамики демографических процессов в Республике Мордовия показал, что за последние годы демографическая ситуация характеризуется снижением численности ее населения, 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 [276].

На протяжении последнего десятилетия 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 чел. на 100 тыс. чел. населения в 2011 году до 528,9 чел. в 2020 году, при этом в Российской Федерации за этот же период отмечался рост показателя с 336,7 до 376,3 чел. на 100 тыс. чел. населения. Также наблюдается значительное ускорение как темпов роста, так и прироста показателя за период с 2015 по 2020 годы [276]. Полученные результаты говорят о том, что при неизменном уровне общей заболеваемости онкологическими болезнями произошел существенный рост первичной заболеваемости, свидетельствующий не столько об истинном росте числа 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, в регионе коэффициенты, характеризующие динамику явления, соответствуют общероссийским закономерностям [276]. В национальной структуре среднегодовой выявляемости рака молочной железы преобладали представительницы русской национальной группы, на втором месте – представительницы мордовской национальной группы, на третьем – татарской. На долю представительниц прочих национальностей и народностей приходилось 13,9 %, что соотносится с общей национальной структурой популяции Республики Мордовия [276]. В структуре патоморфологической формы рака молочной железы представительниц коренных национальных групп установлено следующее соотношение: на долю протоковой карциномы приходится 8,7 %, дольковой карциномы – 11,6 %, инфильтрирующей протоковой карциномы – 58,8 %, инфильтрирующей лобулярной карциномы – 5,4 %, медуллярной карциномы – 2,8 %, рака молочной железы с признаками воспаления – 12,7 %. Показатели рассчитаны как усредненные за период с 2011 по 2020 год [276].

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-й фармакотерапевтических групп для лечения пациенток с I–II стадиями, с III и IV стадиями болезни соответственно. Группы представлены 47, 87 и 91 наименованием 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 [276].

Полногеномное секвенирование образцов ТН РМЖ пациенток – жительниц региона за период с 2019 по 2022 год 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 детальной 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 тройного негативного РМЖ к представителям основных классов лекарственных веществ, применяющихся для лечения – адъювантной и неадъювантной терапии заболевания в клинической практике: представителю препаратов платины – цисплатину, антрациклиновых антибиотиков – доксорубицину, алкалоидов – паклитакселу, таргетных препаратов – эрлотинибу.

Для определения роли обратного транспорта молекул противоопухолевых препаратов – цисплатина, доксорубицина, тамоксифена

и эрлотиниба использовали две клеточные линии тройного негативного РМЖ человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (НТВ-26), АТСС, США), а другая не экспрессирует протеин обратного транспорта рака молочной железы BCRP (BT20, АТСС, США) чувствительна ко всем описанным выше веществам.

При анализе результатов тестирования мы установили, что сила цитотоксического действия исследуемых веществ на молекулярно подобных культурах тройного 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 доксорубицину и паклитакселу тройного негативного РМЖ может быть обусловлена обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества.

В многочисленных исследованиях было установлено, что мутации гена *BRCA1* встречаются в до 80 % случаев химиорезистентного РМЖ и рака яичников [313]. *BRCA1* взаимодействует как с активаторами, так и с 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 его запуску даже на фоне имеющегося повреждения клеточной ДНК [314]. 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 (АТСС, США) и соответственно HCC1937/^{WT}*BRCA1*. Мы установили, что подавление роста опухолевых

клеток в указанных культурах статистически значимо различалось: если в культуре мутантной опухоли по гену *BRCA1* наблюдали практически полное ингибирование роста, то в реконститутивном штамме культуры РМЖ НСС1937/^{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 существуют различия в экспрессии 172 генов, а также определили, что большее число генов, по литературным данным, участвующее в формировании химиорезистентности РМЖ к препаратам платины, модулируются геном *BRCA1*. В частности, мутантная линия РМЖ НСС1937 отличается гиперэкспрессией *RAD52* и *XRCC4* мРНК, и подавлением экспрессии *ERCC1* и *RRM1* при сравнении с линией НСС1937/^{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 тройного негативного РМЖ к препаратам платиновой группы.

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 [322]. 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 тройного 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 тройного негативного РМЖ MDA-MB-231, нечувствительной к эрлотинибу была значительно выше таковой для культуры сравнения. Таким образом, можно заключить, что в формировании резистентности тройного негативного РМЖ к таргетному препарату эрлотинибу задействован сигнальный путь, опосредованный микроРНК Let-7.

Подводя итог описанного раздела работы, можно с уверенностью утверждать, что в формировании химиорезистентности тройного негативного РМЖ могут быть задействованы различные механизмы. В частности, мы установили, что нечувствительность опухолевых клеток к антрациклиновому антибиотику доксорубицину 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 сигнального пути, опосредованного микроРНК Let-7.

В настоящем исследовании исходя из главной цели по разработке стратегии преодоления первичной и вторичной химиорезистентности рецидивной и метастатической тройного негативной карциномы молочной железы показано, что производные пиридинкарбоновых кислот могут выступать как потенциальная фармакотерапевтическая альтернатива для

существующих в настоящее время подходов к консервативному лечению заболевания [273, 323].

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 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. В зависимости от химической структуры и растворимости в воде или липидных эмульсиях им присуща различная биодоступность при введении внутрь, что отражается 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, ЛХТ-15-19 и ЛХТ-13-19 [337].

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 воздействия 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 [335].

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 моделей *in vitro* использовали три культуры человеческих эпителиальных опухолей – культуру рака толстого кишечника HT29, культуру 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 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 [329, 330].

Для предварительного обоснования противоопухолевой активности у отобранных на предыдущем этапе нашего исследования соединений ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19 и определения диапазона терапевтических доз была выбрана модель сингенной опухоли мышей – лимфолейкоза Р388 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. В исследовании на мышах DBA₂ × C57Bl/6j с перевитым сингенным лимфолейкозом Р388 наши предположения нашли научно - доказанное подтверждение.

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 тройного негативного рака молочной железы.

Сила цитотоксического действия исследуемых веществ на молекулярно подобных культурах тройного негативного РМЖ человека, имеющих различия, обусловленные экспрессией VCRP-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 показаны наличие первичной резистентности к веществу ЛХТ-13-17 и отсутствие резистентности тройного негативного РМЖ к соединениям ЛХТ-17-19 и АХ-554, что обусловлено обратным VCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества. 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 [329, 330].

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 тройного 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. Также выбор метода был обусловлен тем, что ранее в нашей лаборатории была разработана аналитическая методика определения действующего вещества АХ-554 в плазме крови [273].

В процессе формирования вторичной резистентности клеток тройного негативного РМЖ к АХ-554 происходит активация обратного транспорта молекул соединения, о чем свидетельствует рост концентрации вещества в среде культивирования после отмывки трехмерной культуры. В тех же экспериментальных условиях вторичная резистентность к ЛХТ-17-19 хотя и формируется, но при этом не наблюдается эффлюкс молекул в среду. Это

говорит о том, что в данном случае могут быть задействованы иные механизмы, не связанные с обратным транспортом [329].

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 [336].

При формировании вторичной резистентности органоидных культур к производному АХ-554 формируется вторичная резистентность клеток тройного 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 тройного негативного РМЖ. Это позволяет рассматривать именно соединение ЛХТ-17-19 в качестве наиболее перспективного кандидата 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 М. Ю. Кудрявцевым и д. м. н. Е. А. Самышиной мы

провели эксперименты по молекулярному докингу [273,323].

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 значениям для препаратов сравнения (иматиниб, эрлотиниб, пеметрексед, доксорубицин). 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 [273, 323]. Следовательно, с учетом данных эпидемиологического исследования экспрессии *EGFR* ТН РМЖ представителей коренной популяции Республики Мордовия именно эта молекула может служить наиболее вероятной мишенью для фармакологического таргетирования .

На предыдущих этапах нашего исследования мы установили, что производные пиридинкарбоновых кислот, и в частности, соединение дигидроакридина ЛХТ-17-19, в экспериментах по молекулярному докингу продемонстрировали высокое ингибиторное сродство к активному сайту связывания EGFR; в культурах клеток тройного 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 выдвинутого предположения, а также получения доказательств эффективности ЛХТ-17-19 мы провели исследование вещества при курсовом внутривенном

введении на ксенографтной модели рецидивного тройного негативного рака молочной железы представительницы коренного этноса Республики Мордовия .

Для формирования базовой модели воспользовались методом, описанным Powell с соавт., в нашей модификации, отработанной и валидированной для неоплазий легких и мочевого пузыря [270, 332 - 335]. Мы установили, что 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. Полученные результаты свидетельствуют о том, что таргетирование *EGFR*-зависимого сигнального пути в клетках ксенографтной опухоли может рассматриваться как эффективная стратегия повышения выживаемости.

9.1 Итоги выполнения диссертационного исследования

Таким образом, комплексное мультидисциплинарное изучение проблемы фармакорезистентности тройного 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, которое при курсовом внутрибрюшинном введении показало противоопухолевую активность на ксенографтной модели тройного 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.

9.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования

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 возможны углубленное проведение доклинических исследований, разработка приемлемой лекарственной формы, аналитической методики определения действующего вещества в плазме крови, других биологических жидкостях и тканях.

ВЫВОДЫ

1. Низкая экономическая эффективность терапии рецидивных форм и высоких стадий развития рака молочной железы, установленная при проведении фармакоэкономического анализа лечения пациенток – представительниц коренных этнических групп Республики Мордовия, обусловлена нерациональным применением лекарственных препаратов без учета молекулярного и иммунофенотипа опухоли.

2. При проведении культурального и молекулярно-генетического исследования показано, что в формировании первичной резистентности клеток тройного негативного рака молочной железы к средствам 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 внутрибрюшинном) 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 умеренно токсичным 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. 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.

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 внутрибрюшинном 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-метоксибензо[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(2Н)-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. Установлено противоопухолевое и антиметастатическое действие ЛХТ-17-19 как кандидата в антибластномное лекарственное средство на разработанной платформе ксенографтного тройного негативного рака молочной железы представительницы коренной нации Республики Мордовия для персонализированной трансляционной медицины и фундаментальных патоморфологических и фармакологических исследований у гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu*. 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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты исследования должны учитываться при анализе популяционных, патоморфологических и фармако - эпидемиологических особенностей тройного 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 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.

4. Полученные результаты об острой токсичности, особенностях 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественные новообразования

ИГХ – иммуногистохимический метод

ИФА - иммуноферментный анализ

ЛД – летальная доза

НЭК – низкая экспрессия клаудина

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТН – тройной негативный

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshi et al. // *Int. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 136(5). – P. E359-386.
2. WHO Factsheet. (2017). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
3. Howlader, N. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status / N. Howlader // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* – 2014. – Vol. 106. – dju055.
4. Foulkes, W.D. Triple-negative breast cancer / W.D. Foulkes, I.E. Smith, J.S. Reis-Filho // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 1938-1948.
5. Carey, L.A. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes / L.A. Carey // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 13. – P. 2329-2334.
6. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes / G. von Minckwitz et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 30. – P. 1796-1804.
7. Liedtke, C. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer / C. Liedtke // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 1275-1281.
8. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease / G. Bianchini, J.M. Balko, I.A. Mayer et al. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 13. – P. 674-690.
9. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC) / E.A. O'Reilly et al. // *BBA Clin.* – 2015. – Vol. 3. – P. 257-275.
10. Harnessing connectivity in a large-scale small-molecule sensitivity dataset / B. Seashore-Ludlow et al. // *Cancer Discov.* – 2015. – Vol. 5. – P. 1210-1223.

11. Ben-David, U. Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities / U. Ben-David, R. Beroukhi, T.R. Golub // *Nat. Rev. Cancer.* – 2019. – Vol. 19. – P. 97-109.

12. Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state / G.V. Echeverria et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2019. – Vol. 11. – eaav0936.

13. Tumor mutational profile of triple negative breast cancer patients in Thailand revealed distinctive genetic alteration in chromatin remodeling gene / S. Niyomnaitham et al. // *Peer J.* – 2019. – Vol. 7. – e6501.

14. Garrido-Castro, A.C. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment / A.C. Garrido-Castro, N.U. Lin, K. Polyak // *Cancer Discov.* – 2019. – Vol. 9. – P. 176-198.

15. Drug resistance profiling of a new triple negative breast cancer patient-derived xenograft model / M.D. Matossian, H.E. Burks, S. Elliott // *BMC Cancer.* – 2019. – Vol. 19(1). – ID205.

16. Zeichner, S.B. A review of systemic treatment in metastatic triple-negative breast cancer / S.B. Zeichner, H. Terawaki, K. Gogineni // *Breast Cancer.* – 2016. – Vol. 10. – P. 25-36.

17. Изучение фармакологической активности производного аминохромена при лечении рака молочной железы (экспериментальное исследование) / О.Н. Дерябина, Е.В. Блинова, Е.А. Самышина и др. // *Вестник «Биомедицина и социология».* – 2021. – Т. 6, № 2. – С. 12-19.

18. 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 / E. Blinova, E. Samishina, O. Deryabina et al. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – Vol. 2(11). – P. 1-18.

19. 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.

20. Изучение фармакологической активности ЛХТ-17-19 в культурах клеток эпителиальных опухолей, экспрессирующих EGFR / М.Ю. Кудрявцев, О.М. Тумутолова, О.Н. Дерябина, А.А. Епишкина, О.С. Вавилова, Ю.С. Гилевская, Е.В. Блинова // Вестник «Биомедицина и социология». 2022. – Т.7, № 3. – С. 70-74.

21. 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.

22. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours / Cancer Genome Atlas Network // Nature. – 2012.– Vol. 490. –No. 7418. –P. 61-70.

23. 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.

24. Vargo-Gogola, T. Modelling breast cancer: one size does not fit all / T. Vargo-Gogola and, J.M. Rosen // Nature Reviews Cancer. – 2017. – Vol. 7. – No. 9. – P. 659-672.

25. Ketterhagen, J.P. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast / J.P. Ketterhagen, S.R. Quackenbusch, and R.A. Haushalter // Surgery Gynecology and Obstetrics. – 1984. –Vol. 158. – No. 2. – P. 120-123.

26. Sobin, L. TNM classification for esophagus cancer / L. Sobin and C. Wittekind // Hepato-Gastro. – 2007. – Vol. 14. – No. 6. – P. 491-492.

27. Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution / K. Polyak // *Journal of Clinical Investigation*. – 2017. – Vol. 117. – No. 11. – P. 3155-3163.
28. Matos, L.L.M. Maria aparecida da silva tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais / L. L. M. Matos, N. S. Leandro, M. B. Maurício, and M. P. Roberta // *Arquivos Médicos Do ABC*. – 2015. – Vol. 30. – P.7.
29. Pacheco, F. A. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para uma terapia biológica / F. A. Pacheco, M. E. M. Paschoal, and M. G. C. Carvalho // *Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. – 2012. – Vol. 28. – P. 7.
30. Mishra, A. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? / A. Mishra and M. Verma // *Cancers*. – 2010. – Vol. 2. – No. 1. – P. 190-208.
31. Ventura, A. C. Genetic determinants of aggressive breast cancer / A. C. Ventura and S. D. Merajver // *Annual Review of Medicine*. – 2008. – Vol. 59. – P. 199-212.
32. Sotiriou, C. Gene-expression signatures in breast cancer / C. Sotiriou and L. Pusztai // *The New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 360. – No. 8. – P. 752-800.
33. Weigelt, B. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry / B. Weigelt and J. S. Reis-Filho // *Breast Cancer Research*. – 2016. – Vol. 12. – No. 4, article S5.
34. van Beers E. H. Array-CGH and breast cancer / E. H. van Beers and P. M. Nederlof // *Breast Cancer Research*. – 2016. – Vol.6. – No. 3, article 210.
35. Hondermarck, H. Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling / H. Hondermarck, A.-S. Vercoutter-Edouart, F. Révillion et al. // *Proteomics*. – 2011. – Vol. 1. – No. 10. – P. 1216-1232.
36. Piccart-Gebhart, M. J. New developments in hormone receptor-positive disease / M. J. Piccart-Gebhart // *The oncologist*. – 2011. – Vol. 16. – P. 40-50.

37. Haslam, S.Z. The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones / S.Z. Haslam // *Endocrinology*. – 1989. – Vol. 125. – No. 5. – P. 2766-2772.
38. Rosen, P. P. Adenomyoepithelioma of the breast / P. P. Rosen // *Human Pathology*. – 1987. – Vol. 18. – No. 12. – P. 1232-1237.
39. Althuis, M. D. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature / M. D. Althuis, J. H. Fergenbaum, M. Garcia-Closas, L. A. Brinton, M. P. Madigan, and M. E. Sherman // *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. – 2014. – Vol. 13. – No. 10. – P. 1558-1568.
40. Yoo, K.-Y. Postmenopausal obesity as a breast cancer risk factor according to estrogen and progesterone receptor status (Japan) / K.-Y. Yoo, K. Tajima, S.-K. Park et al. // *Cancer Letters*. – 2011. – Vol. 167. – No. 1. – P. 57-63.
41. Manjer, J. Smoking associated with hormone receptor negative breast cancer / J. Manjer, J. Malina, G. Berglund, L. Bondeson, J. P. Garne, and L. Janzon // *International Journal of Cancer*. – 2010. – Vol. 91. – P. 580.
42. Jensen, E. V. The estrogen receptor: a model for molecular medicine / E. V. Jensen and V. C. Jordan // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – Vol. 9. – No. 6. – P. 1980-1989.
43. Fisher, B. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study / B. Fisher, J. P. Costantino, D. L. Wickerham et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1998. – Vol. 90. – No. 18. – P. 1371-1388.
44. Cote, R. J. T. C.R.: immunohistochemical detection of steroid hormone receptors / R. J. T. Cote; in *Immunomicroscopy: A diagnostic Tool For the surgical pathologist*, W. B. Saunders, Ed., Philadelphia, Pa, USA, 1994.
45. Harvey, J. M. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer / J. M. Harvey, G. M. Clark, C. K. Osborne, and D. C. Allred // *Journal of Clinical Oncology*. – 1999. – Vol. 17. – No. 5. – P. 1474-1481.

46. Wittliff, J. L. Steroid hormone receptors in breast cancer / J. L. Wittliff //Cancer. – 1984. – Vol. 53. – No. 3. – P. 630-643.
47. Eisenberg, A. L. A. Cancer de mama: marcadores tumorais / A. L. A. Eisenberg and S. Koifman // Revista Brasileira De Cancerologia. – 2001. – Vol. 47. – P. 11.
48. Slamon, D. J. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene / D. J. Slamon, G. M. Clark, and S. G. Wong //Science. – 1987. – Vol. 235. – No. 4785. – P. 177-182.
49. Barnes, D. M. C-erbB-2 amplification in mammary-carcinoma / D. M. Barnes //Journal of Cellular Biochemistry. – 2003. – Vol. 17. – P. 132-138.
50. Yamamoto, T. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor / T. Yamamoto, S. Ikawa, and T. Akiyama //Nature. – 1986. – Vol. 319. – No. 6050. – P. 230-234.
51. Citri, A. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3 / A. Citri, K. B. Skaria, and Y. Yarden //Experimental Cell Research. – 2013. – Vol. 284. – No. 1. – P. 54-65.
52. Lonardo, F. The normal erbB- 2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand / F. Lonardo, E. Di Marco, C. R. King et al.// New Biologist. – 1990. – Vol. 2. – No. 11. – P. 992-1003.
53. Slamon, D. J. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 / D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak et al.// The New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 344. – No. 11. – P. 783-792.
54. Molina, M. A. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti- HER2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER2 ectodomain cleavage in breast cancer cells / M. A. Molina, J. Codony-Servat, J. Albanell, F. Rojo, J. Arribas, and J. Baselga //Cancer Research. – 2001. – Vol. 61. – No. 12. – P. 4744-4749.

55. Hudis, C. A. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice / C. A. Hudis //The New England Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 357. – No. 1. – P. 39-51.

56. Johnston, S.R.D.Lapatinib:anovelEGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer / S.R.D.JohnstonandA.Leary //Drugs of Today. – 2012. – Vol. 42. – No. 7. – P. 441-453.

57. Narita, T. C-erbB-2 protein in the sera of breast cancer patients / T. Narita, H. Funahashi, Y. Satoh, and H. Takagi //Breast Cancer Research and Treatment. – 2002. – Vol. 24. – No. 2. – P. 97-102.

58. Bramwell, V. H. C. Changes over time of extracellular domain of HER2 (ECD/HER2) serum levels have prognostic value in metastatic breast cancer / V. H. C. Bramwell, G. S. Doig, A. B. Tuck et al. //Breast Cancer Research and Treatment. – 2009. – Vol. 114. – No. 3. – P. 503-511.

59. Tan, L.-D. Serum HER2 level measured by dot blot: a valid and inexpensive assay for monitoring breast cancer progression / L.-D. Tan, Y.-Y. Xu, Y. Yu, X.-Q. Li, Y. Chen, and Y.-M. Feng// PLoS ONE. – 2016. – Vol. 6. – No. 4, Article ID e18764.

60. Dent, R. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence / R. Dent, M. Trudeau, K. I. Pritchard et al. //Clinical Cancer Research. – 2017. – Vol. 13. – No. 15. – P. 4429-4434.

61. Cadoo, K. A. Advances in molecular and clinical subtyping of breast cancer and their implications for therapy / K. A. Cadoo, T. A. Traina, and T. A. King //Surgical Oncology Clinics of North America. – 2013. – Vol. 22. – P. 823-834.

62. Cho, E. Y. Potential candidate biomarkers for heterogeneity in triple-negative breast cancer (TNBC) / E. Y. Cho, M. H. Chang, Y. L. Choi et al. //Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 2014. – Vol. 68. – No. 3. – P. 753-761.

63. Sørli, T. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets / T. Sørli, R. Tibshirani, J. Parker et al. //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – Vol. 110. – No. 14. – P. 8418-8423.
64. Gerdes, J. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 / J. Gerdes, H. Lemke, and H. Baisch //Journal of Immunology. – 194. – Vol. 133. – No. 4. – P. 1710-1715.
65. Reyal, F. Respective prognostic value of genomic grade and histological proliferation markers in early stage (pN0) breast carcinoma / F. Reyal, M. A. Bollet, M. Caly et al. //PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – No. 4, Article ID e35184.
66. Vielh, P. Ki-67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors / P. Vielh, S. Chevillard, V. Mosseri, B. Donatini, and H. Magdelenat //American Journal of Clinical Pathology. – 1990. – Vol. 94. – No. 6. – P. 681-686.
67. Sørli, T. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms / T. Sørli, Y. Wang, C. Xiao et al.// BMC Genomics. – 2016. – Vol. 7, article 127.
68. Patil, A. V. Ki-67 biomarker in breast cancer of Indian women / A. V. Patil, R. Singhai, R. S. Bhamre, and V. W. Patil //North American Journal of Medical Sciences. – 2011. – Vol. 3. – No. 3. – P. 119-128.
69. Tawfik, K. Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant / K. Tawfik, B. F. Kimler, M. K. Davis, F. Fan, and O. Tawfik //Human Pathology. – 2013. – Vol. 44. – No. 1. – P. 39-46.
70. Luporsi, E. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical

review / E. Luporsi, F. André, F. Spyrtos et al. // Breast Cancer Research and Treatment. – 2012. – Vol. 132. – No. 3. – P. 895-915.

71. Hussain, S. P. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis / S. P. Hussain and C. C. Harris // Journal of Nippon Medical School. – 2006. – Vol. 73. – No. 2. – P. 154-164.

72. Sørlie, T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sørlie, C. M. Perou, R. Tibshirani et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Vol. 108. – No. 19. – P. 10869-10874.

73. Allred, D. C. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer / D. C. Allred, G. M. Clark, R. Elledge et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 1993. – Vol. 85. – No. 3. – P. 200-206.

74. Dumay, A. Distinct *tumor protein p53* mutants in breast cancer subgroups / A. Dumay, J. P. Feugeas, E. Wittmer, J. Lehmann-Che, P. Bertheau, M. Espie et al. // International Journal of Cancer. – 2013. – Vol. 132. – No. 5. – P. 1227-1231.

75. Elledge, R. M. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer / R. M. Elledge, G. M. Clark, S. A. W. Fuqua, Y.-Y. Yu, and D. C. Allred // Cancer Research. – 1994. – Vol. 54. – No. 14. – P. 3752-3757.

76. Lacroix, M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells / M. Lacroix // Endocrine-Related Cancer. – 2016. – Vol. 13. – No. 4. – P. 1033-1067.

77. Vizcarra, E. Value of CA-15-3 in breast cancer and comparison with CEA and TPA: a study of specificity in disease-free follow-up patients and sensitivity in patients at diagnosis of the first metastasis / E. Vizcarra, A. Lluch, R. Cibría et al. // Breast Cancer Research and Treatment. – 2006. – Vol. 47. – No. 3. – P. 209-216.

78. Geraghty, J. G. Ca-15-3 in patients with locoregional and metastatic breast-carcinoma / J. G. Geraghty, E. C. Coveney, F. Sherry, N. J. Ohiggins, and M. J. Duffy //Cancer. – 1992. – Vol. 70. – P. 2831.

79. Ebeling, F. G. Serum CEA and CA 15- 3 as prognostic factors in primary breast cancer / F. G. Ebeling, P. Stieber, M. Untch et al. // British Journal of Cancer. – 2012. – Vol. 86. – No. 8. – P. 1217-1222.

80. Thompson, J. A. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives / J. A. Thompson, F. Grunert, and W. Zimmermann //Journal of Clinical Laboratory Analysis. – 2001. – Vol.15. – No. 5. – P. 344-366.

81. Molina, R. Prospective evaluation of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) in patients with primary locoregional breast cancer / R. Molina, J. M. Auge, B. Farrus et al.// Clinical Chemistry. – 2010. – Vol. 56. – No. 7. – P. 1148-1157.

82. Uehara, M. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer / M. Uehara, T. Kinoshita, T. Hojo, S. Akashi-Tanaka, E. Iwamoto, and T. Fukutomi //International Journal of Clinical Oncology. – 2008. – Vol. 13. – No.5. – P. 447-451.

83. Thathiah, A. MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17 / A. Thathiah and D. D. Carson //Biochemical Journal. – 2014. – Vol. 382. – No. 1. – P. 363-373.

84. Hattrup, C. L. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins / C. L. Hattrup and S. J. Gendler //Annual Review of Physiology. – 2008. – Vol. 70. – P. 431-457.

85. Duffy, M. J. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer / M. J. Duffy, S. Shering, F. Sherry, E. McDermott, and N. O'Higgins //International Journal of Biological Markers. – 2010. – Vol. 15. – No. 4. – P. 330-333.

86. Sandri, M. T. Prognostic role of CA15.3 in 7942 patients with operable breast cancer / M. T. Sandri, M. Salvatici, E. Botteri et al. //Breast Cancer Research and Treatment. – 2012. – Vol. 132. – No. 1. – P. 317-326.

87. Mendes, G. A. Utilização dos marcadores CA-15.3 e CEA no seguimento de pacientes com neoplasia mamária / G. A. Mendes, F. C. R. Sturmer, and D. L. Basegio //NewsLab. – 2017. – Vol. 109. – P. 7.

88. Jager, W. Serial CEA and CA 15-3 measurements during follow-up of breast cancer patients / W. Jager, K. Eibner, B. Loffler, S. Gleixner, and S. Kramer // Anticancer Research. – 2010. – Vol. 20. – No. 6. – P. 5179-5182.

89. Welch, P. L. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 / P. L. Welch, K. N. Owens, and M.-C. King // Trends in Genetics. – 2010. – Vol. 26. – No. 2. – P. 69-74.

90. Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2 / A. R. Venkitaraman // Cell. – 2012. – Vol. 108. – No. 2. – P. 171-182.

91. Bertwistle, D. Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes / D. Bertwistle and A. Ashworth // Current Opinion in Genetics and Development. – 2008. – Vol. 8. – No. 1. – P. 14-20.

92. Rahman, N. The genetics of breast cancer susceptibility / N. Rahman and M. R. Stratton // Annual Review of Genetics. – 2008. – Vol. 32. – No. 12. – P. 95-121.

93. Shapira, I. Does maternal Or paternal inheritance of BRCA Mutation Affect the Age of Cancer Diagnosis? / I. Shapira, R. J. Gralla, M. Akerman, L. R. Weiselberg, V. S. John, H. Raftopoulos et al; in Meeting ASCOA, Texas, 2011.

94. Senst, N. Parental origin of mutation and the risk of breast cancer in a prospective study of women with a *BRCA1* or *BRCA2* mutation / N. Senst, M. Llacuachqui, J. Lubinski, H. Lynch, S. Armel, S. Neuhausen et al. // Clinical Genetics. – 2013. – Vol. 84. – No. 1. – P. 43-46.

95. Ikeda, N. Frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese breast cancer families / N. Ikeda, Y. Miyoshi, K. Yoneda, E. Shiba, Y. Sekihara, M. Kinoshita et al. //International Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 91. – No. 1. – P. 83-88.
96. Robson, M.E. Treatment of hereditary breast cancer / M.E. Robson Seminars in Oncology. – 2007. – Vol. 34. – No. 5. – P. 384-391.
97. Schwartz, G. F. Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007 / G. F. Schwartz, K. S. Hughes, H. T. Lynch et al. //Cancer. – 2008. – Vol. 113. – No. 10. – P. 2627-2637.
98. Vanstone, M. Recognizing BRCA gene mutation risk subsequent to breast cancer diagnosis in southwestern Ontario / M. Vanstone, W. Chow, L. Lester, P. Ainsworth, J. Nisker, and M. Brackstone //Canadian Family Physician. – 2012. – Vol. 58. – No. 5. – P. E258–E266.
99. Rebbeck, T.R. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: the PROSE study group / T.R. Rebbeck, T. Friebel, H.T. Lynch et al // Journal of Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32. – No. 6. – P. 1055-1062.
100. Apostolou, P. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes / P. Apostolou and F. Fostira //BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013, Article ID 747318.
101. Moldovan, G.-L. PCNA, the maestro of the replication fork / G.-L. Moldovan, B. Pfander, and S. Jentsch //Cell. – 2007. – Vol. 129. – No. 4. – P. 665-679.
102. Bravo, R. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites / R. Bravo and H. Macdonald-Bravo //The Journal of Cell Biology. – 1987. – Vol. 105. – No. 4. – P. 1549-1554.

103. Elston, C. W. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up / C. W. Elston and I. O. Ellis //Histopathology. – 2001. – Vol.29. – No. 5. – P. 403-410.

104. Zhao, H. Interaction of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) with c-Abl in cell proliferation and response to DNA damages in breast cancer / H. Zhao, P.-C. Ho, Y.-H. Lo et al. //PLoS ONE. – 2017. – Vol. 7. – No. 1, Article ID e29416.

105. Zhao, H. Targeting tyrosine phosphorylation of PCNA inhibits prostate cancer growth / H. Zhao, Y.-H. Lo, L. Ma et al. //Molecular Cancer Therapeutics. – 2011. – Vol. 10. – No. 1. – P. 29-36.

106. Aoki, M. N. Caveolin involvement and modulation in breast cancer / M. N. Aoki, M. K. Amarante, J. M. M. Oda, and M. A. E. Watanabe //Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 11. – No. 13. – P. 1143-1152.

107. Hnasko,R. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease / R. Hnasko and M. P. Lisanti //Molecular Interventions. – 2013. – Vol. 3. – No. 8. – P. 445-464.

108. Elsheikh, S. E. Caveolin 1 and caveolin 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotyped / S. E. Elsheikh, A. R. Green, E. A. Rakha et al. //British Journal of Cancer. – 2008. – Vol. 99. – No. 2. – P. 327-334.

109. Karam, J. A. Caveolin-I overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence / J. A. Karam, Y. Lotan, C. G. Roehrborn, R. Ashfaq, P. I. Karakiewicz, and S. F. Shariat //Prostate. – 2013. – Vol. 67. – No. 6. – P. 614-622.

110. Ho, C.-C.Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy / C.-C.Ho,S.-H.Kuo,P.-H.Huang,H.-Y.Huang,andC.-H.Yang //Lung Cancer. – 2008. – Vol. 59. – No. 1. – P. 105-110.

111. Barresi, V. Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinicopathological correlations / V. Barresi, S. Cerasoli, G. Paioli et al. // *Acta Neuropathologica*. – 2016. – Vol. 112. – No. 5. – P. 617-626.

112. Kucia, M. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis / M. Kucia, R. Reza, K. Miekus et al. // *Stem Cells*. – 2015. – Vol. 23. – No. 7. – P. 879-894.

113. Muller, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis / A. Muller, B. Homey, H. Soto et al. // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – No. 6824. – P. 50-56.

114. Mukherjee, D. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis / D. Mukherjee and J. Zhao // *American Journal of Cancer Research*. – 2013. – Vol. 3. – No. 1. – P. 46-57.

115. Schioppa, T. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia / T. Schioppa, B. Uranchimeg, A. Sacconi et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2003. – Vol. 198. – No. 9. – P. 1391-1402.

116. Kang, H. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells *in vitro*, and its association with prognosis and survival in human breast cancer / H. Kang, G. Watkins, C. Parr, A. Douglas-Jones, R. E. Mansel, and W. G. Jiang // *Breast Cancer Research*. – 2015. – Vol. 17. – No. 4. – R402-R410.

117. Chu, Q. D. High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome / Q. D. Chu, L. Panu, N. T. Holm, B. D. L. Li, L. W. Johnson, and S. Zhang // *Journal of Surgical Research*. – 2020. – Vol. 159. – No. 2. – P. 689-695.

118. Chen, H. W. Cytoplasmic CXCR4 high-expression exhibits distinct poor clinicopathological characteristics and predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer / H. W. Chen, C. W. Du, X. L. Wei, U. S. Khoo, and G. J. Zhang // *Current Molecular Medicine*. – 2013. – Vol. 13. – No. 3. – P. 410-416.

119. Li, J.-K. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells *in vitro* / J.-K. Li, L. Yu, Y. Shen, L.-S. Zhou, Y.-C. Wang, and J.-H. Zhang //World Journal of Gastroenterology. – 2008. – Vol. 14. – No. 15. – P. 2308-2313.
120. Christopherson, K. II Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses / K. Christopherson II and R. Hromas //Stem Cells. – 2011. – Vol. 19. – No. 5. – P. 388-396.
121. Mackay, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors / C. R. Mackay //Nature Immunology. – 2011. – Vol. 2. – No. 2. – P. 95-101.
122. Zlotnik, A. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution / A. Zlotnik, O. Yoshie, and H. Nomiyama //Genome Biology. – 2016. – Vol. 7. – No. 12, article 243.
123. Zhang, Y. Role of CCL5 in invasion, proliferation and proportion of CD44⁺/CD24⁻ phenotype of MCF-7 cells and correlation of CCL5 and CCR5 expression with breast cancer progression / Y. Zhang, F. Yao, X. Yao et al. //Oncology Reports. – 2009. – Vol. 21. – No. 4. – P. 1113-1121.
124. Fang, W. B. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms / W. B. Fang, I. Jokar, A. Zou, D. Lambert, P. Dendukuri, and N. Cheng //The Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287. – P. 36593-36608.
125. Steiner, J. L. Importance of chemokine (CC-motif) ligand 2 in breast cancer / J. L. Steiner and E. A. Murphy //The International Journal of Biological Markers. – 2012. – Vol. 27. – No. 3. – e179-e185.
126. Lu, X. Chemokine (C-C Motif) ligand 2 engages CCR2⁺ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone / X. Lu and Y. Kang //The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284. – No. 42. – P. 29087-29096.

127. Murooka, T. T. CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation / T. T. Murooka, R. Rahbar, and E. N. Fish //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2009. – Vol. 387. – No. 2. – P. 381-386.

128. Velasco-Velazquez, M. The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer / M. Velasco-Velazquez and R. G. Pestell //Oncoimmunology. – 2013. – Vol. 2. – No. 4, Article ID e23660.

129. Luboshits, G. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma / G. Luboshits, S. Shina, O. Kaplan et al.// Cancer Research. – 2009. – Vol. 59. – No. 18. – P. 4681-4687.

130. Cerna, M. IGF1 and tumor markers in different breast cancer stages / M. Cerna, A. Narsanska, V. Treska, R. Kucera, and O. Topolcan //Rozhledy v Chirurgii. – 2011. – Vol. 90. – No. 12. – P. 688-694.

131. Mezi, S. Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells / S. Mezi, L. Todi, E. Orsi, A. Angeloni, and P. Mancini //International Journal of Oncology. – 2015. – Vol. 41. – No. 6. – P. 2128-2138.

132. Kucera, R. Growth factors and breast tumors, comparison of selected growth factors with traditional tumor markers / R. Kucera, M. Cerna, A. Narsanska et al. //Anticancer Research. – 2011. – Vol. 31. – No. 12. – P. 4653-4656.

133. Ahmed, H. H. Clinical value of serum hepatocyte growth factor, B-cell lymphoma-2 and nitric oxide in primary breast cancer patients / H. H. Ahmed, F. M. Metwally, E. S. Mahdy, W. G. Shosha, and S. S. Ramadan //European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2012. – Vol. 16. – P. 958.

134. Arias-Pulido, H. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer / H. Arias-Pulido, N. Chaher, Y. Gong, C. Qualls, J. Vargas, and M. Royce //BMC Cancer. – 2013. – Vol. 12. – P. 298.

135. Oda, J. M. M. TGF- β polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer / J. M. M. Oda, K. B. de Oliveira, R. L. Guembarovski, K. W. A. de Lima, A. C. D. D. Herrera, A. L. Guembarovski et al. // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39. – No. 12. – P. 10131-10137.

136. Dumont, N. Transforming growth factor- β and breast cancer: tumor promoting effects of transforming growth factor- β / N. Dumont and C. L. Arteaga // *Breast Cancer Research*. – 2010. – Vol. 12. – No. 2. – P. 125-132.

137. Sheen-Chen, S.-M. Serum levels of transforming growth factor β 1 in patients with breast cancer / S.-M. Sheen-Chen, H.-S. Chen, C.-W. Sheen, H.-L. Eng, and W.-J. Chen // *Archives of Surgery*. – 2011. – Vol. 146. – No. 8. – P. 937-940.

138. Figueroa, J. D. Expression of TGF- β signaling factors in invasive breast cancers: relationships with age at diagnosis and tumor characteristics / J. D. Figueroa, K. C. Flanders, M. Garcia-Closas et al. // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2010. – Vol. 121. – No. 3. – P. 727-735.

139. de Kruijf, E. M. The prognostic role of TGF- β signaling pathway in breast cancer patients / E. M. de Kruijf, T. J. Dekker, L. J. Hawinkels, H. Putter, V. T. Smit, J. R. Kroep et al. // *Annals of Oncology*. – 2013. – Vol. 24. – No. 2. – P. 384-390.

140. Eilers, M. Myc's broad reach / M. Eilers and R. N. Eisenman // *Genes and Development*. – 2008. – Vol. 22. – No. 20. – P. 2755-2766.

141. Dang, C. V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism / C. V. Dang // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19. – No. 1. – P. 1-11.

142. Todorovic-Rakovic, N. C-myc as a predictive marker for chemotherapy in metastatic breast cancer / N. Todorovic-Rakovic, Z. Neskovic-Konstantinovic, and D. Nikolic-Vukosavljevic // *Clinical and Experimental Medicine*. – 2012. – Vol. 12. – No. 4. – P. 217-223.

143. Singhi, A. D. MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors / A. D. Singhi, A. Cimino-Mathews, R. B. Jenkins et al. //Modern Pathology. – 2012. – Vol. 25. – No. 3. – P. 378-387.

144. Horiuchi, D. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition / D. Horiuchi, L. Kusdra, N. E. Huskey, S. Chandriani, M. E. Lenburg, A. M. Gonzalez-Angulo et al. //Journal of Experimental Medicine. – 2012. – Vol. 209. – No. 4. – P. 679-696.

145. Rummukainen, J. K. Amplification of c-myc by fluorescence in situ hybridization in a population-based breast cancer tissue array / J. K. Rummukainen, T. Salminen, J. Lundin, S. Kytola, H. Joensuu, and J. J. Isola //Modern Pathology. – 2011. – Vol. 14. – No. 10. – P. 1030-1035.

146. Oloomi, M. Molecular markers in peripheral blood of iranian women with breast cancer / M. Oloomi, S. Bouzari, M. A. Mohagheghi, and H. Khodayaran-Tehrani //Cancer Microenviron. – 2013. – Vol. 6. – No. 1. – P. 109-116.

147. Sahin, M. Regulatory T cells in cancer, an overview and perspectives on cyclooxygenase-2 and Foxp3 DNA methylation / M. Sahin, E. Sahin, and S. Koksoy //Human Immunology. – 2013. – Vol. 74. – No. 9. – P. 1061-1068.

148. Watanabe, M. A. E. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis / M. A. E. Watanabe, J. M. M. Oda, M. K. Amarante, and J. Cesar Voltarelli //Cancer and Metastasis Reviews. – 2010. – Vol. 29. – No. 4. – P. 569–579.

149. Wang, L. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor *FOXP3* in the prostate / L. Wang, R. Liu, W. Li et al.// Cancer Cell. – 2009. – Vol. 16. – No. 4. – P. 336-346.

150. Zuo, T. FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2 / T. Zuo, R. Liu, H. Zhang et al. //The Journal of Clinical Investigation. – 2007. – Vol. 117. – No. 12. – P. 3765-3773.

151. Balsari, A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer / A. Balsari, A. Merlo, P. Casalini et al. //Journal of Clinical Oncology. – 2009. – Vol. 27. – No. 11. – P. 1746-1752.

152. Chen, G.-Y. Cutting edge: broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells / G.-Y. Chen, C. Chen, L. Wang, X. Chang, P. Zheng, and Y. Liu //Journal of Immunology. – 2008. – Vol. 180. – No. 8. – P. 5163-5166.

153. T. Zuo, L. Wang, C. Morrison et al., “FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene /Cell. – 2007. – Vol. 129. – No. 7. – P. 1275-1286.

154. Overbeck-Zubrzycka, D. FOXP3 transcription factor regulates metastatic spread of breast cancer via control of expression of CXCR4 chemokine receptor / D. Overbeck-Zubrzycka, S. Ali, J. Kirby, and T. Lennard //British Journal of Surgery. – 2011. – Vol. 98. – No. 1. – P. 84-85.

155. Harvey, J.R. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? / J.R. Harvey, P. Mellor, H. Eldaly, T. W. J. Lennard, J. A. Kirby, and S. Ali //Clinical Cancer Research. – 2017. – Vol. 13. – No. 5. – P. 1562-1570.

156. Mellor, P. Modulatory effects of heparin and short-length oligosaccharides of heparin on the metastasis and growth of LMD MDA-MB 231 breast cancer cells in vivo / P. Mellor, J. R. Harvey, K. J. Murphy et al. //British Journal of Cancer. – 2007. – Vol. 97. – No. 6. – P. 761-768.

157. Iorio, M. V. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer / M. V. Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu et al. // Cancer Research. – 2015. – Vol. 65. – No. 16. – P. 7065-7070.

158. Fu, S.W. miRNA biomarkers in breast cancer detection and management / S.W. Fu, L. Chen, and Y. G. Man //Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 2. – P. 116-122.

159. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function / D. P. Bartel // *Cell*. – 2004. – Vol. 116. – No. 2. – P. 281-297.

160. Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis and cancer / R. I. Gregory and R. Shiekhattar // *Cancer Research*. – 2015. – Vol. 65. – No. 9. – P. 3509-3512.

161. Taylor, D. D. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer / D. D. Taylor and C. Gercel-Taylor // *Gynecologic Oncology*. – 2008. – Vol. 110. – No. 1. – P. 13-21.

162. Chin, L. J. A truth serum for cancer microRNAs have major potential as cancer biomarkers / L. J. Chin and F. J. Slack // *Cell Research*. – 2008. – Vol. 18. – No. 10. – P. 983-984.

163. Mitchell, P. S. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / P. S. Mitchell, R. K. Parkin, E. M. Kroh et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – No. 30. – P. 10513-10518.

164. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions / D. P. Bartel // *Cell*. – 2009. – Vol. 136. – No. 2. – P. 215-233.

165. Guarnieri, D. J. MicroRNAs: a new class of gene regulators / D. J. Guarnieri and R. J. Dileone // *Annals of Medicine*. – 2008. – Vol. 40. – No. 3. – P. 197-208.

166. Wu, X. Denovosequencingofcirculating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer / X. Wu, G. Somlo, Y. Yu et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 10. – No. 1, article 42.

167. Wang, B. MiR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R / B. Wang, H. Wang, and Z. Yang // *PloS ONE*. – 2015. – Vol. 7. – No. 10, Article ID e47053.

168. Shen, L. miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w / L. Shen, J. Li, L. Xu et al. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2014. – Vol. 3. – No. 3. – P. 475-480.

169. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer / C. M. Croce // *Nature Reviews Genetics*. – 2009. – Vol. 10. – No. 10. – P. 704-714.

170. Huang, Q. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis / Q. Huang, K. Gumireddy, M. Schrier et al. // *Nature Cell Biology*. – 2012. – Vol. 10. – No. 2. – P. 202-210.

171. Senger, D.R. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins / D.R. Senger, D.F. Wirth and R.O. Hynes // *Cell*. – 1979. – Vol. 16. – P. 885-893.

172. Brown, L.F. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas / L.F. Brown, A. Papadopoulos-Sergiou, B. Berse, E.J. Manseau, K. Tognazzi, C.A. Perruzzi, H.F. Dvorak and D.R. Senger // *Am J Pathol*. – 1994. – Vol. 145. – P. 610-623.

173. Pang, H. Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and β -catenin in breast cancer / H. Pang, H. Lu, H. Song, Q. Meng, Y. Zhao, N. Liu, F. Lan, Y. Liu, S. Yan, X. Dong and L. Cai // *Cancer Epidemiol*. – 2013. – Vol. 37. – No. 2. – P. 985-992.

174. Ortiz-Martínez, F. Association of increased osteopontin and splice variant-c mRNA expression with HER2 and triple-negative/basal-like breast carcinomas subtypes and recurrence / F. Ortiz-Martínez, A. Perez-Balaguer, D. Ciprián, L. Andrés, J. Ponce, E. Adrover, J. Sánchez-Payá, F.I. Aranda, E. Lerma and G. Peiró // *Hum Pathol*. – 2014. – Vol. 45. – P. 504-512.

175. Esteban, J.M. Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas. An immunohistochemical study with clinicopathologic correlation / J.M. Esteban, Z. Warsi, M. Haniu, P. Hall, J.E. Shively and S. Chen // *Am J Pathol*. – 1992. – Vol. 140. – P. 337-343.

176. Miki, Y. Controversies of aromatase localization in human breast cancer-stromal versus parenchymal cells / Y. Miki, T. Suzuki and H. Sasano // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2007. – Vol. 106. – P. 97-101.

177. Ellis, M.J. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: Evidence from a phase III randomized trial / M.J. Ellis, A. Coop, B. Singh, L. Mauriac, A. Llombert-Cussac, F. Jänicke, W.R. Miller, D.B. Evans, M. Dugan, C. Brady, et al. // *J Clin Oncol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 3808-3816.

178. Eiermann, W. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: A randomized double-blind multicenter study / W. Eiermann, S. Paepke, J. Appfelstaedt, A. Llombart-Cussac, J. Eremin, J. Vinholes, L. Mauriac, M. Ellis, M. Lassus, H.A. Chaudri-Ross, et al.// *Ann Oncol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 1527-1532.

179. Ellis, M.J. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics / M.J. Ellis, Y. Tao, J. Luo, R. A'Hern, D.B. Evans, A.S. Bhatnagar, H.A. Chaudri Ross, A. von Kameke, W.R. Miller, I. Smith, et al. // *J Natl Cancer Inst.* – 2008. – Vol. 100. – P. 1380-1388.

180. Ellis, M.J. Letrozole inhibits tumor proliferation more effectively than tamoxifen independent of HER1/2 expression status / M.J. Ellis, A. Coop, B. Singh, Y. Tao, A. Llombart-Cussac, F. Jänicke, L. Mauriac, E. Quebe-Fehling, H.A. Chaudri-Ross, D.B. Evans and W.R. Miller // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 6523-6531.

181. Allred, D.C. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D.C. Allred, J.M. Harvey, M. Berardo and G.M. Clark // *Mod Pathol.* – 1998. – Vol. 11. – P. 155-168.

182. Ellis, M.J. Aromatase expression and outcomes in the P024 neoadjuvant endocrine therapy trial / M.J. Ellis, W.R. Miller, Y. Tao, D.B. Evans, H.A. Chaudri Ross, Y. Miki, T. Suzuki and H. Sasano // *Breast Cancer Res Treat.* – 2009. – Vol. 116. – P. 371-378.

183. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): Effects

of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials // *Lancet*. – 2005. – Vol. 365. – P. 1687-1717.

184. Niederreither, K. Retinoic acid in development: Towards an integrated view / K. Niederreither and P. Dollé // *Nat Rev Genet*. – 2008. – Vol. 9. – P. 541-553.

185. Hua, S. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer / S. Hua, R. Kittler and K.P. White // *Cell*. – 2009. – Vol. 137. – P. 1259-1271.

186. Johansson, H.J. Retinoic acid receptor alpha is associated with tamoxifen resistance in breast cancer / H.J. Johansson, B.C. Sanchez, F. Mundt, J. Forshed, A. Kovacs, E. Panizza, L. Hultin-Rosenberg, B. Lundgren, U. Martens, G. Máthé, *et al.* // *Nat Commun*. – 2013. – Vol. 4. – Art. No. 2175.

187. Kuroki, M. Three different NCA species, CGM6/CD67, NCA-95 and NCA-90, are comprised in the major 90 to 100-kDa band of granulocyte NCA detectable upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis / M. Kuroki, Y. Matsuo, T. Kinugasa and Y. Matsuoka // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1992. – Vol. 182. – P. 501-506.

188. Blumenthal, R.D. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers / R.D. Blumenthal, E. Leon, H.J. Hansen and D.M. Goldenberg // *BMC cancer*. – 2007. – Vol. 7. – Art. No. 2.

189. Poola, I. Expression of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 oncoprotein in atypical ductal hyperplastic tissues is associated with the development of invasive breast cancer / I. Poola, B. Shokrani, R. Bhatnagar, R.L. DeWitty, Q. Yue and G. Bonney // *Clin Cancer Res*. – 2016. – Vol. 12. – P. 4773-4783.

190. Tsang, J.Y. Expression and clinical significance of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in breast cancers / J.Y. Tsang, Y.K. Kwok, K.W. Chan, Y.B. Ni, W.N. Chow, K.F. Lau, M.M. Shao, S.K. Chan, P.H.

Tan and G.M. Tse // *Breast Cancer Res Treat.* – 2013. – Vol. 142. – No. 4. – P. 311-322.

191. German, S. Carcinogenesis of PIK3CA / S. German, H.M. Aslam, S. Saleem, A. Raees, T. Anum, A.A. Alvi and A. Haseeb // *Hered Cancer Clin Pract.* – 2013. – Vol. 11. – P. 5.

192. Hanker, A.B. Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies / A.B. Hanker, A.D. Pfefferle, J.M. Balko, M.G. Kuba, C.D. Young, V. Sánchez, C.R. Sutton, H. Cheng, C.M. Perou, J.J. Zhao, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 14372-14377.

193. Cizkova, M. Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab / M. Cizkova, M.E. Dujaric, J. Lehmann-Che, V. Scott, O. Tembo, B. Asselain, J.Y. Pierga, M. Marty, P. de Cremoux, F. Spyrtos and I. Bieche // *Br J Cancer.* – 2013. – Vol. 108. – P. 1807-1809.

194. Hortobagyi, G.N. Single-agent paclitaxel for the treatment of breast cancer: An overview / G.N. Hortobagyi and F.A. Holmes // *Semin Oncol.* – 1996. – Vol. 23 (1 Suppl 1). – S4-S9.

195. Bergh, J. SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer / J. Bergh, P.E. Jönsson, B. Glimelius and P. Nygren // *Acta Oncol.* – 2011. – Vol. 40. – P. 253-281.

196. Chromek, M. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects them from apoptosis, and blocks their transmigration during inflammation / M. Chromek, K. Tullus, J. Lundahl and A. Brauner // *Infect Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. 82-88.

197. Schrohl, A.S. Primary tumor levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer / A.S. Schrohl, M.E. Meijer-van Gelder, M.N. Holten-

Andersen, I.J. Christensen, M.P. Look, H.T. Mouridsen, N. Brüner and J.A. Foekens // *Clin Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 7054-7058.

198. Zhu, D. High expression of TIMP-1 in human breast cancer tissues is a predictive of resistance to paclitaxel-based chemotherapy / D. Zhu, X. Zha, M. Hu, A. Tao, H. Zhou, X. Zhou and Y. Sun // *Med Oncol.* – 2012. – Vol. 29. – P. 3207-3215.

199. Arosio, P. Structural and immunological relationships of isoferritins in normal and malignant cells / P. Arosio, M. Yokota and J.W. Drysdale // *Cancer Res.* – 1976. – Vol. 36. – P. 1735-1739.

200. Levi, S. Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin / S. Levi, S.J. Yewdall, P.M. Harrison, P. Santambrogio, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini and P. Arosio // *Biochem J.* – 1992. – Vol. 288. – P. 591-596.

201. Ricolleau, G. Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors / G. Ricolleau, C. Charbonnel, L. Lodé, D. Loussouarn, M.P. Joalland, R. Bogumil, S. Jourdain, S. Minvielle, M. Campone, R. Déporte-Fety, et al. // *Proteomics.* – 2006. – Vol. 6. – P. 1963-1975.

202. Jézéquel, P. Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national PHRC study / P. Jézéquel, L. Campion, F. Spyrtos, D. Loussouarn, M. Campone, C. Guérin-Charbonnel, M.P. Joalland, J. André, F. Descotes, C. Grenot, et al. // *Int J Cancer.* – 2012. – Vol. 131. – No. 4. – P. 426-437.

203. Duffy, M.J. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: From pilot to level 1 evidence studies / M.J. Duffy // *Clin Chem.* – 2002. – Vol. 48. – P. 1194-1197.

204. Mengele, K. Characteristics of the level-of-evidence-1 disease forecast

cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1 / K. Mengele, R. Napieralski, V. Magdolen, U. Reuning, A. Gkazepis, F. Sweep, N. Brünner, J. Foekens, N. Harbeck and M. Schmitt // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2010. – Vol. 10. – P. 947-962.

205. Harbeck, N. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American society of clinical oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients / N. Harbeck, M. Schmitt, C. Meisner, C. Friedel, M. Untch, M. Schmidt, C.G. Sweep, B.W. Lisboa, M.P. Lux, T. Beck, et al. // *Eur J Cancer.* – 2013. – Vol. 49. – P. 1825-1835.

206. Zody, M.C. DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage / M.C. Zody, M. Garber, D.J. Adams, T. Sharpe, J. Harrow, J.R. Lupski, C. Nicholson, S.M. Searle, L. Wilming, S.K. Young, et al. // *Nature.* – 2006. – Vol. 440. – P. 1045-1049.

207. Watters, A.D. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma / A.D. Watters, J.J. Going, T.G. Cooke and J.M. Bartlett // *Breast Cancer Res Treat.* – 2013. – Vol. 77. – P. 109-114.

208. Corzo, C. Does polysomy of chromosome 17 have a role in ERBB2 and topoisomerase IIalpha expression? Gene, mRNA and protein expression: A comprehensive analysis / C. Corzo, B. Bellosillo, J.M. Corominas, M. Salido, M.D. Coll, S. Serrano, J. Albanell, F. Solé and I. Tusquets // *Tumor Biol.* – 2007. – Vol. 28. – P. 221-228.

209. Earl, H.M. Adjuvant epirubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil (CMF) vs CMF in early breast cancer: Results with over 7 years median follow-up from the randomised phase III NEAT/BR9601 trials / H.M. Earl, L. Hiller, J.A. Dunn, A.L. Vallier, S.J. Bowden, S.D. Jordan, F. Blows, A. Munro, S. Bathers, R. Grieve, et al. // *Br J Cancer.* – 2012. – Vol. 107. – P. 1257-1267.

210. Tsukasaki, K. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers / K. Tsukasaki, C.W. Miller, E. Greenspun, S. Eshaghian, H. Kawabata, T. Fujimoto, M. Tomonaga, C. Sawyers, J.W. Said and H.P. Koeffler // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 20. – P. 3301-3305.

211. Sun, Q. Increased expression of mitotic arrest deficient-like 1 (MAD1L1) is associated with poor prognosis and insensitive to Taxol treatment in breast cancer / Q. Sun, X. Zhang, T. Liu, X. Liu, J. Geng, X. He, Y. Liu and D. Pang // *Breast Cancer Res Treat*. – 2013. – Vol. 140. – P. 323-330.

212. Perou, C.M. Molecular portraits of human breast tumours / C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, et al. // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – P. 747-752.

213. Prat, A. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer / A. Prat, J.S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J.I. Herschkowitz et al. // *Breast Cancer Res*. – 2010. – Vol. 12. – No. 6. – R68.

214. Perou, C.M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers / C.M. Perou // *Oncologist*. – 2010. – Vol. 15. – Suppl. 5. – P. 39-48.

215. Prat, A. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer / A. Prat, C.M. Perou // *Mol Oncol*. – 2011. – Vol. 5. – P. 5-23.

216. Prat, A. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer / A. Prat, J.S. Parker, C. Fan, C.M. Perou // *Breast Cancer Res Treat*. – 2012. – Vol. 135. – No. 4. – P. 301-306.

217. Prat, A. Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer / A. Prat, A. Lluch, J. Albanell, W.T. Barry, C. Fan, J.I. Chacon et al. // *Br J Cancer*. – 2014. – Vol. 111. – P. 1532-1541.

218. Sikov, W.M. Impact of intrinsic subtype by PAM50 and other gene signatures on pathologic complete response (pCR) rates in triple-negative breast cancer (TNBC) after neoadjuvant chemotherapy (NACT) +/- carboplatin (Cb) or

bevacizumab (Bev): CALGB 40603/150709 (Alliance) / W.M. Sikov, W.T. Barry, K.A. Hoadley, B.N. Pitcher, B. Singh, S.M. Tolaney, et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. – S4-5.

219. Tutt, A. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial / A. Tutt, H. Tovey, M.C.U. Cheang, S. Kernaghan, L. Kilburn, P. Gazinska et al. // *Nat Med.* – 2018. – Vol. 24. – P. 628-637.

220. Bruna, A. TGFbeta induces the formation of tumour-initiating cells in claudin-low breast cancer / A. Bruna, W. Greenwood, J. Le Quesne, A. Teschendorff, D. Miranda- Saavedra, O.M. Rueda et al. // *Nat Commun.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1055.

221. Bhola, N.E. TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer / N.E. Bhola, J.M. Balko, T.C. Dugger, M.G. Kuba, V. Sanchez, M. Sanders, et al. // *J Clin Invest.* – 2013. – Vol. 123. – No. 11. P. 1348-1358.

222. Lehmann, B.D. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies / B.D. Lehmann, J.A. Bauer, X. Chen, M.E. Sanders, A.B. Chakravarthy, Y. Shyr, et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121. – P. 2750-2767.

223. Bareche, Y. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis / Y. Bareche, D. Venet, M. Ignatiadis, P. Aftimos, M. Piccart, F. Rothe, et al. // *Ann Oncol.* – 2018. – Vol. 29. – P. 895-902.

224. Masuda, H. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes / H. Masuda, K.A. Baggerly, Y. Wang, Y. Zhang, A.M. Gonzalez-Angulo, F. Meric-Bernstam, et al. // *Clin Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19. – P. 5533-5540.

225. Lehmann, B.D. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection / B.D. Lehmann, B.

Jovanovic, X. Chen, M.V. Estrada, K.N. Johnson, Y. Shyr, et al. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11. – e0157368.

226. Echavarria, I. Pathological response in a triple-negative breast cancer cohort treated with neoadjuvant carboplatin and docetaxel according to Lehmann's refined classification / I. Echavarria, S. Lopez-Tarruella, A. Picornell, J.A. Garcia-Saenz, Y. Jerez, K. Hoadley, et al. // Clin Cancer Res. – 2018. – Vol. 24. – P. 1845-1852.

227. Karaayvaz, M. Unravelling subclonal heterogeneity and aggressive disease states in TNBC through single-cell RNA-seq / M. Karaayvaz, S. Cristea, S.M. Gillespie, A.P. Patel, R. Mylvaganam, C.C. Luo, et al. // Nat Commun. – 2018. – Vol. 9. – Art. No. 3588.

228. Burstein, M.D. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer / M.D. Burstein, A. Tsimelzon, G.M. Poage, K.R. Covington, A. Contreras, S.A. Fuqua, et al. // Clin Cancer Res. – 2015. – Vol. 21. – P. 1688-1698.

229. Curtis, C. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups / C. Curtis, S.P. Shah, S.F. Chin, G. Turashvili, O.M. Rueda, M.J. Dunning, et al. // Nature. – 2012. – Vol. 486. – No. 8. – P. 346-352.

230. Bianchini, G. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease / G. Bianchini, J.M. Balko, I.A. Mayer, M.E. Sanders, L. Gianni // Nat Rev Clin Oncol. – 2016. – Vol. 13. – No. 3. – P. 674-690.

231. Collins, L.C. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study / L.C. Collins, K.S. Cole, J.D. Marotti, R. Hu, S.J. Schnitt, R.M. Tamimi // Mod Pathol. – 2011. – Vol. 24. – P. 924-931.

232. Asghar, U.S. Single-cell dynamics determines response to CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer / U.S. Asghar, A.R. Barr, R. Cutts, M.

Beaney, I. Babina, D. Sampath, et al.// Clin Cancer Res. – 2017. – Vol. 23. – P. 5561-5572.

233. Gucalp, A. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer / A. Gucalp, S. Tolaney, S.J. Isakoff, J.N. Ingle, M.C. Liu, L.A. Carey, et al. // Clin Cancer Res. – 2013. – Vol. 19. – P. 5505-5512.

234. Traina, T.A. Enzalutamide for the treatment of androgen receptor-expressing triple-negative breast cancer / T.A. Traina, K. Miller, D.A. Yardley, J. Eakle, L.S. Schwartzberg, J. O'Shaughnessy, et al. // J Clin Oncol. – 2018. – Vol. 36. – P. 884-890.

235. Bonnefoi, H. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1) / H. Bonnefoi, T. Grellety, O. Tredan, M. Saghatchian, F. Dalenc, A. Mail-liez, et al. // Ann Oncol. – 2016. – Vol. 27. – P. 812-818.

236. Traina, T.A. Overall survival (OS) in patients (Pts) with diagnostic positive (Dx+) breast cancer: subgroup analysis from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in AR+ triple-negative breast cancer (TNBC) treated with 0-1 prior lines of therapy / T.A. Traina, D.A. Yardley, L.S. Schwartzberg, J. O'Shaughnessy, J. Cortes, A. Awada, et al.// J Clin Oncol. – 2017. – Vol. 35. – Art. No. 1089.

237. Lehmann, B.D. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors / B.D. Lehmann, J.A. Bauer, J.M. Schafer, C.S. Pendleton, L. Tang, K.C. Johnson, et al.// Breast Cancer Res. – 2014. – Vol. 16. – No. 7. – Art. No. 406.

238. Millis, S.Z. Predictive biomarker profiling of >6000 breast cancer patients shows heterogeneity in TNBC, with treatment implications / S.Z. Millis, Z. Gatalica, J. Winkler, S. Vranic, J. Kimbrough, S. Reddy, et al. // Clin Breast

Cancer. – 2015. – Vol. 15. – P. 473– Art. No. 81e3.

239. Bardia, A. Efficacy and safety of anti-Trop-2 antibody–drug conjugate sacituzumab govitecan (IMMU-132) in heavily pretreated patients with metastatic triple-negative breast cancer / A. Bardia, I.A. Mayer, J.R. Diamond, R.L. Moroose, S.J. Isakoff, A.N. Starodub, et al. // *J Clin Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – No. 3. – P. 2141-2148.

240. Modi, S. Abstract PD3-14: phase 1 study of the antibody–drug conjugate SGN-LIV1A in patients with heavily pretreated triple-negative metastatic breast cancer / S. Modi, L. Pusztai, A. Forero, M. Mita, K. Miller, A. Weise, et al. // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78. – Art. No. PD3-14-PD3.

241. Yardley, D.A. EMERGE: a randomized phase II study of the antibody–drug conjugate glembatumumab vedotin in advanced glycoprotein NMB-expressing breast cancer / D.A. Yardley, R. Weaver, M.E. Melisko, M.N. Saleh, F.P. Arena, A. Forero, et al. // *J Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 33. – No. 4. – P. 1609-1619.

242. Vogelstein, B. Cancer genome landscapes / B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A. Diaz Jr, K.W. Kinzler // *Science.* – 2013. – Vol. 339. – P. 1546-1558.

243. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours// *Nature.* – 2012. – Vol. 490. – P. 61-70.

244. Pereira, B. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes / B. Pereira, S.F. Chin, O.M. Rueda, H.K. Vollan, E. Provenzano, H.A. Bardwell, et al. // *Nat Commun.* – 2016. – Vol. 7. – Art. No. 11479.

245. Weisman, P.S. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology / P.S. Weisman, C.K. Ng, E. Brogi, R.E. Eisenberg, H.H. Won, S. Piscuoglio, et al.// *Mod Pathol.* – 2016. – Vol. 29. – P. 476-488.

246. Balko, J.M. Molecular profiling of the residual disease of triple-

negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets / J.M. Balko, J.M. Giltane, K. Wang, L.J. Schwarz, C.D. Young, R.S. Cook, et al. // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4. – P. 232-245.

247. Nik-Zainal, S. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers / S. Nik-Zainal, L.B. Alexandrov, D.C. Wedge, P. Van Loo, C.D. Greenman, K. Raine, et al. // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – P. 979-993.

248. Nik-Zainal, S. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences / S. Nik-Zainal, H. Davies, J. Staaf, M. Ramakrishna, D. Glodzik, X. Zou, et al. // *Nature.* – 2016. – Vol. 534. – P. 47-54.

249. Favaro, E. Cellular interactions in the vascular niche: Implications in the regulation of tumor dormancy / E. Favaro, A. Amadori and S. Indraccolo // *APMIS.* – 2008. – Vol. 116. – P. 648-659.

250. Allin, K.H. Elevated C-reactive protein in the diagnosis, prognosis, and cause of cancer / K.H. Allin and B.G. Nordestgaard // *Crit Rev Clin Lab Sci.* – 2011. – Vol. 48. – P. 155-170.

251. Villaseñor, A. Postdiagnosis C-reactive protein and breast cancer survivorship: Findings from the WHEL study / A. Villaseñor, S.W. Flatt, C. Marinac, L. Natarajan, J.P. Pierce and R.E. Patterson // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2014. – Vol. 23. – P. 189-199.

252. Bramwell, V.H. Assessment of osteopontin in early breast cancer: Correlative study in a randomised clinical trial / V.H. Bramwell, A.B. Tuck, J.A. Chapman, P.H. Anborgh, C.O. Postenka, W. Al-Katib, L.E. Shepherd, L. Han, C.F. Wilson, K.I. Pritchard, et al. // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16– No. 3. – P. R8.

253. Ohno, S. Randomized trial of preoperative docetaxel with or without capecitabine after 4 cycles of 5-fluorouracil-epirubicin-cyclophosphamide (FEC) in early-stage breast cancer: Exploratory analyses identify Ki67 as a predictive biomarker for response to neoadjuvant chemotherapy / S. Ohno, L.W. Chow, N. Sato, N. Masuda, H. Sasano, F. Takahashi, H. Bando, H. Iwata, T. Morimoto, S.

Kamigaki, et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2013. – Vol. 142. – No. 5. – P.169-180.

254. Denkert, C. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: A translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial / C. Denkert, S. Loibl, B.M. Muller, H. Eidtmann, W.D. Schmitt, W. Eiermann, B. Gerber, H. Tesch, J. Hilfrich, J. Huober, et al. // *Ann Oncol.* – 2013. – Vol. 24. – P. 2786-2793.

255. Budczies, J. Cutoff finder: A comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization / J. Budczies, F. Klauschen, B.V. Sinn, B. Györfy, W.D. Schmitt, S. Darb-Esfahani and C. Denkert // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – Art. No. e51862.

256. DeCensi, A. Prognostic significance of Ki-67 labeling index after short-term presurgical tamoxifen in women with ER-positive breast cancer / A. DeCensi, A. Guerrieri-Gonzaga, S. Gandini, D. Serrano, M. Cazzaniga, S. Mora, H. Johansson, E.A. Lien, G. Pruneri, G. Viale and B. Bonanni // *Ann Oncol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 582-587.

257. Sias, P.E. ELISA for quantitation of the extracellular domain of p185HER2 in biological fluids / P.E. Sias, C.E. Kotts, D. Vetterlein, M. Shepard and W.L. Wong // *J Immunol Methods.* – 1990. – Vol. 132. – P. 73-80.

258. Codony-Servat, J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells / J. Codony-Servat, J. Albanell, J.C. Lopez-Talavera, J. Arribas and J. Baselga // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 1196-1201.

259. Tse, C. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer / C. Tse, A.S. Gauchez, W. Jacot and P.J. Lamy // *Cancer Treat Rev.* – 2012. – Vol. 38. – P. 133-142.

260. Romond, E.H. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer / E.H. Romond, E.A. Perez, J. Bryant, V.J. Suman, C.E. Geyer Jr, N.E. Davidson, E. Tan-Chiu, S. Martino, S. Paik, P.A. Kaufman, et

al. // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 1673-1684.

261. Moreno-Aspitia, A. Soluble human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels in patients with HER2-positive breast cancer receiving chemotherapy with or without trastuzumab: Results from north central cancer treatment group adjuvant trial N9831 / A. Moreno-Aspitia, D.W. Hillman, S.H. Dyar, K.S. Tenner, J. Gralow, P.A. Kaufman, N.E. Davidson, J.M. Lafky, M.M. Reinholz, W.L. Lingle, et al. // Cancer. – 2013. – Vol. 119. – No.12. – P. 2675-2682.

262. Tsukasaki, K. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers / K. Tsukasaki, C.W. Miller, E. Greenspun, S. Eshaghian, H. Kawabata, T. Fujimoto, M. Tomonaga, C. Sawyers, J.W. Said and H.P. Koeffler // Oncogene. – 2011. – Vol. 20. – P. 3301-3305.

263. Sun, Q. Increased expression of mitotic arrest deficient-like 1 (MAD1L1) is associated with poor prognosis and insensitive to Taxol treatment in breast cancer / Q. Sun, X. Zhang, T. Liu, X. Liu, J. Geng, X. He, Y. Liu and D. Pang // Breast Cancer Res Treat. – 2013. – Vol. 140. – P. 323-330.

264. Гуськова, Т.А. Токсикология лекарственных средств / Т.А. Гуськова. — Москва, 2008. — 196 с.

265. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова, Т.А. Гуськова, А.Д. Дурнев и др. / Руководство по доклиническому изучению лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и Ко, 2012. – С. 13-51.

266. Gad, S.C. Model selection in toxicology: Principles and practice / S.C. Gad // Journal of American College of Toxicology. – 1990. – Vol. 9. – P. 291-302.

267. Recent advances in developing small molecules targeting nucleic acid / M. Wang, Y. Yu, C. Liang, A. Lu, G. Zhang // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17(6). – ID 779.

268. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications / A. Sethi, K. Joshi, K. Sasikala, M. Alvala. – Drug Discovery and Development – New Advances. New York, 2020.

269. Free energy calculations to estimate ligand-binding affinities in structure-based drug design / M.R. Reddy, C.R. Reddy, R.S. Rathore et al. // Curr. Pharm. Des. – 2014. – Vol. 20. – No. 20. – P. 3323-3337.

270. Pharmacologic profiling of patient-derived xenograft models of primary treatment-naïve triple-negative breast cancer / R.T. Powell, A. Redwood, X. Liu et al. // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10. - ID 17899.

271. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 640-654.

272. Protocols for screening chemical agents and natural products against tumor and other biological systems / R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, et al. // Cancer Chemother. Rep. – 1972. – Vol. 3. – P. 1-103.

273. Самышина, Е.А. Биологические *in vivo* и *in vitro* опухолевые платформы для доклинических и персонализированных исследований в онкофармакологии. – Дисс. ... д-ра мед. наук: 3.3.6. / Самышина Елена Александровна. – Москва, 2022. – 286 с.

274. Жданов, П.Н. Значение PD-L1 сигнального пути в прогрессии основных молекулярных типов мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. – Дисс. ... канд. мед. наук: 14.03.02 / Жданов Павел Николаевич. – Москва, 2021. – 139 с.

275. Гланц, С. Медико-биологическая статистика М.: «Практика», 1999. – 467 с.

276. Эпидемиологическая характеристика рака молочной железы в Республике Мордовия / О.Н. Дерябина, Е.В. Блинова, Е.А. Дагар, О.М.

Тумутолова // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2021. – Т. 23. № 3. – С. 6-12.

277. Brasseur, K. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers / K. Brasseur, N. Gévry, E. Asselin // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 4008-4042.

278. Longley, D. Molecular mechanisms of drug resistance / D. Longley, P. Johnston // *J. Pathol.* – 2005. – Vol. 205. – P. 275-292.

279. Emerging role of exosome signalling in maintaining cancer stem cell dynamic equilibrium / Z. Sun, L. Wang, L. Dong, X. Wang // *J. Cell. Mol. Med.* – 2018. – Vol. 22. – P. 3719-3728.

280. Induction of stem-like cells with malignant properties by chronic exposure of human lung epithelial cells to single-walled carbon nanotubes / S. Luanpitpong, L. Wang, V. Castranova, Y. Rojanasakul // *Part Fibre Toxicol.* – 2014. – Vol. 11. – ID 22.

281. SLUG is required for SOX9 stabilization and functions to promote cancer stem cells and metastasis in human lung carcinoma / S. Luanpitpong, J. Li, A. Manke et al. // *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35. – P. 2824-2833.

282. SOX9 regulates cancer stem-like properties and metastatic potential of single-walled carbon nanotube-exposed cells / M.A. Voronkova, S. Luanpitpong, L. Wang et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – ID 11653.

283. Reactive oxygen species mediate cancer stem-like cells and determine bortezomib sensitivity via Mcl-1 and Zeb-1 in mantle cell lymphoma / L. Luanpitpong, J. Poohadsuan, P. Samart et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2018. – Vol. 1864. – P. 3739-3753.

284. Nitric oxide promotes cancer cell dedifferentiation by disrupting an caveolin-1 complex: A new regulatory / A. Maiuthed, N. Bhumphan, S. Luanpitpong et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2018. – Vol. 1864. – P. 3739-3753.

285. Nitric oxide induces cancer stem cell-like phenotypes in human lung cancer cells / N. Yongsanguanchai, V. Pongrakhananon, A. Mutirangura et al. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2015. – Vol. 308. – C89-C100.

286. Inhibition of O-GlcNAcase sensitizes apoptosis and reverses bortezomib resistance in mantle celllymphoma through modification of truncated Bid / S. Luanpitpong, N. Chanthra, M. Janan et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2018. – Vol. 17. – P. 484-496.

287. Zhao, J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid / J. Zhao // *Pharmacol. Ther.* – 2016. – Vol. 160. – P. 145-158.

288. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps / J.I. Fletcher, M. Haber, M.J. Henderson, M.D. Norris *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10. – P. 147-156.

289. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells / L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 15665-15670.

290. Romana-Rea, B. ABC Transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance / B. Romana-Rea, F. Marco // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 18. – ID 2362.

291. Lamouille, S. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition / S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 178-196.

292. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells / S.A. Mani, W. Guo, M.-J. Liao et al. // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. – P. 704-715.

293. Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells / P. Powan, S. Luanpitpong, X. He et al. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2017. – Vol. 313. – C556-C566.

294. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease / J.P. Thiery, H. Acloque, R.Y. Huang, M.A. Nieto // *Cell*. – 2009. – Vol. 139. – P. 871-890.

295. Chemoresistance to doxorubicin induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of transforming growth factor β signaling in HCT116 colon cancer cells / J. Li, H. Liu, J. Yu, H. Yu // *Mol. Med. Rep.* – 2005. – Vol. 12. – P. 192-198.

296. Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil / P.M. Schwartz, R.D. Moir, C.M. Hyde et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 34. – P. 3585-3589.

297. Induction of MRP1 and gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression by interleukin 1beta is mediated by nitric oxide-related signalings in human colorectal cancer cells / Y. Ikegami, S. Tatebe, Y.C. Lin-Lee et al. // *J. Cell. Physiol.* – 2002. – Vol. 185. – P. 293-301.

298. Brozovic, A. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin / A. Brozovic, A. Ambriovic-Ristov, M. Osmak // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2010. – Vol. 40. – P. 347-359.

299. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance / C. Peitzsch, I. Kurth, L. Kunz-Schughart et al. // *Radiother. Oncol.* – 2013. – Vol. 108. – P. 378-387.

300. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells / M. Diehn, R.W. Cho, N.A. Lobo et al. // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – P. 780-783.

301. Drug resistance in cancer: an overview / G. Housman, S. Byler, S. Heerboth et al. // *Cancers (Basel)*. – 2014. – Vol. 6. – P. 1769-1792.

302. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain / P.

William, A.M. Vincent, A.P. Katerina et al. // *PLoS Med.* – 2005. – Vol. 2. – e73.

303. Gajria, D. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies / D. Gajria, S. Chandralapaty // *Expert Rev. Anticancer. Ther.* – 2011. – Vol. 11. – P. 263-275.

304. Zeller, C. Therapeutic modulation of epigenetic drivers of drug resistance in ovarian cancer / C. Zeller, R. Brown // *Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2010. – Vol. 2. – P. 319-329.

305. Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway / H.Y. Su, H.C. Lai, Y.W. Lin // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 127. – P. 555-567.

306. Histone acetylation in gene regulation / L. Verdone, E. Agricola, M. Caserta, E. Di Mauro // *Brief Funct. Genomic Proteomic.* – 2006. – Vol. 5. – P. 209-221.

307. Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy / C.P. Couturier, S. Ayyadury, P.U. Le et al. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – ID 3406.

308. Single-Cell RNA-Seq Reveals Cellular Hierarchies and Impaired Developmental Trajectories in Pediatric Ependymoma / J. Gojo, B. Englinger, L. Jiang et al. // *Cancer Cell.* – 2020. – Vol. 38. – P. 44–59.e9.

309. Tumor to normal single-cell mRNA comparisons reveal a pan-neuroblastoma cancer cell / G. Kildisiute, W.M. Kholosy, M.D. Young et al. // *Sci. Adv.* – 2021. – Vol. 7. – eabd3311.

310. A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors / C. Cortina, G. Turon, D. Stork et al. // *EMBO Mol. Med.* – 2017. – Vol. 9. – P. 869-879.

311. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-

based chemotherapy for breast cancers / T. Tanei, K. Morimoto, K. Shimazu et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15 (12). – P. 4234-4241.

312. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells / F. Yu, H. Yao, P. Zhu et al. // *Cell.* – 2007. – Vol. 131 (6). – P. 1109-1123.

313. Pierfrancesco, T. Loss of BRCA1 function increases the antitumor activity of cisplatin against human breast cancer xenografts in vivo / T. Pierfrancesco, M. T. Di Martino, M. Ventura et al. // *Cancer Biology and Therapy.* – 2009. – Vol. 8(7). – P. 648-653.

314. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51 / S.N. Silva, M. Tomar, C. Paulo et al. // *Cancer Epidemiol.* – 2010. – Vol. 34 (1). – P. 85-92.

315. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin / O. Kovalchuk, J. Filkowski, J. Meservy et al. // *Mol. Cancer Ther.*, - 2008. – Vol. 7 (7). – P. 2152-2159.

316. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1 / Z. Liang, H. Wu, J. Xia et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 79 (6). – P. 817-824

317. MiR-342 is associated with estrogen receptor- α expression and response to tamoxifen in breast cancer / Y.-J. He, J.-Z. Wu, M.-H. Ji // *Exp. Ther. Med.* – 2013. – Vol. 5 (3). – P. 813-818.

318. Muluhngwi, O. Roles for miRNAs in endocrine resistance in breast cancer / P. Muluhngwi, C.M. Klinge // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2015. – Vol. 22 (5). – P. R279-R300.

319. MiR-129-5p is downregulated in breast cancer cells partly due to promoter H3K27m3 modification and regulates epithelial-mesenchymal transition

and multi-drug resistance / Q.X. Luan, B.G. Zhang, X.J. Li, M.Y. Guo // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2016. – Vol. 20 (20). – P. 4257-4265

320. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents / D.R. Cochrane, N.S. Spoelstra, E.N. Howe et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8 (5). – P. 1055-1066.

321. MicroRNA-125b confers the resistance of breast Cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression / M. Zhou, Z. Liu, Y. Zhao et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285 (28). – P. 21496-21507

322. MiR-218 regulates cisplatin chemosensitivity in breast cancer by targeting BRCA1 / X. He, X. Xiao, L. Dong et al. // *Tumour Biol.* – 2015. – Vol. 36 (3). – P. 2065-2075

323. 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.

324. Sima, L. Targeted therapy and drug resistance in triple-negative breast cancer: the EGFR axis / L. Sima // *Biochem. Soc. Trans.* – 2020. – Vol. 48 (2). – P. 657-665.

325. Сравнительный морфологический анализ нефротоксичности доксорубицина и наноструктурированного доксорубицина 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.

326. A targetable EGFR-dependent tumor-initiating program in breast cancer / P. Savage, A. Blanchet-Cohen, T. Revil et al. // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 21. – P. 1140-1149.

327. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer / B. Corkery, J. Crown, M. Clynes, N. O'Donovan // *Ann. Oncol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 862-867.

328. Oral Methioninase Inhibits Recurrence in a PDOX Mouse Model of Aggressive Triple-negative Breast Cancer / H.I. Lim, K. Hamada, J. Yamamoto // *In vivo.* – 2020. – Vol. 34(5). – P. 2281-2286.

329. 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.

330. 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.

331. Programmed death-ligand 1 signaling pathway involves in bladder cancer growth and progression/ E.A. 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.

332. 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.

333. 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.

334. Prognostic Role of *FGFR3* Expression Status and Tumor-Related MicroRNAs Level in Association with PD-L1 Expression in Primary Luminal Non-Muscular Invasive Bladder Carcinoma / E. Blinova, A. Buzdin, D. Enikeev et al. // Life. – 2020. – Vol. – 10. – P. 305.

335. 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 / E. Blinova, D. Enikeev, D. Roshchin et al. // Cancers. – 2020. – Vol. 12(5). – P. 1-16.

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