

**ФРОЛОВА ДАРЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА**

**КЛИНИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИНА D  
ПРИ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Иваново – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель**

доктор медицинских наук, профессор **Громова Ольга Алексеевна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Шабанов Петр Дмитриевич**  
профессор кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор **Ших Евгения Валерьевна**  
директор Института профессионального образования, заведующий кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Ведущая организация** – федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.01 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте: [www.rsmu.ru](http://www.rsmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук,  
профессор



**Духанин Александр Сергеевич**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность научного исследования**

Рак молочной железы (РМЖ) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин не только в России, но и в мире. По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется более 10 млн новых случаев РМЖ. По данным ВОЗ за 2020 г., РМЖ диагностирован у 2,3 млн человек в мире, а к концу 2020 г. насчитывалось 7,8 млн женщин, у которых за последние пять лет был установлен РМЖ. В структуре онкологических новообразований в России за 2020 г. РМЖ занимал лидирующую позицию, его частота составляла 21,7 % (Каприн А. Д., Старинский В. В., 2021). В России за 2020 год было зарегистрировано 556 тыс. новых случаев заболевания раком.

Изучение противоопухолевых эффектов витамина D (VD) на опухолевые клетки молочной железы (МЖ) является важным направлением в клинической фармакологии, открывающим новые перспективы для решения вопроса профилактики РМЖ и возможного предотвращения развития и прогрессирования злокачественного новообразования. Современные представления о VD как о стероидном гормоне привели к переоценке его роли в организме человека, нарушение которых может запускать избыточную клеточную пролиферацию, усиление неоангиогенеза и снижение апоптоза (Autier P. et al., 2014).

### **Степень разработанности проблемы**

В лаборатории радиационной фармакологии на базе МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России – проведен ряд исследований по изучению VD, в частности, исследовано его влияние на рост и метастазирование злокачественной опухоли на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса (КЛЛ) у мышей-гибридов F<sub>1</sub> (СВА×С<sub>57</sub>В1<sub>6</sub>). Исследована фармакокинетика различных форм холекальциферола после приема одного из следующих препаратов: «Аквадетрим» (водный раствор,

содержащий в 1 мл 375 мкг холекальциферола (действующее вещество), № 014088/01, MEDANA PHARMA, Польша), «Вигантол» (масляный раствор: в 1 мл 500 мкг холекальциферола, № 011712/01, MERCK KGaA, Германия) и «Ультра-Д» (БАД, капсула, содержащая 25 мкг холекальциферола, ORION PHARMA, Финляндия) однократно в дозе 10 000 МЕ (250 мкг холекальциферола). Эффективность препаратов изучалась после многокамерного и бескамерного фармакокинетического анализа. Исследовались хемотранскриптомные дозозависимые эффекты кальцитриола на транскрипцию 12 700 аннотированных генов человека в опухолевых клетках линии MCF7 РМЖ. Проведен корреляционный анализ между содержанием метаболита VD 25(OH)D, показателями активности перекисного окисления липидов и прогрессированием РМЖ у женщин. У пациенток со злокачественной опухолью МЖ и недостаточностью или дефицитом VD определена эффективная физиологическая доза 4000 МЕ/сут холекальциферола.

**Цель научного исследования** – оценить возможности влияния метаболитов витамина D на предупреждение возникновения и прогрессирования злокачественной опухоли молочной железы.

#### **Задачи научного исследования**

1. Оценить противоопухолевые эффекты холекальциферола в эксперименте на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F1 (CBA×C57Bl6).

2. Провести анализ особенностей фармакокинетики фармакологической субстанции холекальциферола, заключенной в разные формы (масляный, водный раствор, капсула), у здоровых женщин в возрасте от 24 до 53 лет путем установления концентрации метаболитов 25(OH)D, 1,25(OH)D и выбрать оптимальный препарат.

3. Методом хемотранскриптомного анализа определить действие разных доз витамина D на экспрессию генов, влияющих на опухолевый рост

в клетках линии MCF7, по сравнению с действием неизмененных клеток – предшественников нейронов NPC.

4. Провести корреляционный анализ между содержанием метаболита 25(OH)D, с показателями активности перекисного окисления липидов и прогрессированием рака молочной железы разных молекулярных подтипов опухолей у женщин.

5. Определить оптимальную суточную дозу холекальциферола (препарата «Аквадетрим») для пациенток с раком молочной железы и женщин с риском развития заболеваний молочной железы.

### **Научная новизна исследования**

Впервые экспериментально показана вовлеченность витамина D в противоопухолевые процессы на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F1 (CBA×C57Bl6) при действии холекальциферола в дозе 5 мкг/кг/сут. Показано снижение метастатической активности злокачественного процесса.

Впервые проведен анализ особенностей фармакокинетики препаратов витамина D в разных формах, который показал, что любое из исследованных лекарственных средств обеспечивает достаточно стабильную концентрацию 25(OH)D в организме при однократном суточном приеме 10 000 МЕ.

Впервые выполнен хемотранскриптомный анализ воздействия витамина D на линию клеток-MCF7 опухоли молочной железы.

Впервые установлено, что снижение уровня промежуточного метаболита витамина D – 25(OH)D в сыворотке крови не более 18,9 нг/мл является признаком прогрессирования рака молочной железы независимо от молекулярного подтипа и потребления витамина D.

Впервые определена оптимальная доза холекальциферола 4000 МЕ/сут в течение шести месяцев ежедневного приема у пациенток с недостаточностью/дефицитом витамина D, со злокачественной опухолью молочной железы, как безопасная и эффективная на основании положительной динамики концентраций 25(OH)D, показателей перекисного

окисления липидов, биохимических параметров, иммуногистохимических и клинических показателей.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость исследования**

Полученные данные дополняют и расширяют имеющиеся сведения о противоопухолевых эффектах витамина D, в частности о его влиянии на прогрессирование рака молочной железы. Предложены эффективные лечебные дозы пациенткам со злокачественной опухолью молочной железы при дефиците или недостаточности витамина D. Выделены преимущества определения промежуточного метаболита витамина D – 25(OH)D у женщин со злокачественной опухолью молочной железы. Определены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры GO.

### **Методы исследования и его дизайн**

В диссертационной работе применялись физиологические, иммуногистохимические, хемотранскриптомные, клинико-лабораторные методы. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики. Исследование с использованием животных выполнено в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Теоретической и методологической основой исследования послужили множественные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме. В базе данных Gene Expression Omnibus накоплены результаты более чем 160 000 транскриптомных исследований (более 50 000 терабайт транскриптомных данных). С использованием новейших методов искусственного интеллекта для анализа «сверхбольших данных» (big data) в Институте фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН был разработан метод хемотранскриптомного анализа эффектов разных доз кальцитриола на опухолевые клетки линии MCF7.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Исследование эффектов холекальциферола на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F<sub>1</sub> (СВА×С<sub>57</sub>В1<sub>6</sub>) показало наличие противоопухолевого эффекта. При интрагастральном введении холекальциферол достоверно подавлял процессы метастазирования перевиваемой карциномы лёгких Льюиса (увеличение индекса ингибирования метастазирования на 35–40 %,  $p < 0,05$ ).

2. Дифференциальный хемотранскриптомный анализ дозозависимого воздействия витамина D на клетки опухоли молочной железы (линия MCF7) по сравнению с контролем (линия клеток-предшественников нейронов NPC) показал достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры GO. Витамин D в существенной мере подавляет деление именно опухолевых клеток, стимулирует экспрессию генов, поддерживающих положительную регуляцию клеточной дифференциации.

3. Женщины со злокачественной опухолью молочной железы имеют низкую обеспеченность витамином D (менее 30 нг/мл). При содержании промежуточного метаболита витамина D – 25(OH)D не более 18,9 нг/мл диагностируется прогрессирование рака молочной железы (AUC = 0,914).

4. Коррекция дефицита витамина D у женщин с раком молочной железы проводилась приемом препарата «Аквдетрим» (действующее вещество – холекальциферол, водный раствор, № 014088/01, производитель – Польша) в суточной дозе 4000 МЕ в течение шести месяцев с последующим снижением суточной дозы до 2000 МЕ для достижения и поддержания адекватного уровня витамина D 30–100 нг/мл (75–250 нмоль/л) в крови, что позволило добиться снижения показателей перекисного окисления липидов, уровня десквамированных эндотелиальных клеток как маркеров восстановления гомеостаза процессов окисления и эндотелиальной функции сосудов.

5. Восстановление физиологической обеспеченности витамином D у женщин с раком молочной железы улучшает качество их жизни, не ухудшая показатели эффективности проведенного лечения.

## **Степень достоверности полученных результатов**

Полученные результаты свидетельствуют о достижении поставленной цели и задач исследования. Достоверность подтверждается достаточным объемом лабораторных и клинических данных, которые позволили получить статистически значимые результаты с использованием современных методов статистической обработки. Для подготовки обзора использована современная и актуальная литература по теме диссертационного исследования.

## **Апробация результатов исследования**

Результаты исследования были представлены на заседании кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России. Основные результаты были доложены и обсуждены на IV Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Онкологические заболевания: профилактика, ранняя диагностика и лечение» (Иваново, 2018), VI междисциплинарном форуме III национальный конгресс «Онкология репродуктивных органов» (Москва, 2018), V национальном научно-образовательном конгрессе «Онкологические проблемы от менархе до постменопаузы» (Москва, 2020), VII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 2021).

## **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 19 работ, из которых 4 – в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России (3 – по специальности, 1 в списке журналов, включенных в международную базу данных SCOPUS).

## **Личный вклад автора**

Представленные данные литературы по теме диссертационной работы, экспериментальное исследование, набор клинического материала, анализ и обобщение полученных результатов исследования получены при непосредственном участии автора. Автор участвовала во всех этапах

исследования, от экспериментально-теоретической реализации поставленных задач до обсуждения результатов в научных публикациях. Автор принимала непосредственное участие в подготовке публикации статей и тезисов докладов.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность гинекологического и поликлинического отделений ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», а также в гинекологические отделения городской клинической больницы №8 г. Иваново.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, пять глав собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации. Список использованной литературы содержит 172 источника, из них 35 отечественных и 137 иностранных. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 21 рисунком.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование состояло из экспериментальной – *in vivo* (на экспериментальных животных), *in silico* (с использованием хемореактного моделирования воздействия на клеточные структуры нейрональных клеток линии NPC и на опухолевые клетки молочной железы линии MCF7), а также клинической частей.

Исследуемые препараты: «Аквадетрим» (водный раствор, содержащий в 1 мл 375 мкг холекальциферола (действующее вещество), № 014088/01, MEDANA PHARMA АО «АКРИХИН», Польша), «Вигантол» (масляный раствор: в 1 мл 500 мкг холекальциферола, № 011712/01, MERCK KGaA, Германия) и «Ультра-Д» (БАД, капсула, содержащая 25 мкг холекальциферола, ORION PHARMA, Финляндия).

Эксперименты *in vivo* проводили в стерильных условиях на экспериментальных животных – мышах-гибридах F<sub>1</sub> (СВА×С<sub>57</sub>Вl<sub>6</sub>) (2,5–3 мес., масса 26–29 г) на базе МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России. В состав модели КЛЛ входила опухолевая ткань, которая извлечена из банка опухолевых материалов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Перевивку КЛЛ выполняли с помощью подкожного введения 0,1 мл суспензии (1,9×10<sup>6</sup> клеток) на внешнюю поверхность правого бедра. После подсадки (перевивки) эпидермоидной КЛЛ животные были разделены на две группы: опытную и контрольную – по 15 особей в каждой. После перевивки КЛЛ животным опытной группы со 2-е по 20-е сутки ежедневно, однократно, интрагастрально вводили раствор холекальциферола в объёме 0,1 мл на 10 г массы тела (в расчете 5 мкг/кг/сут). По такой же схеме, таким же путём и в таком же объёме особям контрольной группы вводили дистиллированную воду. Воздействие холекальциферола на рост опухоли и метастазирование КЛЛ оценивали с использованием морфометрических методов (Westerdahl J., et al., 2000). Из опыта животных выводили на 21-е сутки после перевивки КЛЛ методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Извлекали лёгкие и фиксировали их 24 часа в жидкости Буэна, затем считывали на их поверхности число крупных и малых метастазов. Проводили статистическую проверку межгрупповых различий числа метастазов в легочной ткани и производили расчёт индекса ингибирования метастазирования (ИИМ). По экспоненциальным кривым судили о продолжительности задержки роста новообразований и, соответственно, о противоопухолевом действии.

Эксперименты *in silico* выполнены в Институте фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН. Для осуществления хемотранскриптомного моделирования применялись теории хемографов методологии хемоинформационного (Torshin I. Yu., Rudakov K. V., 2022) и хемореактомного анализа (Громова О. А., Торшин И. Ю. и др., 2018).

Клинический раздел исследования включал данные 220 пациенток с РМЖ I–IIIc стадии (T1N0M0-T4N3M0) были разделены на группы: в I группу

вошли 160 женщин с РМЖ (С 50 по МКБ-10) и дефицитом или недостаточностью VD (Е 55). В зависимости от приема холекальциферола исследуемые были разделены на подгруппы: 1 подгруппа – 80 пациенток с РМЖ и дефицитом VD принимали VD. В зависимости от суточной дозы холекальциферола больные 1-й подгруппы были разделены на подгруппы: 1a – 40 женщин принимали холекальциферол в дозе 4000 МЕ/сут, 1b – 40 пациенток получали 10 000 МЕ/сут, в подгруппу 2 вошли 80 пациенток, которые не принимали препарат VD. В контрольную группу вошли 60 женщин без патологии МЖ.

Пациенткам проводилось биохимическое определение уровней 25(OH)D и 1,25(OH)D по стандартным методикам (Иванова А. М., 2021) посредством хемилюминесцентного иммуноферментного анализа на микрочастицах (ARCHITECT i1000sr, Abbott Core Laboratory, США). Интенсивность ПОЛ в крови определяли методом индуцированной биохемилюминесценции. (Yagi K. et al., 1968). Количество клеток эндотелия, циркулирующих в крови, определяли методом J. Hladovec (1973).

Результаты клинического исследования обрабатывали с использованием методов математической статистики: производился расчет числовых характеристик случайных величин, проверка статистических гипотез на основе параметрических и непараметрических критериев. Для сравнения прогнозируемой и наблюдаемой частоты встречаемости исследуемых признаков применялись критерии  $\chi^2$ , T-критерий Вилкоксона, U – критерий Манна – Уитни и t-тест Стьюдента. Числовые показатели представлены в виде среднего арифметического и среднего квадратического отклонения ( $M \pm \sigma$ ). Использовали электронные таблицы Microsoft Excel (Microsoft Corp., США Statistica 10.0 Tibco, США). Анализ показателей ПОЛ, концентрации 25(OH)D, проводили с использованием ROC-анализа. Для представления результатов были применены новейшие методы анализа информативных численных параметров, определения метрических сгущений показателей биомедицинского исследования и построения метрических карт (Torshin I.

Yu., Rudakov K. V., 2015) с использованием программного пакета MEDSTUDY, разработанного в Федеральном исследовательском центре «Информатика и управление» РАН.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Воздействие холекальциферола с 13-х суток развития КЛЛ приводило к нарастающей тенденции торможения роста опухолей: индекс ТРО возрастал на 25–30% по сравнению с контролем/плацебо (табл. 1).

Таблица 1 – Индекс торможения роста опухоли в опытных группах (%)

| Срок наблюдения, сут | Опытная группа (холекальциферол, водный раствор) | Контрольная группа (дистиллированная вода) |
|----------------------|--|--|
| 7-е                  | 19,4   | 17,5                                       |
| 10-е                 | 23,0   | 26,5                                       |
| 13-е                 | 20,3   | 31,7                                       |
| 17-е                 | -2,9   | 9,0  |
| 21-е                 | 6,9  | 7,1  |

К 13-м суткам установлено статистически значимое снижение интенсивности скорости роста первичной опухоли на фоне приёма холекальциферола ( $p = 0,016$ ) (рис. 1).

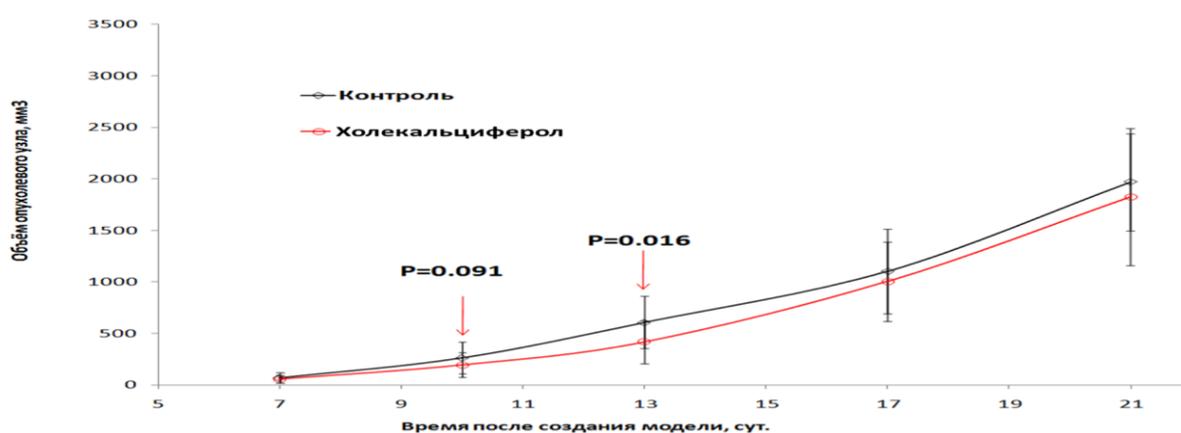


Рисунок 1 – Достоверные различия скорости роста первичной опухоли в экспериментальных группах

Отличия в динамике развития вторичных опухолей показали, что более выраженным было антиметастатическое действие холекальциферола (табл. 2).

Таблица 2 – Среднее число лёгочных метастазов на 21-е сутки роста карциномы лёгких Льюиса у экспериментальных животных

| Метастазирование  | Опытная группа<br>(холекальциферол, водный раствор) | Контрольная группа<br>(дистиллированная вода) |
|-------------------|---|---|
| Крупные метастазы | 9,2 ± 5,8   | 10,6 ± 12,9                                   |
| Малые метастазы   | 31,5 ± 15,1 *                                       | 54,5 ± 28,3                                   |
| Все метастазы     | 40,7 ± 17,3   | 65,1 ± 35,2                                   |

*Примечание.* \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (критерий Данна).

На рост крупных метастазов исследуемые препараты не влияли. Но в опытной группе наблюдались отчётливые признаки угнетения метастазирования – статистически значимое снижение числа малых метастазов, так что значение ИИМ достигало 35–40 % (рис. 2).

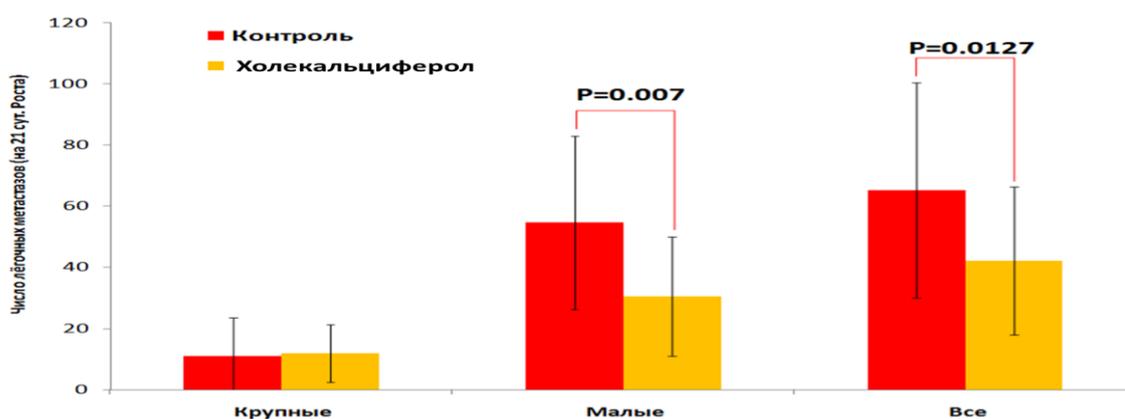


Рисунок 2 – Среднее число лёгочных метастазов на 21-е сутки роста карциномы лёгких Льюиса у экспериментальных животных между группами по t-тесту

Таким образом, при пероральном введении холекальциферола статистически значимо подавлялись процессы метастазирования перевиваемой КЛЛ.

Фармакокинетика фармакологических субстанций, заключенных в разные формы (масляный, водный раствор, капсула), имеет ряд отличий. По индивидуальным ФК-кривым выявлено, что при использовании водной формы холекальциферола – «Аквдетрима» получены более значимые кривые и самые высокие концентрации 25(OH)D, в то время как масляный раствор «Вигантола»

и капсулы «Ультра-Д» таких высоких концентраций 25(OH)D не показали (рис. 3).

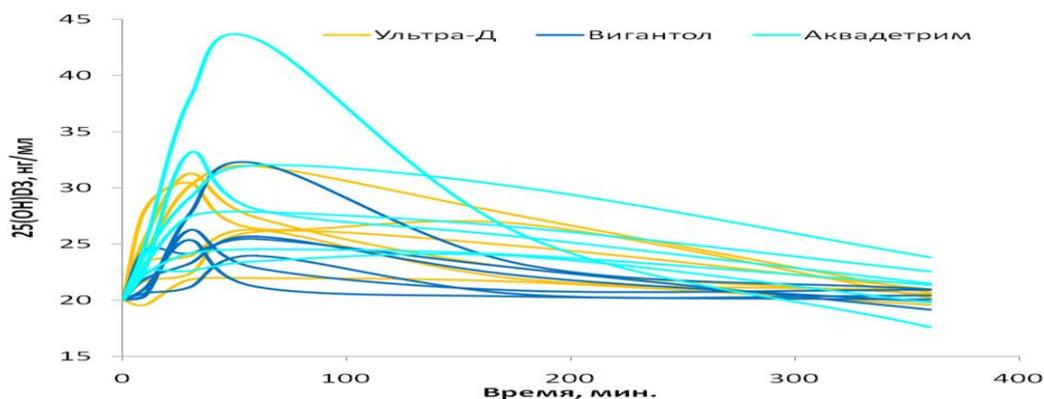


Рисунок 3. Индивидуальные фармакокинетические кривые, полученные после однократного приема холекальциферола в дозе 10 000 МЕ

Проведен анализ усреднённых ФК-кривых для оценки статистической значимости различных концентраций, полученных в разное время (рис. 4).

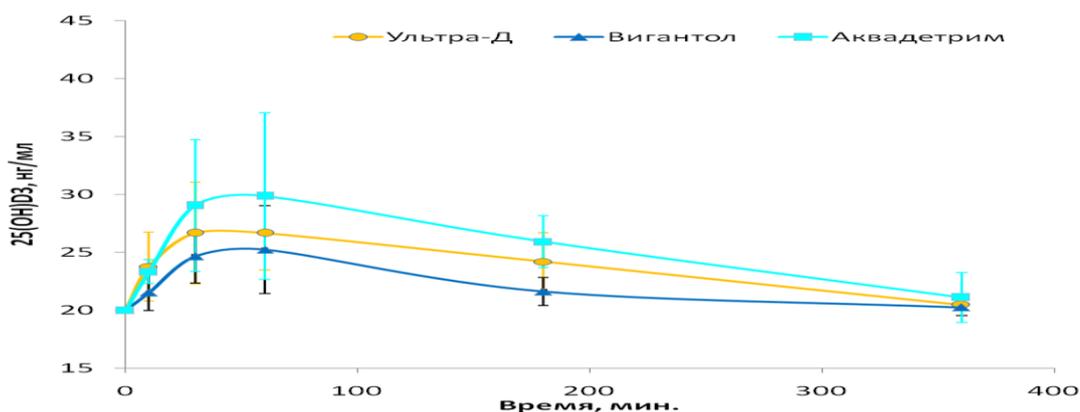


Рисунок 4 – Усреднённые фармакокинетические кривые (для каждой кривой однократный приём препаратов витамина D в дозе 10 000 МЕ)

Для расчёта фармакокинетических параметров проведен бескамерный анализ (табл. 3).

Таблица 3 – Фармакокинетические параметры бескамерной модели препаратов витамина D

| Параметр                     | Комментарий                                       |
|------------------------------|---|
| $C_{max}$ , нг/мл            | Максимальная концентрация VD                      |
| $t_{max}$ , мин              | Время достижения максимальной концентрации        |
| $C_{last}$ , нг/мл           | Последняя измеренная концентрация                 |
| AUC <sub>t</sub> , нг/мл*мин | Площадь под кривой (характеризует биодоступность) |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| MRTt, мин             | Среднее время удержания – среднее общее время выведения молекулы VD из препарата в крови после приёма в заданной дозе  |
| Lz, мин <sup>-1</sup> | Наклон участка финального выведения (последние 3–4 точки ФК-кривой)  |
| T1/2, ч               | Период полувыведения – время, за которое из биосубстрата выводится половина принятого препарата  |
| CL, мл/мин            | Клиренс – объем биосубстрата (крови), из которого все молекулы VD удаляются за единицу времени   |
| V <sub>d</sub> , л    | Объем распределения – отношение общего содержания вещества в организме к его концентрации в исследуемом биосубстрате (крови), т. е. некий условный объем, в котором должно было бы распределиться данное вещество, если бы его концентрация везде была такой же, как в крови |

Полученные с помощью бескамерного анализа ФК-параметры свидетельствуют, что все три препарата имеют схожие показатели фармакокинетики:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{last}$ , MRTt, Lz, CL, Vd, при этом AUCt была статистически выше для холекальциферола в форме капсул по сравнению с масляным раствором. Самый высокий показатель AUCt был для холекальциферола в форме водного раствора (рис. 5).

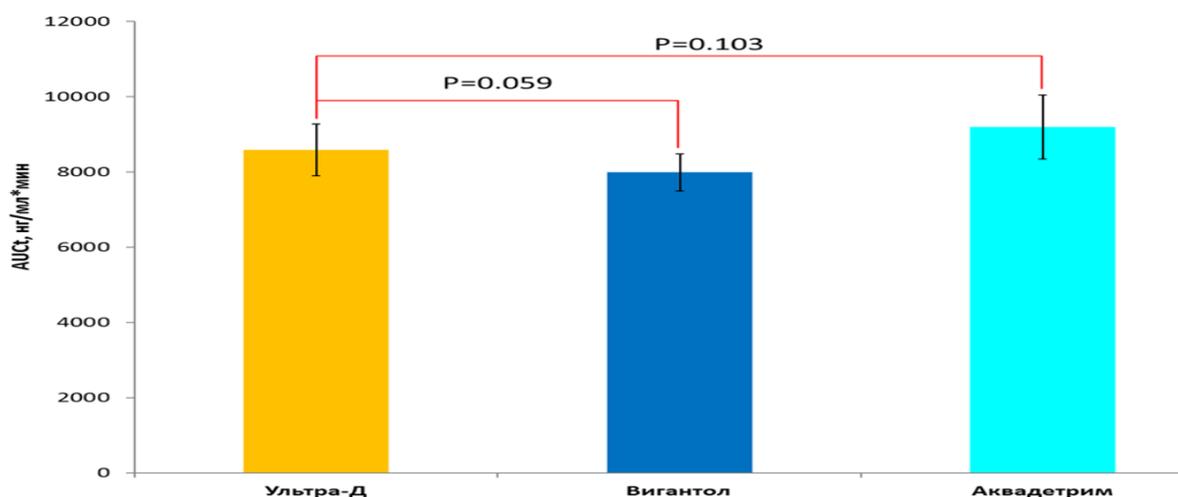


Рисунок 5 – Площадь под кривой (показатель AUCt) для холекальциферола в форме капсул, масляного и водного раствора ( $p < 0,05$ )

Несмотря на то, что любой из исследованных препаратов обеспечивает достаточно стабильную концентрацию 25(OH)D в организме, при однократном суточном приеме повышает приверженность к приему VD, для

дальнейшего исследования были исключены БАД «Ультра-Д» и «Вигантол» и был выбран «Аквдетрим» в форме водного раствора для приема внутрь.

Получена комплексная дифференциальная картина возможного воздействия кальцитриола на транскриптом опухолевых и нормальных клеток человека. Для установления более детальных закономерностей в группах генов, экспрессия которых дозозависимо повышалась или снижалась при моделировании воздействия VD, был проведен сравнительный системно-биологический анализ четырёх списков генов. Анализ профилей частоты встречаемости генов девяти функциональных групп (рис. 6) позволяет утверждать, что в опухолевых клетках MCF7 систематически снижается экспрессия генов из групп «энергетический метаболизм», «деление/пролиферация клеток», «ремонт ДНК», «синтез и транспорт белков», «поддержание хронического воспаления».

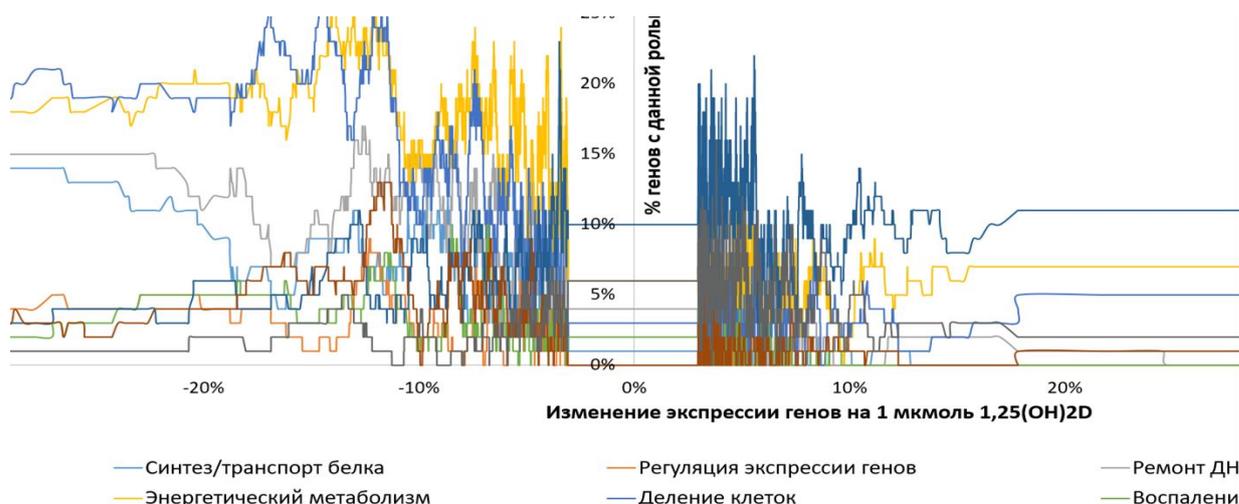


Рисунок 6 – Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для опухолевых клеток MCF7

Под воздействием VD в линии NPC нейрональных клеток может изменяться транскрипция гораздо большего числа генов (4465 генов), чем в линии MCF7 опухолевых клеток (3620 генов) (рис. 7.)

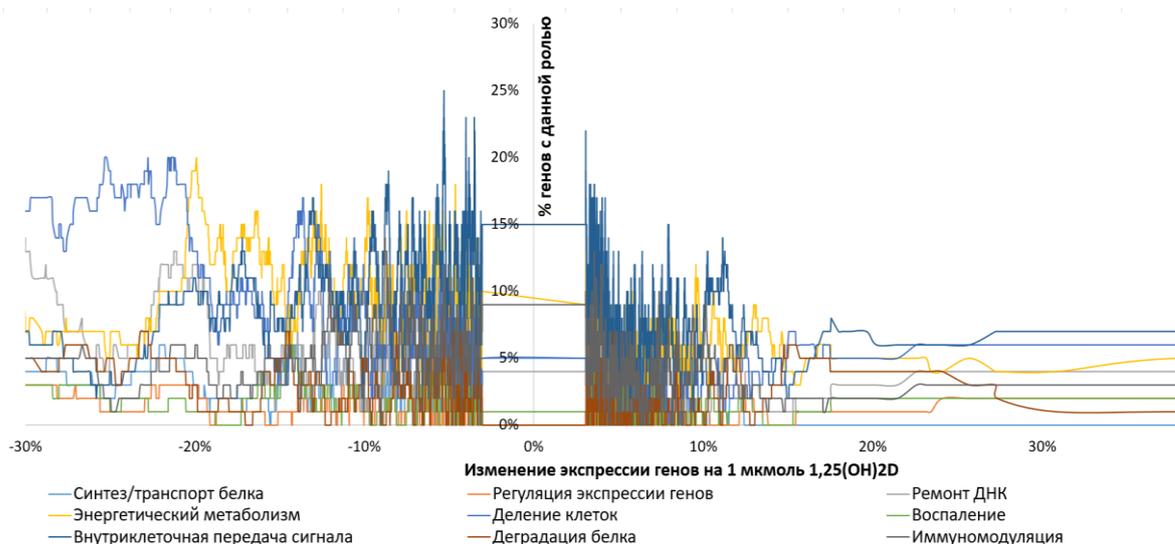


Рисунок 7 – Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для нейрональных клеток NPC

Под воздействием VD происходит выраженное ослабление экспрессии генов, вовлеченных в энергетический метаболизм (482 гена, нейрональные клетки – только 20 генов, в том числе кодирующих митохондриальные комплексы дыхательной цепи, ферменты окислительного фосфорилирования, метаболизма глюкозо-6-фосфата, НАДФ-дегидрогеназу), что соответствует *снижению обеспеченности опухолевых клеток АТФ*. Иначе говоря, VD дифференцированно уменьшает энергообеспеченность именно опухолевых клеток, что способствует снижению интенсивности процессов пролиферации (387 генов, нейрональные – 324 гена).

При приеме VD подавляется экспрессия гена ATR (в среднем на 8 % на 1 мкмоль VD), кодирующего одноименный белок ATR – серин/треониновую протеинкиназу. ATR фосфорилирует белки BRCA1, CHEK1, MCM2, RAD17, RPA2, SMC1, p53/TP53, гистоны H2AX/H2AFX, тем самым регулируя механизм ответа на повреждение ДНК (Zhang J. et al., 2005).

Подавление транскрипции генов CSNK1A1 (казеинкиназа-1, альфа-1), CSK (-32,45 % на 1 мкМ), MYCBP (-20,41 % на 1 мкМ) и MTHFD1 (-29,55 % на 1 мкМ) соответствует эффекту противоопухолевых средств. VD приводит к *снижению транскрипции генов, участвующих в метаболизме стероидных гормонов*. Ген ZDHHC7 (-24,25 % на 1 мкМ) необходим для

пальмитоилирования рецепторов эстрогенов (ESR1), прогестерона (PGR) и андрогенов (AR), он направляет их в плазматическую мембрану клетки, усиливая их действие (Pedram A., Razandi M., 2012). При этом подавляется экспрессия гена HSD17B10 (-23,67 % на 1 мкМ), кодирующего гидроксистероид-17-бета дегидрогеназу 10, которая катализирует 17-бета-окисление андрогенов и эстрогенов (рис. 8).

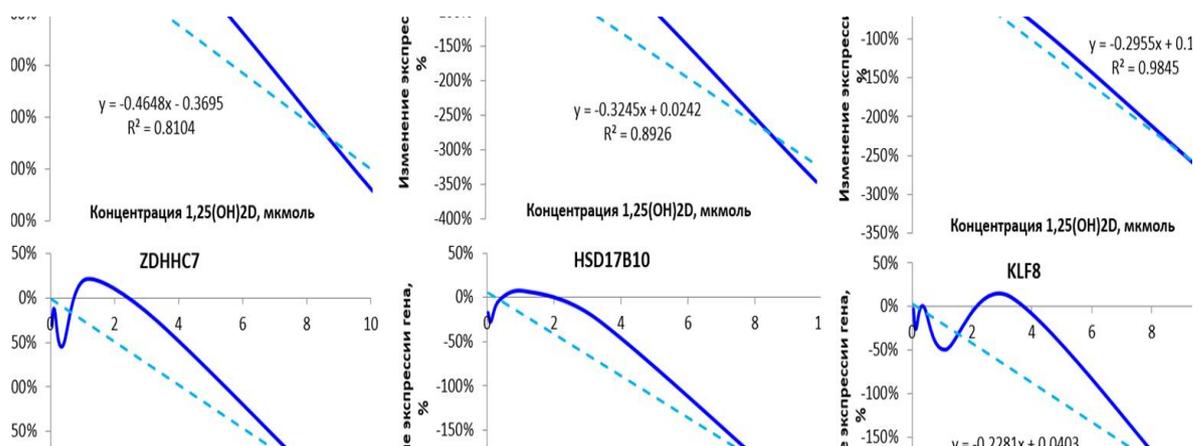


Рисунок 8 – Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D

VD способствует *повышению транскрипции генов, кодирующих белки с известным противоопухолевым действием*: RASSF4 (12,50 % на 1 мкМ, белок «Ras-ассоциированный домен 4» – супрессор роста опухолей, приводящий к остановке цикла деления клетки и апоптозу (Eckfeld K., Hesson L. et al., 2004), DDIT4 (14,52 % на 1 мкМ, «транскрипт-4, индуцируемый повреждением ДНК») подавляет mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB, активирует апоптоз в ответ на повреждение ДНК (Gery S., Park D. J. et al., 2007) (рис. 9).

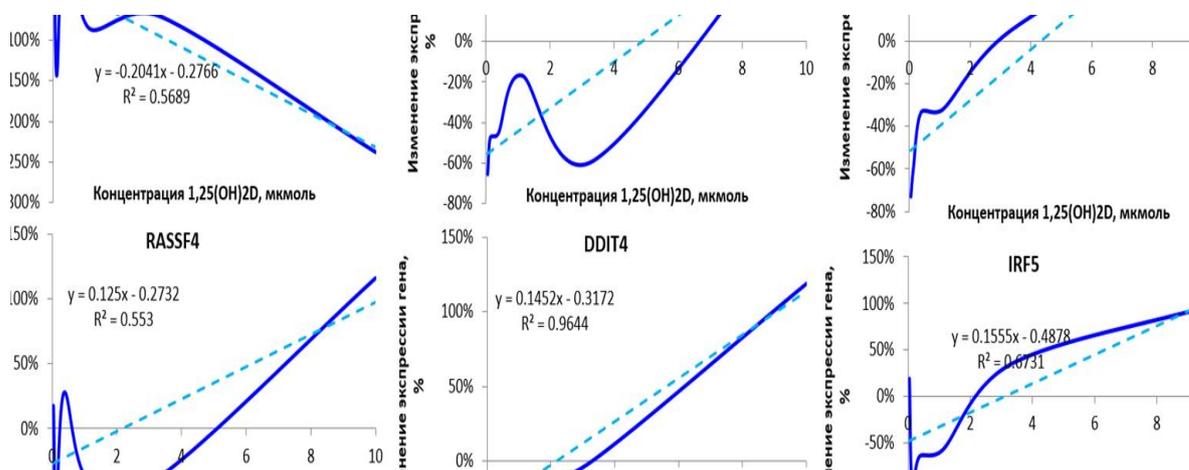


Рисунок 9 – Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D

Изучено влияние противоопухолевого действия VD на прогрессирование РМЖ. У 8 из 160 пациенток с РМЖ была установлена прогрессия заболевания. Они существенно различались по 10 клиническим и биохимическим показателям (табл. 4). При прогрессировании опухоли наблюдались «гиперэстрогеновый фенотип», включающий чистую кожу при отсутствии акне, наличие предменструального синдрома, обильных и длительных менструаций, а также локализация опухоли слева, серый или голубой, но не карий цвет глаз (табл. 4). Цвет радужной оболочки глаз ассоциирован с наличием определенных нуклеотидных вариантов генов, кодирующих цитохромы P450 (Lear J. T. et al., 1996; Torshin I. Yu., 2009), поэтому ассоциация между цветом глаз и риском прогрессирования опухолевых заболеваний имеет генетическую природу; в частности, у обследуемых с голубыми глазами наличие варианта цитохрома CYP2D6-EM соответствовало повышенному риску развития опухолей.

Таблица 4 – Показатели, отличающие пациенток с прогрессированием рака молочной железы от больных со стабильным течением

| Признак  | Прогрессия    | Стабильные    | p      |
|--|---------------|---------------|--------|
| 25(OH)D3, нг/мл, V3, M ± σ                       | 17,10 ± 1,55  | 43,10 ± 23,48 | 0,0011 |
| Билюминисценция Tg мВ/сек, V2, M ± σ             | -28,25 ± 1,77 | -41,32 ± 9,84 | 0,0090 |
| Предменструальный синдром, %                     | 100,0         | 75,0          | 0,0181 |
| Менструации, болезненные, длительные, обильные % | 100,0         | 87,0          | 0,0211 |
| Акне, %  | 0,0           | 6,0           | 0,0224 |
| Локализация опухоли слева, %                     | 100,0         | 55,0          | 0,0230 |
| Высокий уровень стресса, %                       | 100,0         | 80,0          | 0,0241 |
| Билюминисценция S мВ/сек, V2, M ± σ              | 797 ± 37      | 934 ± 146     | 0,0245 |
| Билюминисценция I max мВ, V2, M ± σ              | 4,15 ± 0,71   | 6,66 ± 1,17   | 0,0255 |
| Билюминисценция I max мВ, V1, M ± σ              | 734 ± 72      | 902 ± 132     | 0,0498 |
| Длительность менструации, сут, M ± σ             | 7,00 ± 1,00   | 5,43 ± 1,38   | 0,0516 |
| 25(OH)D3, нг/мл, V2, M ± σ                       | 27,06 ± 6,67  | 41,42 ± 23,87 | 0,0532 |

|                                       |               |               |        |
|---------------------------------------|---------------|---------------|--------|
| Биолюминисценция Tg мВ/сек, V1, M ± σ | -25,50 ± 4,95 | -34,32 ± 8,99 | 0,0698 |
| Голубые или серые глаза, %            | 100,0         | 65,0          | 0,0734 |
| Потребление пива и алкоголя, %        | 67,0          | 21,0          | 0,0738 |

*Примечание:* признаки упорядочены по убыванию информативности, т. е. по возрастанию статистической значимости различий между группами.

По результатам ROC-анализа было установлено, что при концентрации 25(OH)D не более 18,9 нг/мл диагностируется прогрессирование заболевания; специфичность и точность данного предиктора составили 77,3 и 100,0 соответственно; AUC – 0,914 (рис. 10).

Проведен корреляционный анализ динамики концентраций 25(OH)D с оценкой ПОЛ, определением количества десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК). Всего исследованы три подгруппы пациенток: 1-я (n = 40) – РМЖ, 4000 МЕ/сут, 6 мес, 2-я (n = 40) – РМЖ, 10 000 МЕ/сут, 6 мес, контроль (n = 80) – РМЖ, VD не назначался. В сыворотке крови у всех обследованных определяли уровень VD 25(OH)D, ПОЛ и количество ДЭК в исходном состоянии и через 6 месяцев ежедневного приема холекальциферола (табл. 5).

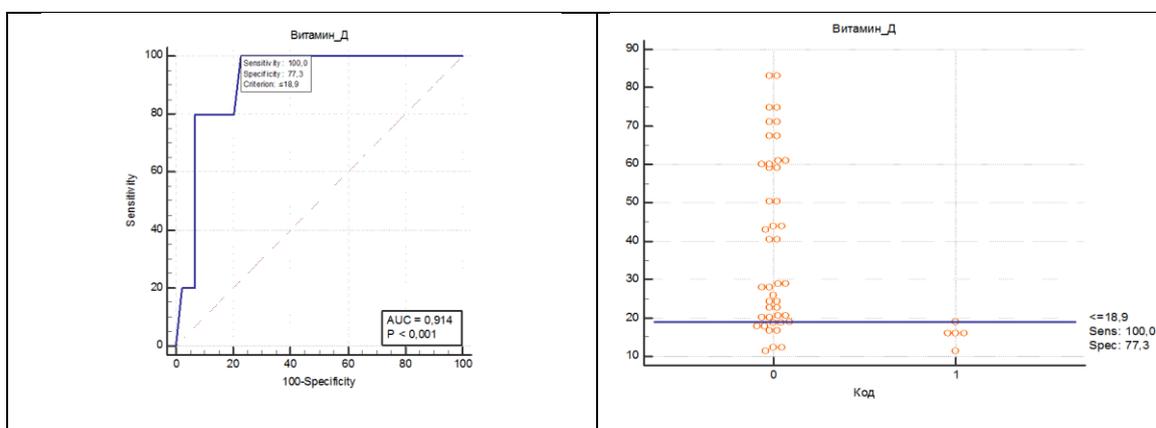


Рисунок 10 – Концентрация промежуточного метаболита витамина 25(OH)D в крови больных РМЖ на третьем визите (V3)

Таблица 5 – Показатели сыворотки крови обследованных

| Показатели | 1-я группа<br>(n = 40) |              | 2-я группа<br>(n = 40) |              | Контроль<br>(n = 80) |
|------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|----------------------|
|            | исх.                   | через 6 мес. | исх.                   | через 6 мес. |                      |
| 25(OH)D,   | 16                     | 26           | 29,35 [19,55;          | 49,83        | 24,52                |

|                                      |  |                                   |                                     |                                   |                      |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| нг/мл                                | [11,73;<br>20,2]                           | [23,7; 32]                        | 31]                                 | [31,77; 58,57]                    | [19,79;<br>34,89]    |
| ДЭК<br>(ДЭ<br>шт./камере<br>Горяева) | 6 [4,25; 7] <sup>x</sup>                   | 4,5 [4; 5,75]                     | 11<br>[9; 11] <sup>xx</sup>         | 16 [14; 16]                       | 6 [4; 9]             |
| Imax, мВ                             | 127<br>[125; 140] <sup>xx</sup>            | 112<br>[109; 117] <sup>*k</sup>   | 121,5<br>[110,25; 140] <sup>x</sup> | 129,5<br>[114,5; 151]             | 128<br>[121; 147]    |
| S, мВ/сек                            | 1380<br>[1199;<br>1423] <sup>*kk</sup>     | 1377<br>[1175; 1425] <sup>*</sup> | 835<br>[688; 886] <sup>*kk x</sup>  | 864,5<br>[824; 895]               | 1033<br>[936; 1185]  |
| Tg альфа,<br>мВ/сек                  | -29,25<br>[-31,13; -<br>24] <sup>*xx</sup> | -34,75<br>[-42,13;<br>-32]        | -26,5<br>[-35; -24,5] <sup>x</sup>  | -35,25<br>[-38,25;<br>-34,5]      | -36<br>[-42; -28]    |
| МДА,<br>нмоль/мл                     | 3,91<br>[3,08; 4,43]                       | 4 [3,32;<br>4,05] <sup>*</sup>    | 3,16<br>[2,51; 4] <sup>x</sup>      | 4,21<br>[3,18; 4,84] <sup>*</sup> | 2,86<br>[2,48; 3,42] |

*Примечание:* статистическая значимость различий: \* – с группой контроля,  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ ; k – между группами пациенток, принимающими препарат в дозе 4000 и 10 000 МЕ,  $k < 0,05$ ; kk –  $p < 0,001$ ; x – между исходными показателями и через 6 месяцев приема VD,  $p < 0,05$ ; xx –  $p < 0,001$ .

Суточная доза холекальциферола 10 000 МЕ/сут, у пациенток с РМЖ способствовала повышению активности ПОЛ и формированию эндотелиальной дисфункции. Из двух изученных вариантов нами определена наиболее оптимальная лечебная доза приема холекальциферола 4000 МЕ/сут у пациенток с недостаточностью или дефицитом VD со злокачественным новообразованием МЖ в анамнезе.

## ВЫВОДЫ

1. Холекальциферол в дозе 0,1 мл на 10 г массы тела (200 МЕ/10 г) оказывает противоопухолевое действие на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F<sub>1</sub>, подавляя процессы метастазирования и тормозя развитие заболевания.
2. Различные формы (масляный, водный раствор, капсулы) холекальциферола имели сходные фармакокинетические показатели

- (кроме AUCt) и обеспечивали равный прирост концентрации 25(OH)D в крови женщин в возрасте 24–53 года при однократном приеме 10 000 МЕ.
3. Хемотранскриптомный анализ клеток опухоли молочной железы (линии MCF7) в условиях их инкубации с кальцитриолом в течение 24 часов показал повышение экспрессии генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов), снижение экспрессии более 300 генов, ответственных за деление клеток, и более 100 генов, ответственных за воспаление, что тормозит рост опухоли.
  4. В клинических исследованиях у женщин с раком молочной железы установлены критерии его прогрессирования: содержание 25(OH)D не более 18,9 нг/мл, отсутствие акне, высокий уровень стресса, наличие постменструального синдрома, длительные (6 и более дней) обильные менструации, локализация опухоли слева, голубой или серый цвет глаз.
  5. Оптимальной суточной дозой препарата холекальциферола для пациенток с раком молочной железы является 4000 МЕ в сутки в течение шести месяцев, которая обеспечивает нормализацию показателей 25(OH)D, перекисного окисления липидов и десквамированных эндотелиальных клеток.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Полученные результаты о действии водного раствора холекальциферола позволили научно обосновать необходимость изучения обеспеченности витамином D пациенток со злокачественной опухолью молочной железы. Учитывая данные, что дефицит витамина D (не более 18,9 нг/мл) является значимым фактором риска развития рака молочной железы, следует рассматривать прием холекальциферола в эффективных и безопасных дозах как высокоэффективное и малотоксичное онкопротекторное средство, а также рекомендовать его для дальнейшего клинического изучения эффективности лечения пациенток со

злокачественной опухолью молочной железы и страдающих дефицитом/недостаточностью витамина D.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|            |   |
|------------|---|
| 1,25 (ОН)D | кальцитриол   |
| БАД        | биологически активная добавка   |
| VD         | витамин D   |
| ДЭК        | десквамированные эндотелиальные клетки  |
| КЛЛ        | карцинома легких Льюиса   |
| МЖ         | молочная железа   |
| ПОЛ        | перекисное окисление липидов  |
| РМЖ        | рак молочной железы   |
| ФК-кривые  | фармакокинетические кривые  |
| MCF7       | эпителиоподобная клеточная линия, полученная из карциномы протоков молочной железы человека |
| ME         | международные единицы   |
| Wnt        | сигнальный путь, регулирующий дифференцировку клеток  |

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

*Статьи в журналах, индексируемых Scopus, RSCI, Web of Science,  
из перечня ВАК:*

1. **Фролова, Д. Е. Витамин D и эстрогензависимые опухоли / Громова О. А., Торшин И. Ю., Фролова Д. Е., Лапочкина Н. П., Громов А. Н. // Гинекология. - 2018. - Т. 20. - № 1. - С. 23–30.**
2. **Фролова, Д. Е. Метрический анализ соотношений коморбидности между невынашиванием, эндометриозом, нарушениями менструального цикла и микронутриентной обеспеченностью в скрининге женщин репродуктивного возраста/ Торшин И. Ю., Громова О. А., Фролова Д. Е. и др. // Акушерство и гинекология. - 2019. - № 5. - С. 156-168.**
3. **Фролова, Д. Е. Метрический анализ данных по взаимосвязи между показателями микронутриентной обеспеченности и состоянием здоровья женщин 18–45 лет/ Торшин И. Ю., Лиманова О. А., Фролова Д. Е. и др.// Медицинский алфавит. - 2018. - Т. 2, - № 21 (358). - С. 6–19.**
4. **Фролова, Д.Е. Противовирусные эффекты витамина D как фактор повышения сопротивляемости папилломавирусной инфекции и опухолевым заболеваниям шейки матки / Громова О. А., Торшин И. Ю., Фролова Д. Е. и др. // Эффективная фармакотерапия. - 2018. - № 13. - С. 30–39.**

*В других изданиях*

5. **Фролова, Д. Е.** Влияние метаболитов витамина D на развитие рака молочной железы / Фролова Д. Е., Громова О. А., Торшин И. Ю., Лапочкина Н. П. // Исследования и практика в медицине. - 2018. - Т. 5, - № S1. - С. 86.
6. **Фролова, Д. Е.** О противовирусных эффектах витамина D / Громова О. А., Торшин И. Ю., Фролова Д. Е., Лапочкина Н. П., Лиманова О. А. // Медицинский совет.- 2020. - № 3. - С. 152–158.
7. **Фролова, Д. Е.** Анализ методов диагностики и лечения рака молочной железы у женщин молодого и среднего возраста / Пазухина А. А., Фролова Д. Е. // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы VII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Иваново, - 2021. - С. 123–125.
8. **Фролова, Д. Е.** Снижение промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D как предиктор прогрессирования рака молочной железы / Фролова Д. Е., Громова О. А., Лапочкина Н. П. // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы VII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Иваново, - 2021. - С.135-137.
9. **Фролова, Д. Е.** Особенности рака молочной железы у женщин молодого возраста /Филиппова А. И., Фролова Д. Е. // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы VI Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Иваново, 2020. - С. 224–226.
10. **Фролова, Д. Е.** Анализ показателей промежуточного метаболита витамина D у женщин молодого возраста, больных раком молочной железы / Фролова Д. Е., Егорова Д. Д., Лапочкина Н. П., Громова О. А. // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы V Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Иваново, - 2019. - С. 328–330.
11. **Фролова, Д. Е.** Влияние метаболитов витамина D на развитие рака молочной железы / Фролова Д. Е., Громова О. А., Лапочкина Н. П. // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека: материалы IV Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Иваново, - 2018. - С. 278–280.

12. Gromova O. A., Torshin I. Yu., **Frolova D. E.**, Filimonova M. V. Antitumor effects of combined use of vitamins B1, B6 AND B12 // Consilium medicum. Neurology and Rheumatology. 2018. № 1. С. 62.
13. **Фролова, Д. Е.** Противоопухолевые эффекты сочетанного применения витаминов В1, В6 и В12/ Громова О. А., Торшин И. Ю., Фролова Д. Е., Филимонова М. В. // Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum. - 2018. - № 1. - С. 62–66.
14. **Фролова, Д. Е.** Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках – предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека / Торшин И. Ю., Громова О. А., Фролова Д. Е. и др. // Фармакокинетика и фармакодинамика. - 2018. - № 2. - С. 35–51.
15. **Фролова, Д. Е.** Фармакокинетический анализ препаратов витамина D для перорального приема / Торшин И. Ю., Громова О. А., **Фролова Д. Е.** и др. // Фармакокинетика и фармакодинамика.- 2018. - № 3. - С. 57–64.
16. **Фролова, Д. Е.**, Возможности маммографии в диагностике рака молочной железы /Кильчевский А. А., Румянцева В. О., Фролова Д. Е., Лапочкина Н. П. // Актуальные вопросы профилактики, ранней диагностики, лечения и медицинской реабилитации больных с неинфекционными заболеваниями и травмами: Материалы V Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. Иваново. -2017. - С. 21–22.
17. **Фролова, Д. Е.** Возможности маммографии в диагностике гистологического типа рака молочной железы /Кильчевский А. А., Румянцева В. О., Лапочкина Н. П., Фролова Д. Е. // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека : Материалы III Всероссийской научно-образовательной конференции студентов и молодых ученых с международным участием в рамках XIII областного фестиваля «Молодые ученые – развитию Ивановской области». Иваново, -2017. - С. 273–274.
18. Пат. 2741232 Российская Федерация МПК<sup>51</sup> G01N 33/52. Способ прогнозирования прогрессирования рака молочной железы / Лапочкина Н.П., Громова О.А., Торшин И.Ю., Фролова Д.Е. ; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. № 2020125604 ; заявл. 27.07.2020 ; опубл. 22.12.21, Бюл. № 36. – 9 с.

19. Пат. 2762772 Российская Федерация МПК<sup>51</sup> А61В 5/00, G01N 33/82. Способ выбора лечебной дозы приема холекальциферола для пациенток с недостаточностью или дефицитом витамина D 25(OH)D, перенесших рак молочной железы / Фролова Д. Е., Громова О. А., Лапочкина Н. П., Томилова И. К., Торшин И. Ю. ; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. № 2021109576 ; заявл. 06.04.2021 ; опубл. 22.01.21, Бюл. № 3. – 1 с.