

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ИВАНОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ФРОЛОВА Дарья Евгеньевна

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

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

ГРОМОВА Ольга Алексеевна

Иваново – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 15 |
| 1.1. Эпидемиология и факторы риска развития рака молочной железы..... | 15 |
| 1.2. Биологические особенности рака молочной железы у молодых женщин..... | 17 |
| 1.3. Ожирение как фактор риска развития рака молочной железы..... | 21 |
| 1.4. Распространенность дефицита витамина D и критерии постановки диагноза..... | 22 |
| 1.5. Влияние витамина D на клетки линии MCF7 и на модели карциномы легкого Льюиса..... | 33 |
| 1.6. Связь нарушений метаболизма витамина D с патогенезом рака молочной железы..... | 35 |
| 1.7. Патофизиологические роли витамина D при раке молочной железы..... | 38 |
| Резюме к главе 1..... | 43 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 45 |
| 2.1. Общая характеристика выделенных групп женщин. . . | 45 |
| 2.2. Характеристика обследованных и методы исследования..... | 47 |
| 2.3. Гистологическое и иммуногистохимическое исследования ткани опухоли молочной железы..... | 49 |
| 2.4. Биохимические исследования крови обследованных женщин..... | 49 |
| 2.5. Фармакокинетические исследования различных форм холекальциферола у женщин-добровольцев..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 2.6. Экспериментальное исследование противоопухолевого эффекта холекальциферола на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов. | 52 |
| 2.7. Хемотранскриптомный анализ определения дозозависимого действия витамина D на экспрессию генов в опухолевых клетках MCF7 и в клетках-предшественниках нейронов NPC. | 55 |
| 2.7.1. Хемотранскриптомный анализ. | 56 |
| 2.7.2. Системно-биологический анализ. | 59 |
| 2.8. Методы статистической обработки результатов исследования. | 61 |
| Глава 3. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ ЛЬЮИСА. . . | 62 |
| 3.1. Модель перевиваемой эпидермоидной карциномы легких Льюиса. | 62 |
| 3.2. Оценка показателей состояния лабораторных животных, первичной опухоли и метастатического процесса на модели перевиваемой карциномы легкого Льюиса. | 63 |
| 3.3. Результаты экспериментального исследования воздействия холекальциферола (в виде водного раствора мицелл) на карциному легкого Льюиса. | 64 |
| Резюме к главе 3. | 69 |
| Глава 4. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА У ЖЕНЩИН. | 70 |
| 4.1. Фармакокинетика различных форм холекальциферола | 70 |
| 4.2. Определение уровня метаболитов витамина D в организме женщин. | 71 |

| | |
|--|-----|
| 4.3. Бескамерный фармакокинетический анализ. | 74 |
| 4.4. Многокамерный фармакокинетический анализ. | 76 |
| Резюме к главе 4. | 79 |
| Глава 5. ХЕМОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ РАЗНЫХ ДОЗ ВИТАМИНА D НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ НЕЙРОНОВ NPC И В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ MCF7 ЧЕЛОВЕКА. | 81 |
| 5.1. Дозозависимые эффекты витамина D на транскрипцию генов в линии клеток MCF7 и в клетках-предшественниках нейронов NPC. | 81 |
| 5.2. Эффекты витамина D в опухолевых клетках MCF7. . . | 91 |
| 5.3 Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D. | 94 |
| Резюме к главе 5. | 98 |
| Глава 6. ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D НА ПРОГРЕССИРОВАНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. | 100 |
| 6.1. Результаты ретроспективного исследования пациенток со злокачественной опухолью молочной железы. | 101 |
| 6.2. Гистологические и клиническо-биохимические характеристики обследованных женщин со злокачественной опухолью молочной железы. | 102 |
| 6.3. Оценка влияния дефицита витамина D на риск прогрессирования рака молочной железы. | 104 |
| 6.4. Алгоритм скринингового обследования пациенток с раком молочной железы. | 106 |
| Резюме к главе 6. | 106 |

| | |
|--|-----|
| Глава 7. ВЫБОР ЛЕЧЕБНОЙ ДОЗЫ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА ДЛЯ ПАЦИЕНТОК С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ИЛИ ДЕФИЦИТОМ ВИТАМИНА D, ПЕРЕНЕСШИХ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. | 108 |
| 7.1. Характеристика женщин со злокачественной опухолью молочной железы, имеющих дефицит или недостаточность витамина D. | 109 |
| 7.2. Показатели перекисного окисления липидов у пациенток с раком молочной железы, принимавших разные дозы холекальциферола. | 111 |
| Клинический случай № 1. | 112 |
| Клинический случай № 2. | 113 |
| Клинический случай № 3. | 114 |
| Резюме к главе 7. | 114 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ. | 116 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. | 124 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ. | 125 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. | 127 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) занимает доминирующее положение среди всей онкологической патологии у женщин в мире. Более 20 лет продолжается стабильный рост впервые выявленных случаев онкологических заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), каждый год регистрируется более 10 миллионов новых случаев РМЖ. По оценкам за 2020 год, РМЖ был диагностирован у 2,3 миллиона женщин по всему миру. Согласно статистике ВОЗ, к концу 2020 года в мире насчитывалось 7,8 млн пациенток с диагностированным за последние пять лет РМЖ. У женщин не только в мире, но и в России, РМЖ – самое распространенное онкологическое заболевание. В структуре злокачественных новообразований (ЗНО) в России в 2020 г. РМЖ занимает лидирующую позицию, составляя 21,7 % [14]. В 2020 г. в нашей стране было зарегистрировано 556 тыс. новых случаев заболевания раком. Однако по итогам 2021 г. российские онкологи прогнозируют небывалый рост количества случаев первично выявленных ЗНО. Причем нередко с уже более серьезным течением. Это связано со сложностями ранней диагностики заболеваний во время пандемии COVID-19.

Более 6 млн женщин в год погибает от разрушающего воздействия опухолей. ВОЗ приводит данные, что в 2020 году от РМЖ по всему миру скончались 685 тыс. пациенток. Летальность больных на первом году жизни с момента установления диагноза составила 5,8 % [148].

Все больше научных данных подтверждают связь между недостаточной обеспеченностью витамином D (VD) и риском развития рака. Дефицит VD – это новая метаболическая пандемия XXI века. По результатам ряда эпидемиологических исследований, проведенных в 2012–2018 гг., в РФ распространенность дефицита VD у взрослых составляла 64,5–94,0 %

популяции в зависимости от региона [30]. В 2020 г. в 10 российских регионах было проведено многоцентровое неинтервенционное регистровое исследование частоты дефицита и недостаточности VD, которое продемонстрировало, что у 72 % обследованных выявлен статус дефицита и недостаточности VD (у 39 % – дефицит, у 33 % – недостаточность) [32].

Витамин D (холекальциферол) является предшественником 1,25-дигидроксивитамина D – стероидного гормона, участвующего в различных процессах в организме, включая пути, вызывающие рак. Различные механизмы, с помощью которых 1,25-дигидроксивитамин D может действовать как защита от развития злокачественного процесса, включают индукцию апоптоза, стимуляцию дифференцировки клеток, противовоспалительные и антипролиферативные эффекты и ингибирование ангиогенеза, инвазии и метастазирования [62]. Кроме этого, ряд факторов: ожирение, низкая физическая активность, возраст, темный тип цвета кожи, курение – провоцирует снижение уровня, циркулирующего 25-гидроксивитамина D [49], а также развитие хронического воспаления [50].

VD имеет противоопухолевый эффект, который связан с действием активированного рецептора витамина D (VDR). VDR выявлен во многих клетках иммунной системы, таких как моноциты, макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Способность тормозить размножение нормальных и некоторых типов опухолевых клеток, стимулировать активность клеток иммунной системы, пролифференцирующий эффект в разных типах клеток достигаются активацией транскрипции посредством VDR. Установлено, что VD является мощным противоопухолевым витамином, индуцирующим аутофагию патологических клеток, образовавшихся в ответ на радио- и химиотерапию [48].

1,25-дигидроксивитамин D, гормонально активный метаболит VD, оказывает терапевтическое действие против РМЖ в основном за счет снижения экспрессии рецепторов эстрогена и активности ароматазы. Активный метаболит VD и его синтетический аналог регулируют рост не только клеток, чувствительных к рецепторам эстрогена (T47D и MCF-7, in

vitro и in vivo), но и гормоннезависимых опухолевых клеток, таких как SKBR-3 (HER-2-положительный) и MDA-MB-231 (тройной отрицательный), несмотря на относительно низкую экспрессию VDR [70]. Противоопухолевый эффект активных форм VD обеспечивается в результате прямого воздействия на транскрипцию более 3000 генов, вовлеченных в регуляцию роста, деления и апоптоза клеток. [28]. Участие VD в поддержании процессов апоптоза (программированной клеточной смерти) чрезвычайно важно для элиминации опухолевых клеток.

Вышеперечисленное означает, что, несмотря на совершенствование диагностических инструментальных и иммунобиохимических методик, появление высокоточных генетических тестирований, сегодня РМЖ у женщин трудоспособного возраста выявляется намного чаще и живут они с этой проблемой дольше, о чем свидетельствует некоторое снижение смертности. В связи с этим перед медицинским сообществом встают вопросы качества жизни и восполнения уровня дефицита VD для снижения риска развития и прогрессирования ЗНО.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время высока потребность в создании новых эффективных высокотехнологических методов диагностики и лечения онкологических заболеваний с большей специфичностью, которые вызывают меньше нежелательных реакций. Сегодня ведутся исследования в области таргетной химио-, гамма-терапии, оперативной онкологии, которые при всей их эффективности лишь устраняют онкологический процесс. К сожалению, при этом прогноз для жизни пациента зачастую остается неблагоприятным.

В ряде работ прослеживается связь между обеспеченностью VD и развитием РМЖ [46, 60, 129]: так, у пациенток с уровнем VD менее 13 нг/мл выявлена самая высокая частота встречаемости РМЖ [66]. При содержании в организме VD менее 20 нг/мл повышается риск распространения отдалённых

метастазов при ранних стадиях РМЖ [55, 90, 120], кроме того, выявлена прямая зависимость низкого содержания уровня VD и злокачественных изменений при анализе снимков маммографии у пациенток с РМЖ [65].

Противоопухолевое воздействие VD осуществляется за счёт изменения генов, которые участвуют в клеточной пролиферативной активности, дифференцировке клеток, ангиогенеза и метастатического поражения [102, 112, 148, 172]. В результате противоопухолевого действия VD происходит активация каспаза-зависимых механизмов [154], ингибирование ангиогенеза [113], снижение экспрессии эстрогеновых рецепторов [138] и гена, кодирующего фермент ароматазу [104], усиливающих некроз опухоли. Полиморфизм гена VDR также связан с повышенным риском развития РМЖ [56]. Полиморфизм Fok1 значительно повышает риск формирования РМЖ, клетки с таким генотипом также имеют более высокую экспрессию провоспалительных генов [129, 139]. Уровень циркулирующей формы VD может зависеть от полиморфизма генов VDR, CYP2R1, являющихся генетическими маркерами его дефицита [152, 171]. В связи с этим поиск предикторов развития онкологических заболеваний и эффективных методов их профилактики имеет особую важность.

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

Задачи научного исследования

1. Оценить противоопухолевые эффекты холекальциферола в экспериментальных исследованиях на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F1 (СВА×С57Bl6).
2. Провести анализ особенностей фармакокинетики фармакологической субстанции холекальциферола, заключенной в разные формы (масляный

раствор, капсула, водный раствор), у здоровых женщин в возрасте от 24 до 53 лет путем определения 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, воздействующих на опухолевый рост в клетках линии MCF7, по сравнению с влиянием 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.
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 в эксперименте на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F1 (CBA×C57Bl6) были установлены выраженные противоопухолевые свойства витамина D в дозе 5 мкг/кг/сут.

Впервые проведен анализ особенностей фармакокинетики препаратов витамина D в разных лекарственных формах, который показал, что любой из исследованных препаратов обеспечивает достаточно стабильную концентрацию 25(OH)D в организме при однократном суточном приеме 10000 МЕ.

Впервые выполнен хемотранскриптомный анализ воздействия витамина D на линию клеток-предшественников нейронов NPC и на опухолевые клетки молочной железы линии MCF7, влияющей на их энергетический метаболизм, что приводит к снижению деления опухолевых

клеток, интенсивности процессов пролиферации и сопротивляемости опухолевых клеток терапевтическому воздействию.

Впервые обнаружено, что при дефиците/недостаточности витамина D снижение уровня промежуточного метаболита витамина D – 25(OH)D в сыворотке крови является прогностическим признаком прогрессирования рака молочной железы.

Впервые определена доза холекальциферола 4000 МЕ/сут как безопасная и эффективная для пациенток с недостаточностью/дефицитом витамина D, перенесших рак молочной железы. Эти выводы были сделаны на основании положительной динамики концентраций 25(OH)D, показателей перекисного окисления липидов, биохимических параметров, иммуногистохимических и клинических показателей. Выявлено, что эффект предлагаемой дозы 4000 МЕ/сут холекальциферола у таких пациенток достоверно значимо связан со снижением показателей I_{max} и MDA и снижением уровня десквамированных эндотелиальных клеток.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты дополняют и расширяют имеющиеся сведения о витамине D, особенно, о его влиянии на опухолевые клетки молочной железы MCF7.

Принимая во внимание, тот факт, что низкая обеспеченность витамином D приводит к риску развития опухоли молочной железы, появляется необходимость ввести витамин D в комплексное обследование молочных желез. Определена связь между низким уровнем витамина D и прогрессированием рака молочной железы. Предложены эффективные лечебные дозы пациенткам со злокачественной опухолью молочной железы при дефиците витамина D. Определены преимущества определения промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D у больных раком молочной железы. Полученные данные раскрыли новые подходы к

диагностике прогрессирования рака молочной железы, а также позволили прогнозировать ее развитие.

Положения, выносимые на защиту

1. Исследование эффектов холекальциферола на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов F_1 (СВА \times С₅₇Вl₆) показало наличие противоопухолевого эффекта. При пероральном 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 существенно тормозит деление именно опухолевых клеток, стимулирует экспрессию генов, поддерживающих положительную регуляцию клеточной дифференциации.

3. Женщины со злокачественной опухолью молочной железы имеют достаточно 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 курсом препарата «Аквдетрим» (действующее вещество: холекальциферол, водный раствор 014088/01, производитель – Польша) в суточной дозе 4000 МЕ в течение шести месяцев с последующим переходом на поддерживающую суточную дозу 2000 МЕ до достижения адекватного уровня витамина D 30–100 нг/мл (75–250 нмоль/л) в крови и позволила добиться снижения показателей перекисного окисления липидов (I_{max},

MDA), снижения уровня десквамированных эндотелиальных клеток как маркеров восстановления гомеостаза процессов окисления и эндотелиальной функции сосудов.

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

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов всех исследований подтверждается адекватными методами статистического анализа и серией опытов. Полученные данные свидетельствуют о достижении цели исследования и решении поставленных задач.

Результаты диссертационной работы доложены 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 Национальном конгрессе «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).

Личный вклад автора состоит в выполнении экспериментальной и аналитической части диссертационного исследования, автором проведена обработка и интерпретация полученных данных. При участии автора также были подготовлены публикации по результатам диссертационной работы.

Связь темы диссертационной работы с планом научных работ учреждения

Диссертационная работа выполнена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Сведения о публикациях по теме диссертации

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).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 146 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 172 источника, в том числе 35 отечественных и 137 зарубежных. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 21 рисунком.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология и факторы риска развития рака молочной железы

Онкологическая база данных GLOBOCAN за 2020 г. ставит РМЖ на первое место среди всей онкологической патологии (11,7 %, 2 261 419 случаев). По статистике, риск развития РМЖ имеется у каждой восьмой женщины планеты [2]. РМЖ – одно из самых часто встречающихся ЗНО более чем в 154 странах мира и является основной причиной смерти женщин в 103 государствах [105]. Хотя показатели выживаемости больных РМЖ улучшились, но пока еще остаются в низком диапазоне (всего от 13 до 40 % за 5 лет) [110]. Количество повторно диагностированных случаев злокачественной опухоли молочной железы (МЖ) увеличилось более чем на 20 %, при этом смертность также возросла на 14 % [83].

РМЖ – самое распространенное онкологическое заболевание у женщин не только в мире, но и в России. В 2018 г. в нашей стране РМЖ установлен у 70 376 больных, на I стадию приходилось 26,5 % случаев, на II – 44,7 %, на III – 20,6 %, на IV – 7,8 %. Летальность пациенток на первом году жизни с момента постановки диагноза составила 5,8 % [19]. В структуре онкологических новообразований в 2019 г. РМЖ занимал лидирующую позицию, составляя 20,9 % (заболеваемость – 89,79 на 100 000 женщин) [17].

Заболеваемость РМЖ дает среднегодовой темп прироста в 2,74 %. Доля ранних форм в структуре заболеваемости в 2018 г. составила 71 % [20]. При этом в течение последних трех-четырех десятилетий наблюдается тенденция к стабильности, а в некоторых странах – к определенному снижению смертности [137]. По данным Американского онкологического общества, показатели пятилетней общей выживаемости при локализованных стадиях составляет 100 %, при поражении регионарных лимфатических узлов (ЛУ) – 75–86 % (American Cancer Society, 2019).

Молочная железа – гормонозависимый орган-мишень, являющийся неотъемлемой частью репродуктивной системы женщин. В железистой ткани МЖ постоянно происходят циклические изменения процессов клеточной пролиферации – в пре- и постменструальный периоды, в период развития беременности и лактации, в климактерическом периоде. В связи с этим ткань МЖ, с одной стороны, отражает состояние репродуктивных органов и эндокринно-метаболических нарушений, а с другой – является мишенью воздействия многих гормонов и их метаболитов. [167].

Результаты крупнейшего мета-анализа, опубликованные в журнале «Lancet Global Health» в 2020 году, свидетельствуют, что распространенность пре- и постменопаузальных (после 50 лет) РМЖ в мире составляет 50 %, при этом в развитых странах РМЖ чаще встречается у пациенток в постменопаузе, а в развивающихся и слабо развитых – в пременопаузальный период. В развитых странах темпы прироста РМЖ у женщин в пременопаузе значительно превышают таковые в развивающихся и слабо развитых странах. [83]. Около 30 % случаев РМЖ приходится на женщин репродуктивного возраста. Многие исследования указывают на постепенный рост заболеваемости РМЖ именно в этой возрастной категории [1]. У пациенток до 40 лет диагностируется около 6,6 % всех случаев РМЖ, до 35 лет – 2,4 % и до 30 лет – 1 % [43]. Частота РМЖ у молодых женщин составляет 5–7 % в развитых и до 20 % – в развивающихся странах. Так, в Российской Федерации среди всех пациенток с впервые выявленным РМЖ около 23 % составляют женщины моложе 45 лет. В мире каждый год регистрируется более 140 000 случаев РМЖ в молодом возрасте. И несмотря на то что 77 % этих ситуаций встречаются в развивающихся странах, по возрастной стандартизации заболеваемости для женщин моложе 40 лет этот показатель был выше в развитых государствах (8,8 против 5,4 на 100 000 женщин).

РМЖ – один из самых часто встречающийся видов ЗНО у беременных и кормящих женщин (1 случай на каждые 3000–6000 беременностей). Существенное влияние на формирование РМЖ у пациенток в

репродуктивном периоде оказывают, в частности, экологические факторы, причем гораздо более значимые, чем генетические. У молодых больных, средний возраст которых составляет 36 лет, РМЖ диагностируется чаще на поздних стадиях в связи с отсутствием онкологической настороженности, более агрессивного биологического поведения ЗНО и, как следствие, отсроченного установления диагноза [43]. У 57 % женщин молодого возраста РМЖ выявляется на второй стадии или позднее. Для пациенток моложе 40 лет показатели выживаемости при ЗНО МЖ намного ниже, чем для больных старшего возраста, независимо от молекулярного подтипа, гистологического типа опухоли и стадии процесса [44]. В структуре смертности от онкозаболеваний у молодых женщин РМЖ занимает лидирующие позиции. Географическое положение места постоянного проживания пациенток существенно влияет на возраст начала заболевания и смертность от РМЖ, причем со значимой разницей на западе и на востоке Евразии.

У женщин молодого возраста с РМЖ возникают специфические проблемы, в частности, психологические социальные и адаптивные трудности, более частые генетические мутации, сохранение или восстановление репродуктивной функции после проведенного лечения [35]. Таким молодым пациенткам со ЗНО МЖ необходим иной терапевтический подход, чем больным более старшего возраста [118]. Поэтому женщины молодого возраста с РМЖ с учетом течения заболевания и природы опухолевого процесса выделены в особую когорту [20].

1.2. Биологические особенности рака молочной железы у молодых женщин

Многие авторы в своих исследованиях констатируют, что диагностированный в молодом возрасте РМЖ имеет более агрессивное течение и неблагоприятный прогноз, чем выявленный в более поздний период

[94]. Новообразования у молодых пациенток чаще имеют негативные прогностические характеристики: невысокая чувствительность к стероидным гормонам или полное ее отсутствие; положительная экспрессия эпидермального фактора роста человека (Her2/neu); низкодифференцированные или недифференцированные опухоли; местно распространенный опухолевый процесс с вовлеченностью региональных лимфатических узлов с лимфоваскулярной инвазией [47]. У молодых пациенток чаще встречаются воспалительные формы РМЖ, заболевание чаще верифицируется на поздних стадиях, в результате чего возрастает риск рецидива и метастатического поражения, что значительно ухудшает прогноз заболевания [40]. Из-за частой экспрессии Her2/neu и/или высокой пролиферативной активности наиболее распространен подтип В люминальных опухолей [54]. При этом в данной возрастной группе существуют наиболее агрессивные молекулярные подтипы РМЖ с положительной экспрессией Her2/neu и тройной негативный (базальный) подтип, которые связаны с наиболее низкими показателями безрецидивного периода и общей выживаемости, регистрируются чаще, чем в общей популяции (табл. 1) [134].

Известны основные факторы риска формирования РМЖ у молодых женщин. Это семейный анамнез, отягощенный по РМЖ или раку яичников (РЯ), непосредственно у самой пациентки или у родственницы по первой линии, диагностируемый в возрасте до 50 лет, наличие мутаций генов BRCA1, BRCA2, CHEK2, TP53 у родственниц первой линии и у пациентки [43]. По данным литературы, имеются сведения о повышенном риске смерти от ЗНО МЖ у женщин-носительниц мутаций BRCA. Установлено, что в этих случаях роды не оказывают защитного эффекта. Наоборот, рожавшие женщины с такими генетическими мутациями заболевают в 1,7 раза чаще, чем женщины-носительницы, которые не рожали. Причем каждая последующая беременность увеличивает риск развития злокачественной опухоли МЖ [35].

Таблица 1 – Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы

| Подтипы | Иммуногистохимическая диагностика рецепторного статуса | Встречаемость и прогноз |
|--|---|--|
| Люминальный А молекулярный подтип опухоли МЖ | ER положительный PR положительный Her2neu отрицательный Низкий показатель Ki-67 | Частота 30–45% Высоко- и умереннодифференцированные Медленный рост Относительно благоприятный прогноз |
| Люминальный В молекулярный подтип опухоли МЖ | ER положительный PR положительный Her2neu положительный/отрицательный Высокий показатель Ki-67 | Частота 14–18 %, Более быстрый рост Неблагоприятный прогноз |
| Her2neu позитивный молекулярный подтип опухоли МЖ | ER отрицательный PR отрицательный Her2neu 3 + (положительный) Высокий показатель Ki-67 | Частота 8–15 % Низкодифференцированные Чувствительны к трастузумабу Неблагоприятный прогноз |
| Тройной негативный (базальный) молекулярный подтип опухоли МЖ | ER отрицательный PR отрицательный Her2neu отрицательный Высокий показатель Ki-67 | Частота 27–39% Агрессия опухоли высокая Чаще встречается у носителей BRCA и у женщин молодого возраста Крайне неблагоприятный прогноз |

Число носительниц BRCA у женщин молодого возраста с РМЖ выше, чем в общей популяции пациенток со ЗНО МЖ. Благодаря проведению генетического тестирования можно установить причинно-следственные мутации у 3–33 % женщин молодого возраста. Формирование опухоли при определенных условиях может происходить вследствие постепенного накопления в геноме разнообразных «соматических мутаций», причинами

этого могут стать физические, химические, биологические факторы среды [157].

В опухолевых тканях больных с ЗНО обнаруживаются мутации генов и/или аномалии кариотипа. Опухолевая трансформация клеток, возникающая вследствие генетических изменений, включает крупные или незначительные перестройки хромосом, амплификацию генов, доминантные или рецессивные изменения некоторых генов, в результате которых мутантные белки приобретают разнообразные агрессивные особенности или инактивируются [157]. Мутации в гене BRCA1 существенно увеличивают возможность возникновения одних из самых распространенных онкозаболеваний – РМЖ и РЯ. Множество мутантных аллелей сконцентрировано в гене BRCA1. Так, присоединение одного нуклеотида-цитозина в позиции 5382 определяется как мутация 5382insC. В результате граница считывания матричной РНК смещается и в позиции 1829 возникает преждевременный стопкодон, следствием чего становится формирование короткого белка BRCA1, происходит нарушение его функциональных особенностей, которое повышает риск развития РЯ и РМЖ. Мутации 5382insC и 4153delA приводят к развитию семейного РЯ в России в 86 % случаев. Мутация 5382insC встречается у 9,7 % таких женщин. Ген BRCA1 кодирует продукт, который формирует комплексы белков BRCA (BRCA-associated genome surveillance complex), участвующих в восстановлении ДНК, тем самым обуславливая единство генома [31].

Геном-супрессором опухоли является BRCA1, кодирующий белок BRCA1. Последний участвует в сдерживании роста опухоли и сохранении устойчивости генетического аппарата клеток. Он находится на длинном плече 17-й хромосомы и кодирует белки, участвующие в нормализации клеточного цикла, восстановлении ДНК, защищающую клетку от злокачественной перестройки [84]. Благодаря генетическому тестированию пациенток с риском развития РМЖ обнаруживается все больше новых вариантов BRCA1. Это создает растущую потребность в определении клинической значимости

этих вариантов. Такое тестирование повышает точность оценки риска развития РМЖ и особенностей его течения [84].

Известно, что ген CHEK2 также является важным преобразователем сигнала, участвующим в репарации ДНК для остановки клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК. Мутации в гене CHEK2 связаны с повышенным риском раннего начала РМЖ. Распространенность вариантов CHEK2 изучена у 95 BRCA1/2- и PALB2-негативных пациенток с ранним РМЖ и/или РЯ [38]. Все границы интронов/экзонов и кодирующие экзоны CHEK2 подвергали мутационной оценке с помощью гетеродуплексного анализа и секвенирования ДНК. У 7 женщин с ранним началом РМЖ выявлены 16 вариантов CHEK2 с мутацией BRCA1/2 и PALB2 [38].

Вышеперечисленное означает, что, несмотря на прогресс в совершенствовании диагностических инструментальных и иммунобиохимических методик, внедрение высокоточных генетических тестирований, сегодня женщины трудоспособного возраста намного чаще болеют РМЖ. При этом живут они с этим заболеванием дольше, что доказывают стабилизация и некоторое снижение смертности. Однако возникают вопросы качества жизни и проблема реабилитации пациенток, вынужденных жить с калечащими последствиями комбинированного лечения РМЖ [16].

1.3. Ожирение как фактор риска развития рака молочной железы

Некоторые антропометрические показатели (рост и вес) пациента отражаются на заболеваемости и смертности. Так, фактором риска развития РМЖ является избыточный вес, который становится одной из причин летального исхода во всех возрастных группах [122]. Установлено, что 30–50 % женщин в постменопаузе с избыточной массой тела с РМЖ умирали [126]. Это обстоятельство можно считать значимым предиктором

формирования ЗНО МЖ. Следовательно, умеренный вес важно поддерживать на протяжении всей жизни [57].

Ожирение часто обуславливало увеличение числа рецидивов РМЖ ($p = 0,02$), смертности данной группы женщин ($p = 0,06$), развитие более крупных опухолей ($p = 0,002$), а также поражение подмышечных лимфоузлов ($p = 0,003$). Однако не прослеживается связь ожирения с чувствительностью рецепторов к гормонам ($p \geq 0,6$) или сокращением дозы первого цикла адъювантной химиотерапии ($p = 0,1$). Как видим, ожирение связано с более плохим прогнозом для женщин в пре- и постменопаузе [126]. Следовательно, ожирение является фактором не только риска возникновения РМЖ, но и ухудшения выживаемости пациенток, у которых уже было диагностировано это заболевание.

1.4. Распространенность дефицита витамина D и критерии постановки диагноза

Дефицит VD — это новая метаболическая пандемия XXI века. Распространенность дефицита и недостаточности VD (уровень 25(OH)D менее 30 нг/мл) в мире высока: в исследованиях последних лет показано, что в США она достигает 24 %, в Канаде — 37 %, в Европе — 40 %. В ряде стран (Индия, Пакистан, Тунис) у 20 % населения наблюдается выраженный дефицит VD (уровень 25(OH)D менее 10 нг/мл) [39]. По данным ряда эпидемиологических исследований, проведенных в 2012–2018 гг., в Российской Федерации распространенность дефицита VD у взрослых составляла 64,5–94,0 % популяции в зависимости от региона [30]. В 2020 г. в 10 областях РФ было проведено многоцентровое неинтервенционное регистровое исследование по изучению частоты дефицита и недостаточности VD, которое продемонстрировало, что у 72 % обследованных имеется статус дефицита и недостаточности VD (у 39 % — дефицит, у 33 % — недостаточность) [10].

Многочисленными эпидемиологическими исследованиями выявлен гиповитаминоз D, который распространен во всех возрастных и этнических группах во всем мире. Выявлены причины низкого уровня VD в крови: незначительное количество витамина в ежедневном рационе, расстройство процессов всасывания VD в кишечнике, нарушение метаболизма кальциферола при заболеваниях печени и почек, низкая физическая активность, крайне редкое пребывание на свежем воздухе [13, 39]. К тому же с возрастом снижается содержание VD даже в организме людей из регионов с достаточным уровнем инсоляции. В основном это объясняется тем, что в коже пожилых людей уменьшается концентрация предшественника VD – 7-дегидрохолестерола (7-DHC).

VD образуется из провитамина D, который в коже под действием ультрафиолетовых лучей «В» преобразуется в 7-дигидрохолестерол. Далее VD соединяется с витамин-D-связывающим протеином и переносится в печень. В печени под действием 25-гидроксилазы образуется 25-гидроксивитамин VD – 25(OH)D, определение уровня которого в крови показывает обеспеченность VD. Далее 25(OH)D переносится в почки, где под действием фермента 1 α -гидроксилазы происходит следующий этап гидроксилирования с образованием активной формы VD – 1,25(OH)D (кальцитриола) [92]. Затем кальцитриол, связываясь с транспортным белком VD, поступает в кровяное русло, соединяясь с одноименным VDR, который относится к ядерным рецепторам [69]. Его функции состоят в способности активизировать и воздействовать на биохимические реакции в различных тканях-мишенях за счет регуляции транскрипции генов [4]. 24-гидроксилаза вырабатывает биологически не активные метаболиты VD, которые представлены в виде кальцитроевой кислоты и экскретируются вместе с желчными кислотами [89].

От обеспеченности организма человека VD зависит развитие многих онкологических заболеваний. Активная форма VD оказывает протективный противоопухолевый эффект, выраженность которого зависит от генетических

факторов, а именно, от функциональных полиморфизмов генов VDR и транспортного белка VD (VDBP) [91, 150]. Генотип VDBP соответствует снижению риска образования РМЖ (ОР 0,72, ДИ 0,54–0,96) [91], генотип полиморфизма VDR – меланобластомы кожи (ОР 0,70, ДИ 0,54–0,90) [98], генотип ff полиморфизма VDR FokI связан с фактором риска формирования рака простаты, с наиболее агрессивным течением заболевания [114]. При достаточной инсоляции генотипы с наиболее высокой активностью рецептора VDR (FokI FF/Ff, TaqI tt, BglII BB) соответствуют пониженному риску развития рака простаты [66].

Кальцитриол связывается с цитозольным VDR. Таким образом реализуется геномный путь. К родственным VDR относится ретиноидный X-рецептор (RXR) – ядерный рецептор к витамину А. Два этих рецептора при действии активной формы VD – 1,25(OH) образуют комплекс VDR – RXR D, который соединяется с соответствующим участком генома и запускает процесс транскрипции генов с последующей трансляцией соответствующих молекул белка. Обнаружение и анализ ДНК-локуса, к которому прикрепляется комплекс VDR – RXR, предоставило расшифровку многим генам, которые причастны к осуществлению действия VD [66].

Доказано значимое влияние активированного VDR на экспрессию более чем 200 генов, и только небольшая часть из них (7–10 %) кодирует белки, участвующие в фосфорно-кальциевом обмене – регулирует миграцию остеокластов.

VD участвует в абсорбции кальция и фосфатов в кишечнике и их выведение почками, в системном транспорте минеральных солей и в процессе минерализации костей. Основными классическими (костными) клиническими проявлениями дефицита VD являются рахит, остеомалация и повышение риска переломов.

Предметом некоторых исследований по доказательной медицине применения VD являлось установление взаимосвязей между уровнем активных форм VD в плазме крови и риском возникновения ЗНО. Более

высокое содержание в сыворотке крови 25(OH)D соответствует снижению риска смерти от ЗНО (ОР 0,52, 95% ДИ 0,29–0,94) [99], на 40% уменьшается вероятность развития злокачественной опухоли толстого кишечника [37] и наиболее тяжелых форм злокачественного процесса толстой кишки, а также рецидивов колоректального рака [51]. Повышение уровня промежуточного метаболита VD – 25(OH)D от 12,5 до 30,0 нг/мл снижает риск развития РМЖ на 25 % [66].

Основными формами VD являются эргокальциферол (Витамин D2) и холекальциферол (D3). VD3 образуется в коже под воздействием ультрафиолетовых лучей с длиной волны 290–315 нм, а также поступает в организм из продуктов животного происхождения, в основном богатых рыбьим жиром; витамин D2 (VD2) – больше из растительной пищи [111].

VD2 и VD3 выполняют роль прогормона и не воздействуют на метаболизм VD, различаются только в химической формуле по строению боковой цепи, VD3 синтезируется под воздействием ультрафиолета, поэтому суммарный уровень облучения солнцем может оказывать влияние на его содержание в крови. В странах с разной инсоляцией установлены существенные отличия в структуре заболеваемости раком [111]. По данным исследований, максимальное количество VD в сыворотке крови наблюдается с июля по сентябрь, при этом дефицит VD (25(OH)D менее 20 нг/мл) отмечается лишь у 13 % обследованных, а в зимне-весенний период дефицит VD повышается до 36 % [114]. Таким образом установлено, что снижение уровня 25(OH)D в сыворотке на 20–120 % в зимний период коррелирует с подъемом заболеваемости ЗНО [159]. В канадском исследовании у девушек 10–19 лет при регулярной *естественной инсоляции* было выявлено значительное снижение риска развития РМЖ (ОР 0,65, 95% ДИ 0,50–0,85, $p = 0,0006$).

Наиболее важным источником VD, необходимого организму больше, чем инсоляция, является поступление витамина с пищей и со специальными препаратами. Регулярное употребление продуктов, богатых VD, таких как

печень трески и молоко, существенно снижает риск развития РМЖ [121]. VD при поступлении с пищей, лекарственными препаратами или синтезированный под действием инсоляции приводит к увеличению уровня метаболитов VD – 25(OH)D и 1,25(OH)D в плазме крови. Употребление VD более 200 МЕ в сутки способствовало снижению риска развития ЗНО МЖ (ОР 0,50, 95% ДИ 0,26–0,96) [108]. Кроме того, наиболее высокое содержание VD в крови пациентов способствовало снижению риска прогрессирования колоректальной *аденокарциномы* [121].

В ряде эпидемиологических исследований и их мета-анализов были продемонстрированы ассоциации дефицита VD с риском развития ожирения [76], сахарного диабета 1-го [124] и 2-го типов [117], сердечно-сосудистых заболеваний [135], РМЖ [82], толстой кишки [82]. Однако доступные на текущий момент данные проспективных интервенционных клинических исследований не позволяют однозначно подтвердить эффективность дотации VD для профилактики данных заболеваний [132]. Дополнительно VD участвует в регуляции иммунитета путем модуляции уровня цитокинов и регулирует деление лимфоцитов Т-хелперов и дифференцировку В-лимфоцитов [125], а также стимулирует выработку факторов естественного иммунитета – кателицидина и β -дефензинов [153]. Взаимосвязь уровня VD с эффективностью иммунной защиты была продемонстрирована как в наблюдательных исследованиях, где дефицит VD ассоциировался с повышением заболеваемости респираторными инфекциями [96], так и в интервенционных, которые продемонстрировали снижение риска заболевания острыми респираторными инфекциями на фоне дотации VD [107].

Диагностика дефицита VD проводится путем определения уровня его метаболитов в сыворотке крови. Наиболее информативным показателем является концентрация 25(OH)D в сыворотке крови, т. к. он является основным циркулирующим метаболитом VD, имеет длительный период полураспада (две-три недели) и отражает поступление как экзогенного (пищевого), так и эндогенного (синтезирующегося в коже на фоне инсоляции) VD.

Уровень 25(OH)D 0–9 нг/мл указывает на выраженный дефицит VD, 10–19 нг/мл – на дефицит VD, 20–29 нг/мл – на недостаточность VD, 30–100 нг/мл – показатели нормы) [11].

Биологически активный кальцитриол (1,25(OH)D) циркулирует в значительно более низких количествах (его концентрации в 1000 раз ниже), имеет короткий период полураспада (4 ч) и не отражает состояние резервов VD в организме. Уровень кальцитриола остается нормальным или может повышаться на фоне дефицита VD за счет вторичного гиперпаратиреоза, и его определение целесообразно лишь при диагностике врожденных или приобретенных нарушений метаболизма VD (например, при дефиците 24-гидроксилазы) [87].

Таким образом, в настоящее время для определения обеспеченности организма VD необходимо измерять содержание 25(OH)D в сыворотке или плазме крови. Для установления границ нормальной концентрации 25(OH)D существуют определенные разногласия. Так, Институт медицины (Institute of Medicine (ИОМ), США), Национальное общество остеопороза Великобритании и Эндокринологическое общество Австралии, организация «Остеопороз» (Австралия) и Австралийское и Новозеландское общества костного и минерального обмена принимают за нижнюю границу достаточности 50 нмоль/л (20 нг/мл), показатели в диапазоне 30–50 нмоль/л (12–20 нг/мл) расценивают как недостаточность, менее 30 нмоль/л (12 нг/мл) – как дефицит VD [42].

Международное эндокринологическое общество, Федеральная комиссия по питанию Швейцарии, Испанское общество исследования костей и минерального обмена, Центрально-Европейский комитет по VD считают показателем достаточной обеспеченности цифры, равные или превышающие 30 нг/мл (75 нмоль/л) [80]. В России три профильные профессиональные ассоциации (Российская ассоциация эндокринологов, Союз педиатров России, Российская ассоциация по остеопорозу) приняли следующие границы: адекватным уровнем в крови считается концентрация 25(OH)D

30 нг/мл (75 нмоль/л) и выше, недостаточностью – 21–29 нг/мл (51–72,5 нмоль/л), дефицитом – менее 20 нг/мл (50 нмоль/л). Данные значения используются как у взрослых, так и у детей [29]. В то же время целевой уровень 25(ОН)D на фоне терапии должен оцениваться с учетом возможных токсических эффектов, поэтому необходимо осуществлять контроль за эффективностью проводимого лечения: концентрация 25(ОН)D не должна превышать 55–60 нг/мл. Дефицит и недостаточность VD относят к группе так называемых «алиментарно-зависимых заболеваний», а именно, к «болезням недостаточности питания» [22].

В рамках Международной классификации болезней 10 пересмотра дефицит и недостаточность VD входят в класс IV «Эндокринные заболевания, болезни питания и метаболические заболевания (Endocrine, nutritional and metabolic diseases)», код E55, а в рамках принятой Всемирной организацией здравоохранения в 2019 г. и активно внедряемой в настоящее время классификации МКБ-11 относятся к классу 05 «Эндокринные заболевания, болезни питания и метаболические заболевания (Endocrine, nutritional and metabolic diseases)», код 5B57. В клинической практике для кодирования дефицита и недостаточности VD в целях медицинской статистики следует использовать указанные коды МКБ-10 или МКБ-11.

Схемы лечения, поддерживающей терапии и профилактики дефицита и недостаточности VD у детей и взрослых разработаны и внедрены в клиническую практику. Для этого рекомендуется использовать холекальциферол для лечения и профилактики дефицита VD [24,29]. В РФ для обозначения МНН/группировочного (химического) наименования лекарственных средств (ЛС), содержащих VD, обычно применяется вариант транслитерации «холекальциферол», реже используется транслитерация «колекальциферол») (Единый реестр свидетельств о государственной регистрации).

Основные схемы лечения и профилактики дефицита VD представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные схемы профилактики и лечения дефицита и недостаточности витамина D у взрослых

| Схемы профилактики и лечения | Дети | Взрослые |
|------------------------------|---|--|
| | Холекальциферол | Холекальциферол |
| Профилактика | Старше 18 лет – 1000 МЕ/сут | 18–50 лет – 600–800 МЕ/сут Старше 50 лет – 800–1000 МЕ/сут |
| | Холекальциферол | |
| Лечение | В зависимости от уровня 25(ОН)D – 10 нг/мл и менее – 4000 МЕ/сут 1 мес.; 11–20 нг/мл – 3000 МЕ/сут 1 мес.; 21–29 нг/мл – 2000 МЕ/сут 1 мес. С последующим контролем 25(ОН)D и назначением профилактической дозы при достижении уровня 30 нг/мл и более | Дефицит VD Фаза насыщения: 50 000 МЕ 1 раз в неделю 8 недель, или 200 000 МЕ 1 раз в мес. 2 мес., или 150 000 МЕ 1 раз в мес. 3 мес., или 7 000 МЕ/сут 8 недель Недостаточность VD Фаза насыщения: 50 000 МЕ 1 раз в неделю 4 недели, или 200 000 МЕ однократно, или 150 000 МЕ однократно, или 7000 МЕ/сут 4 недели. Фаза поддержания: 1500–2000 МЕ/сут, 6000–14 000 МЕ/сут |

В российском многоцентровом рандомизированном сравнительном исследовании была также продемонстрирована эффективность и безопасность применения препаратов холекальциферола в форме капсул в дозе 8000 МЕ/сут два месяца и 50 000 МЕ/неделю восемь недель в фазе насыщения с переходом в фазу поддержания на дозы 10 000 МЕ/нед. и 2000 МЕ/сут в течение 12 недель. Нормальная концентрация 25(ОН)D была достигнута у 90 % пациентов, получавших холекальциферол 50 000 МЕ/нед., и у 88 % больных, принимавших холекальциферол в дозе 8000 МЕ/сут, через восемь недель терапии [32].

В течение ряда лет для профилактики и лечения дефицита VD использовались ЛС, содержащие холекальциферол в качестве действующего вещества. Наряду с ЛС на российском рынке обращались БАДы, которые содержали холекальциферол в количестве до 600 МЕ.

В 2020–2021 гг. на фоне высокого интереса российского общества к проблемам обеспеченности VD и растущего понимания важности поддержания нормального его уровня отмечено появление значительного количества БАДов в твердых формах (таблетки и капсулы) и в жидких лекарственных формах (масляные растворы, спреи, водные растворы), содержащих VD в высоких дозах (от 1000 до 5000 МЕ холекальциферола в одной единице дозирования). На территории Евразийского экономического союза, в состав которого входит РФ, по состоянию на 08.06.2021 подписаны и действуют 1432 Свидетельств о государственной регистрации (СГР) БАДов, содержащих в своем составе в качестве одного из активных компонентов VD (Единый реестр свидетельств о государственной регистрации). БАДы доступны широкому кругу потребителей и отпускаются без рецепта как в аптеках, так и в неспециализированных торговых точках. Согласно информации, представленной в СГР на листках-вкладышах и на сайтах производителей данных БАДов, большинство из них предназначены для «восполнения дефицита и недостаточности витамина D».

Анализ регистрационной документации этих продуктов позволил выявить ряд особенностей:

- БАДы, содержащие холекальциферол в дозе 1000 МЕ и более, в форме таблеток не рекомендуются для деления и должны приниматься в суточной дозе не более 500 МЕ/сут, БАДы в форме растворов – в суточной дозе, не превышающей 500 МЕ/сут;
- все БАДы без исключения имеют ограничения по длительности приема, которая, как правило, коррелирует с зарегистрированной суточной дозой (от 1 мес. для 2000 МЕ до 6 мес. – для 500 МЕ).

Следовательно, суточные дозы и продолжительность применения БАДов, указанные в СГР, не позволяют эффективно проводить лечение и профилактику дефицита и недостаточности VD.

В Российском научном обществе эндокринологов достигнут консенсус в отношении установления статуса VD: наиболее показательным его индикатором является сывороточная концентрация 25(OH)D. Дефицит VD определяется как концентрация 25(OH)D менее 20 нг/мл (50 нмоль/л), недостаточность – 20–29 нг/мл (50–72,5 нмоль/л), адекватные уровни – более 30 нг/мл (75 нмоль/л).

С точки зрения формальной классификации и терминологии, дефицит и недостаточность являются терминами, обозначающими одно и то же состояние – снижение сывороточной концентрации 25(OH)D ниже нормальных значений, относящееся к классу IV «Эндокринные заболевания, болезни питания и метаболические заболевания» (Endocrine, nutritional and metabolic diseases), код E55 в классификации МКБ-10, и классу 05 «Эндокринные заболевания, болезни питания и метаболические заболевания» (Endocrine, nutritional and metabolic diseases), код 5B57 в классификации МКБ-11. В клинической практике для кодирования дефицита и недостаточности VD в целях медицинской статистики следует использовать указанные коды МКБ-10 (или в будущем МКБ-11).

В Российском научном сообществе эндокринологов (2021) также достигнут еще один консенсус, касающийся коррекции уровня VD у взрослых и детей: дефицит и недостаточность VD следует лечить путем назначения препаратов холекальциферола (который является оптимальным витамином для данной цели) в высоких насыщающих (150 000–200 000 МЕ в течение месяца / 392 000–450 000 МЕ в течение двух-трех месяцев для лечения дефицита/недостаточности у взрослых и 2000–4000 МЕ/сут в течение месяца у детей) с последующим переходом на поддерживающие дозы (1500–2000 МЕ/сут – у взрослых и 1000–1500 МЕ/сут – у детей).

Научное сообщество РФ не рекомендует назначать БАД-источники VD для лечения и поддерживающей терапии дефицита и недостаточности VD по следующим причинам:

- в отличие от лекарственных средств – препаратов холекальциферола, которые предназначены для лечения и профилактики заболевания и патологических состояний человека, БАД-D предназначен для нормализации состава пищевого рациона с целью обеспечения обычной пищевой потребности организма человека в VD;

- система контроля и обеспечения качества БАДов не может гарантировать эффективность и безопасность их применения в лечебных и поддерживающих дозах;

- в соответствии с действующим законодательством, БАДы с VD в РФ могут применяться в дозах, не превышающих 600 МЕ/сут, что недостаточно для лечения и поддерживающей терапии дефицита и недостаточности VD;

- Федеральный закон РФ в области здравоохранения № 323-ФЗ «Об охране здоровья граждан» от 21 ноября 2011 года не допускает использование БАДов для оказания медицинской помощи – лечения и поддерживающей терапии дефицита и недостаточности VD в данном контексте.

Лечение, поддерживающую терапию и профилактику дефицита и недостаточности VD следует проводить путем назначения ЛС, содержащих его (предпочтительно холекальциферол) в качестве действующего вещества.

Кроме того, VD представляет собой стероидный гормон, который оказывает свое действие посредством лигирования VDR, транскрипционного фактора семейства ядерных рецепторов. VDR оказывает не только физиологическое действие на метаболизм кальция, но и ряд других клеточных эффектов за счет обширного связывания с ДНК и модификации экспрессии генома. При раке он подавляет неоплазию. Проведен мета-анализ 25 исследований [70], в которых сообщается об уровнях VD (в форме его основного циркулирующего метаболита – 25(OH)D) у пациентов с

диагностированным РМЖ. Среднее содержание 25(ОН)D у пациенток с РМЖ составило 26,88 нг/мл, а у лиц контрольной группы – 31,41 нг/мл. 45,28 % женщин с РМЖ имели уровень 25(ОН)D ниже 20 нг/мл. Терапевтические преимущества при РМЖ могут быть обеспечены регулированием метаболическим путем концентрации VD [70].

1.5. Влияние витамина D на клетки линии MCF7 и на модели карциномы легкого Льюиса

VD оказывает дифференцированное действие на опухолевые клетки. Требуется дальнейшее его изучение, поскольку препараты VD должны использоваться довольно продолжительный период времени. Резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам образуется непосредственно на уровне протеома: увеличивается активность ферментов, которые отвечают за репарацию ДНК, метаболизм ксенобиотиков, таким образом происходит ограничение действия и выведение лекарственных средств, замедляются апоптотические сигнальные каскады опухолевых клеток, осуществляется взаимодействие цитокинов с ростовыми факторами, клетки находятся вне фазы клеточного цикла [34].

Таким образом, в условиях угнетения препаратом того или иного белка протеома и последующего уменьшения экспрессии генов, которые обеспечивают выживание и пролиферацию опухолевых клеток, не происходит повышения их сопротивляемости воздействию того или иного лекарственного средства.

Было изучено воздействие кальцитриола на транскрипцию аннотированных генов человека в клетках-предшественниках линии MCF7 опухолевых клеток РМЖ. Хемотранскриптомный анализ воздействия VD3 на эти клетки показал систематическое снижение экспрессии генов, участвующих в синтезе и транспорте белков. Эти изменения соответствуют ингибированию *гомеостаза белков*: синтез и новых, и старых

дисфункциональных белков происходит медленнее. Протеасомный распад белков снижается, за счет чего уменьшается выраженность хронического воспаления (каскад NF- κ B), наряду с этим увеличивается продолжительность активации апоптотических сигнальных каскадов. Снижение синтеза белка (в том числе митохондриального синтеза белка, сплайсинга мРНК, транспорта и фолдинга белков) приводит к уменьшению уровня ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков (в том числе противоопухолевых средств), и содержания белков, которые обеспечивают энергетический метаболизм клетки (синтез АТФ) [34].

Помимо этого VD вызывает выраженное ослабление экспрессии генов, вовлеченных в энергетический метаболизм, в том числе генов, кодирующих митохондриальные комплексы дыхательной цепи, ферменты окислительного фосфорилирования, метаболизма глюкозо-6-фосфата, НАДФ-дегидрогеназу и др.), что соответствует *снижению обеспеченности опухолевых клеток АТФ. VD способствует снижению транскрипции генов, непосредственно вовлечённых в пролиферацию опухолевых клеток.* Белки, соответствующие этим генам, осуществляют такие фундаментальные процессы, как поддержание целостности теломер, ремонт ДНК, активность сигнального пути рецептора фактора роста фибробластов, метаболизм фолиевой кислоты и др. В результате подавления активности теломеразы происходит уменьшение количества возможных делений клетки [34]. Репарация ДНК в опухолевых клетках снижается, стимулируя их апоптоз и усиливая эффекты замедления синтеза АТФ. Результаты хемотранскрипционного анализа показали подавление транскрипции генов из функциональной группы «хроническое воспаление» (MCF7 – 105 генов, нейрональные клетки – 37 генов). Гены этой группы в основном проявляют себя в биологическом действии провоспалительных факторов ФНО-альфа и NF- κ B. Установлено, что VD действительно подавляет влияние провоспалительного транскрипционного фактора NF- κ B [6]. Кроме того показано, что при взаимодействии с регулятором I κ -B транскрипционный фактор NF- κ B не

может перемещаться в клеточное ядро и стимулировать экспрессию генов, вызывающих провоспалительные эффекты цитокина ФНО-альфа.

Помимо этого был проведен анализ воздействия холекальциферола (в виде водного раствора мицелл) на рост первичной опухоли и ее метастазировании на примере перевиваемой карциномы легких Льюиса (КЛЛ). По данным молекулярно-биологических исследований, VD активирует механизмы противоопухолевой защиты. Подавляющее большинство биологических эффектов VD, включая противоопухолевые, осуществляется через взаимодействия рецепторов типа VDR с геномной ДНК. Так, системно-биологический анализ полногеномных исследований VDR, проведенных секвенированием с помощью иммунопреципитации хроматина (технология ChIP-seq), установил потенциальное воздействие VD на транскрипцию около 2700 генов человека. Противоопухолевые свойства VD связаны с регуляцией экспрессии сотен генов, участвующих в поддержании геномной стабильности (в том числе деления клетки, ремонта ДНК, реструктурирования хромосом), иммунитета, регуляции свертывания крови и др. [9].

1.6. Связь нарушений метаболизма витамина D с патогенезом рака молочной железы

Все больше научных данных подтверждают связь между обеспеченностью VD в организме и риском развития рака. VD является предшественником 1,25-дигидроксивитамина D, стероидного гормона, участвующего в различных процессах в организме, в том числе вызывающих рак. Различные механизмы, с помощью которых 1,25-дигидроксивитамин D может оказывать защитное действие против рака, включают индукцию апоптоза, стимуляцию дифференцировки клеток, противовоспалительные и антипролиферативные эффекты, ингибирование ангиогенеза, инвазии и метастазирования [62]. Однако ряд факторов, такие как ожирение, низкая

физическая активность, возраст, раса, тип кожи, курение и проживание в высоких широтах [49], а также хроническое воспаление, снижает уровень циркулирующего 25-гидроксивитамина D [50].

В течение последних нескольких лет в ряде исследований [60] показана связь между обеспеченностью VD и развитием РМЖ [161]. VD сегодня участвует не только в костном метаболизме, но и в поддержании многих физиологических функций. Этот стероидный гормон обладает эндо-, пара- и аутокринным действием [128]. Данные клинических исследований подтверждает взаимосвязь обеспеченности VD, риск развития РМЖ и смерти вследствие этого заболевания [55].

В одном из исследований у 250 пациентов с клиническим первичным РМЖ I–III стадии, которые перенесли радикальную операцию, оценены уровни 25(OH)D в сыворотке крови. Содержание 25(OH)D в сыворотке крови было положительно связано с возрастом и более существенно повышалось у женщин в пост-, чем в пре/перименопаузе. Низкий уровень 25(OH)D в сыворотке крови был в значительной степени связан с более коротким сроком до отдаленного рецидива (TTDR) и, согласно многофакторному анализу, являлся независимым неблагоприятным прогностическим фактором его формирования [141].

VD и его рецептор регулируют передачу сигналов аутофагии, чтобы контролировать воспаление и иммунитет хозяина, активируя противомикробные защитные механизмы. Установлено, что VD является мощным противораковым витамином, индуцирующим аутофагию патологических клеток, которые образовались в ответ на радио- и химиотерапию рака [48].

Отчетливая дозозависимая связь между частотой РМЖ и уровнем VD установлена по результатам мета-анализа 1760 наблюдений. В школе общественного здоровья в Гарварде и St. Georg's Hospital Study выполнены исследования, которые показали исходные уровни VD у женщин, соответствующих по возрасту, менструальной функции и заместительной

гормонотерапии и имеющих светлую кожу. Все участницы были распределены на пять равных групп в соответствии с содержанием VD, при этом при уровне VD 52 нг/мл наблюдалось 50 %-ное снижение риска развития РМЖ, чем при уровне VD менее 13 нг/мл [66].

Целевым уровнем VD, позволяющим снизить риск развития РМЖ более чем на 50 %, следует принять диапазон 40–60 нг/мл. К такому выводу в 2009 году пришла группа учёных, исследовавших связь содержания сывороточного VD и риска развития РМЖ [67]. На существенное снижение вероятности смерти женщин, больных РМЖ, с уровнем VD более 75 нмоль/л указывают и результаты анализа пяти когортных исследований, охвативших 4413 пациенток с РМЖ [106]. Канадские исследователи в 2009 г. показали, что пациентки с начальными стадиями злокачественной опухоли МЖ и содержанием промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D в сыворотке крови не более 20 нг/мл, обладали высоким риском развития метастатического поражения и летального исхода по отношению к тем женщинам, у которых показатели VD (25(OH)D) были более 29 нг/мл [72], кроме того, при приеме VD менее 10 мкг в сутки рассматривалось как связанный с риском развития прогрессирования заболевания [90]. Из этого следует, что обеспеченность VD у женщин со ЗНО МЖ важна для прогноза заболевания: воздействие на безрецидивную, так и на общую выживаемость пациенток, снижение риска генерализации злокачественного процесса, также подтверждается данными других авторов [121].

Более чем у 90 % пациенток с BRCA1-ассоциированным раком установлено присутствие VDR, ретиноидного X-рецептора (RXR), которые функционируют как факторы транскрипции. Авторы, которые проводили данное исследование, предположили, что данные рецепторы, возможно, могут использоваться как в профилактике, так и в лечении РМЖ, несмотря на присутствие мутации BRCA1 [78]. Высокая экспрессия VDR в ткани опухоли МЖ, обуславливает преимущественно благоприятные результаты как общей, так и безрецидивной выживаемости [58]. Активная форма VD обеспечивает

противопролиферативное воздействие на разные типы модифицированных клеток МЖ [71].

1.7. Патологические роли витамина D при раке молочной железы

До сих пор нет единого мнения об оптимальных уровнях VD 25(OH)D в сыворотке крови, содержание ниже 20 нг/мл было признано дефицитом, а выше 150 нг/мл – токсичным [36]. Все уровни между этими двумя крайними значениями считаются нормальными, а концентрация от 30 до 60 нг/мл – оптимальной.

Высокая распространенность дефицита VD наблюдается у всех рас, особенно высока у афроамериканских женщин [62]. VD может воздействовать на рак с помощью нескольких механизмов, которые кратко представлены на рисунке 1.



Рисунок 1 – Защитные механизмы действия витамина D на развитие рака

Вполне возможно, что VD играет определенную роль в контроле нормального роста клеток и обладает способностью останавливать рост опухолевых клеток в этом месте. Считается, что этот защитный эффект в значительной степени поддерживается химиопрофилактическим действием 1,25-гидроксивитамина D (1,25(OH)D-кальцитриола), биоактивной формы VD, хорошо известного регулятора уровня кальция [160].

Экспериментальные, доклинические и экологические исследования показали, что 1,25(OH)D индуцирует дифференцировку и апоптоз и ингибирует клеточную пролиферацию и ангиогенез в нормальных и злокачественных клетках МЖ. О подобных ассоциациях сообщалось в наблюдательных исследованиях. В результате мета-анализа обследования женщин с РМЖ [151] установлено, что циркулирующие уровни 1,25(OH)D обратно коррелируют с риском формирования РМЖ. Прямое действие VD на транскрипцию более 3000 генов, которые участвуют в регуляции роста, деления и апоптоза, который важен для элиминации опухолевых клеток, определяет его противоопухолевый эффект [86].

У жителей многих регионов России отмечается хронический дефицит VD, который вырабатывается вследствие низкого уровня УФО-В. Так, у женщин нашей страны старше 45 лет при определении уровня промежуточного метаболита VD – 25(OH)D в плазме крови установлено, что только 3 % имеют показатели в пределах нормальных значений [165].

Действие УФО-В на биосинтез VD может утратиться при условии применения солнцезащитных кремов, а также у лиц с темной кожей. Искусственное облучение с высоким уровнем УФО-А не показывает выраженного воздействия на процесс биосинтеза VD, более того, имеет проканцерогенное действие.

Зависимость приёма VD и снижение риска формирования онкологических заболеваний имеет несколько стадий, а терапевтическая эффективность препаратов на основе VD во многом зависит от некоторых дополнительных факторов. Известны минимум шесть стадий влияния VD на транскрипцию генов. При этом на каждой стадии функционируют определенные факторы, такие как: суммарный уровень УФО-В облучения, получаемого данным пациентом, активность метаболизма в печени и почках, уровень экспрессии генов – ферментов гидроксилаз, наличие веществ, ингибирующих гидроксилазы и т. д., от которых зависит терапевтический эффект приема VD [165].

Например, при заболеваниях почек (редкие наследственные аномалии обмена VD, метаболическая нефропатия и др.) употребление холекальциферола может не давать достаточного эффекта, поэтому необходимо применение активированных форм VD. Но их не всегда можно использовать для профилактики из-за титрования дозы и предупреждения развития гиперкальциемии у конкретного пациента [52].

Многочисленные данные доказательной медицины подтверждают взаимосвязь дефицита VD и риска развития РМЖ, рака толстого кишечника со смертностью от всех видов раковых заболеваний, а также антионкологический эффект VD. Данные системно-биологического анализа антионкологических эффектов VD и его воздействия на транскрипцию позволили сформулировать модель взаимосвязи между риском развития онкологических заболеваний и уровнем VD в организме [52].

Все больше научных данных подтверждают связь между VD и риском развития рака. Метаболит 1,25(OH)₂D проявляет свою активность, связываясь с VDR, который стимулирует транскрипцию и репрессию генов-мишеней. Эта связь способна регулировать сотни различных генов. VDR активен практически во всех тканях, включая толстую кишку, МЖ, легкие, яичники, кости, почки, паращитовидную железу, В-клетки поджелудочной железы, моноциты, Т-лимфоциты, меланоциты, кератиноциты, а также раковые клетки. Проведен анализ большего количества полиморфизмов VDR (Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1 и Cdx2) для отдельных ЗНО. Выполнено 176 независимых исследований для оценки риска развития рака головы и шеи, плоскоклеточного рака полости рта, кожи, щитовидной железы, легких, пищевода, печени, желчного пузыря и поджелудочной железы, РМЖ, рака предстательной железы, колоректального рака, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы и саркомы, рака почек, яичников, мочевого пузыря. Имеются сообщения о раке предстательной железы (Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1, Cdx2), молочной железы (Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1, CdX2), колоректальном раке (Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1) и раке кожи (Fok1, Bsm1, Taq1) [70].

Противоопухолевый эффект VD характеризуется антипролиферативной и иммуномодулирующей активностью VDR, который экспрессируется в клетках иммунной системы: Т- и В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах [86]. Антипролиферативное действие VD происходит путем подавления экспрессии рецепторов чувствительных к эстрогенам и инсулинзависимого фактора роста [45]. При проведении анализа биомаркёров злокачественной опухоли МЖ установлена взаимосвязь между экспрессией VDR и рецепторов к эстрогенам: так в эстроген-положительных опухолях МЖ встречаемость обнаружения VDR была особенно выше и равнялась 74,2 % [101]. Связь экспрессии VDR и рецепторов к прогестерону в клетках РМЖ подтвердили также исследования последних лет [116]. И нормальные, и опухолевые клетки МЖ экспрессируют VDR. Изучение гена VDR показало его значимую роль в развитии РМЖ. Полиморфизм VDR является весьма значимым аспектом функционального дефицита VD, значение которого изучено недостаточно, но вполне вероятно его связь с риском развития РМЖ [52].

У женщин с генотипом Fok1 ff риск развития РМЖ значительно повышен, что подтверждают результаты мета-анализа [139]. Под действием этого генотипа возникает образование менее активного белка VDR, со сниженными функциональными возможностями [53]. Кроме того, стоит отметить, что клетки с генотипом Fok1 ff имеют свою отличительную черту - повышать экспрессию генов ответственных за провоспалительные эффекты. Из этого следует, что при дефиците VD и наличие генотипа Fok1 ff увеличивается риск формирования и развития РМЖ [109]. На определённую связь мутаций гена VDR Apa1 с патологией МЖ указывают и результаты других исследований. В частности, проведённое в Калифорнии ретроспективное пилотное исследование показало, что носители гомозиготного полиморфизма Apa1 A2/A2 имеют повышенный индивидуальный риск развития РМЖ. Было осуществлено генотипирование 164 пациенток европеоидной расы, имеющих первичный РМЖ, группу контроля составили 174 женщины без патологии. Установлено, что женщины-

носительниц гомозиготного полиморфизма VDR Apa1 A2/A2 в 64 % случаев, имеют повышенный риск развития РМЖ против 34 % представительниц контрольной группы. Таким образом, полученные данные позволили отнести генетический полиморфизм VDR Apa1 A2/A2 к высокому риску развития РМЖ [56].

Участие других полиморфизмов VDR в формировании РМЖ также подтверждается результатами многих исследований. К примеру, A. C. Lundin et al. (1999) описали влияние гена Taq1 на прогрессирование заболевания. Повышенный риск метастатического поражения в регионарные лимфатические узлы наблюдался у пациенток с РМЖ без полиморфного гена Taq1, при этом тенденция к повышению выживаемости отмечалась у пациенток, гомозигот по этому полиморфизму [44]. L. C. Lowe et al. (2005) показали, что гомозиготы при генотипе Bsm1 имеют более высокий риск возникновения РМЖ, чем гетерозиготы [103].

В результате иммуногистохимического анализа ткани нормальной МЖ установлено, что кроме экспрессии белка VDR в метаболизме ферментов участвует CYP27B1 и CYP24A1 [146]. Своевременная и достаточная продукция активной формы VD, в частности 1,25(OH)D, напрямую влияет на реализацию его эффектов [8]. Сбои в процессах синтеза и деградации 1,25(OH)D происходят из-за изменения экспрессии генов, участвующих в синтезе 1 α - и 24-гидроксилазы – CYP27B1 и CYP24A, а также за счет снижения поступления экзогенного VD. МЖ содержит фермент – 24-гидроксилазу, при участии которого, осуществляется продукция менее активных метаболитов VD. Синтезированный метаболит витамина D 1,25(OH)D регулирует клеточную пролиферацию МЖ, в которой определяется еще и фермент 1 α -гидроксилаза. В развитии и нормальном функционировании МЖ имеет огромное значение такая паракринная продукция VD, при которой из-за нарушения этого баланса формируется патологические изменения тканей МЖ, иногда до злокачественной опухоли [115].

При злокачественном процессе опухолевые клетки не синтезируют активную форму VD, вследствие чего нарушается чувствительность VDR, в результате чего ускоряется падение уровня 1,25(OH)D. Следовательно, поддержание абсолютного уровня VD в сыворотке крови так же важна, как и нормализация метаболизма VD в тканях МЖ [115]. Наибольшее число исследований взаимосвязи VD и патологии МЖ относятся преимущественно к РМЖ [155].

Резюме к главе 1

Анализ доступной литературы показал, что возможности первичной профилактики РМЖ в группах повышенного риска (конституциональные особенности, голубой/серый цвет радужки, светлый тип кожи ожирение и др.) до настоящего времени не уточнены. У лиц с карциномой *in situ* определено существенное снижение экспрессии VDR, в 2 раза ниже, чем в нормальной ткани МЖ. При этом в 66,4 % случаев экспрессия CYP27B1 сохраняется на достаточно высоком уровне, что позволяет говорить о поддержании локального синтеза 1,25(OH)D. Кроме того, у 56 % таких пациенток экспрессия CYP24A1 повышена.

Таким образом, происходит повышение катаболизма активной формы VD в менее активные метаболиты, что приводит к выраженному функциональному дефициту VD в тканях карциномы МЖ. Например, N. Lopes и B. Sousa (2010) в своих работах показали, что низкая экспрессия VDR (56,2 % случаев) определяется как при инвазивных опухолях, так и при карциноме *in situ*. По нашему мнению, чрезвычайно глубокий дефицит VD испытывают именно ткани инвазивной карциномы МЖ.

РМЖ является гетерогенным заболеванием, и вполне возможно, что VD влияет только на определенные его подтипы. К тому же наличие нелинейной обратной связи между циркулирующим 25(OH)D и риском развития заболевания в постменопаузе, особенно на уровне или выше порогового значения 27 нг/мл, получило убедительные доказательства.

К сожалению, из доступных нам литературных источников нами не обнаружены исследования вопросов безопасности приема VD при ЗНО, в том числе при РМЖ.

В ходе детального изучения пока не установлена связь между менопаузой и риском развития РМЖ, но известно, что на этом этапе жизни женщины происходят два явления. Одно из них – увеличение с возрастом веса и формирование ожирения, второе – рост вследствие ожирения уровня циркулирующих эстрогенов, что и повышает риск развития гормонозависимого РМЖ. Также нами обнаружена информация о влиянии VD на фоне применения эстрогенсодержащих препаратов (эстрадиола и т. д.), при пероральном приёме которых отмечается выраженная пролиферативная активность. Одним из факторов риска развития РМЖ считают нарушения гормонального фона в виде гиперэстрогении в совокупности с гиперпролактинемией и прогестероновой недостаточностью [23].

Добавление VD может снизить риск развития РМЖ у этих женщин, поскольку способно подавлять экспрессию рецепторов эстрогена, а также ослаблять синтез и передачу сигналов этих гормонов.

Таким образом, эффективный целевой диапазон дозирования VD для оптимальной реализации его лечебных и профилактических эффектов в практической медицине по-прежнему не определен. В последнее время активно исследуются вопросы потребления VD для профилактики и лечения различных заболеваний и патологических состояний, однако в настоящее время отсутствуют отчетливые критерии и рекомендации по приёму VD при злокачественной опухоли МЖ. Кроме того, мы не обнаружили научных источников, где бы приводились результаты хемотранскриптомных исследований влияния VD на опухолевые клетки РМЖ. Изучению этих вопросов и посвящена данная работа.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая характеристика выделенных групп женщин

Работа выполнена на базе кафедры онкологии, акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России (и. о. ректора – доктор медицинских наук, профессор Е. В. Борзов), в поликлинике ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер» (ОБУЗ ИвООД) (главный врач – кандидат медицинских наук В. А. Козлов, заведующий поликлиникой – кандидат медицинских наук М. Л. Круглова). Исследование действия VD на рост и метастазирование перевиваемой КЛЛ проводилось на базе Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (заведующий лабораторией радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – доктор биологических наук М. В. Филимонова).

С целью изучения влияния рецепторов VDR с геномной ДНК проведен хемотранскриптомный и системно-биологический анализ данных, разработанный с использованием новейших методов искусственного интеллекта для оценки объема «сверхбольших данных» (big data) в Институте фармакоинформатики при ФИЦ «Информатика и управление» РАН (заведующий лабораторией вычислительной и системной биологии центра систем прогнозирования и распознавания при Вычислительном центре РАН им. А.А. Дородницына – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник института фармакоинформатики, доцент Торшин Иван Юрьевич).

Лечение пациенток с РМЖ проведено в хирургическом отделении № 1 ОБУЗ ИвООД (заведующий – А. Д. Недавний), лучевая терапия – в отделении лучевой терапии (заведующий – Д. В. Дрожжин), химиотерапия – в отделении химиотерапии (заведующий – Е. А. Готовкин). Цитологическое исследование пунктатов МЖ выполнено в цитологической лаборатории ОБУЗ ИвООД (заведующий – И. Н. Садыкова), гистологическое и иммуногистохимическое

исследования опухолевой ткани МЖ выполнены в патологоанатомическом отделении ОБУЗ ИвООД (заведующий – В. А. Васин), лабораторные исследования проведены в клинической лаборатории ОБУЗ ИвООД (заведующий – М. А. Комарова), биохемилюминесцентный анализ выполнен в научно-исследовательском центре ФБГОУ ВО ИвГМА Минздрава России (руководитель – доктор медицинских наук И. К. Томилова), определение промежуточного метаболита VD проведено в федеральной сети клинικο-диагностических лабораторий «Ситилаб» г. Иваново.

С 2018 по 2020 годы было обследовано 247 женщин в возрасте от 18 до 59 лет включительно, обратившихся на прием к врачу онкологу-маммологу в ОБУЗ ИвООД. Из них у 160 верифицирован РМЖ, у 8 – фиброаденома, у 60 – патологии МЖ не выявлено, у 19 – диффузная кистозная мастопатия. В исследуемую (I) группу вошли 160 пациенток с ЗНО МЖ (C.50 по МКБ-10) и дефицитом VD. В зависимости от приема препарата VD (холекальциферола) пациентки исследуемой группы были разделены на подгруппы: 1-ю составили 80 пациенток со ЗНО МЖ и дефицитом VD, которые принимали VD (холекальциферол). В зависимости от дозы холекальциферола лица 1-й подгруппы были в свою очередь разделены на подгруппы: 1А – 40 больных, принимавших 4000 МЕ холекальциферола в сутки и 1В – 40 пациенток, получавших 10000 МЕ холекальциферола в сутки; и 2-я подгруппа – 80 женщин с ЗНО МЖ и дефицитом VD, не принимавших препарат VD (холекальциферол). В контрольную группу вошли 60 пациенток, не имеющих патологии МЖ.

Критерии включения в исследование:

1. Наличие ЗНО МЖ, верифицированного гистологическим методом.
2. Возраст – от 18 до 59 лет включительно.

Критерии исключения из исследования:

1. Возраст моложе 18 и старше 60 лет.
2. Наличие в анамнезе заболеваний, сопровождающихся дефицитом VD: психические расстройства, острые инфекционные заболевания, острые

стадии хронических воспалительных процессов.

3. Период беременности и лактации.

2.2. Характеристика обследованных и методы исследования

Все клинические исследования проводились после утверждения этическим комитетом ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России – протокол № 1 от 17.01.2018 и получения информированного согласия и одобрения пациенток.

Комплексное обследование включало тщательный сбор анамнеза, применение клинико-инструментальных и лабораторных методов (рис. 2).

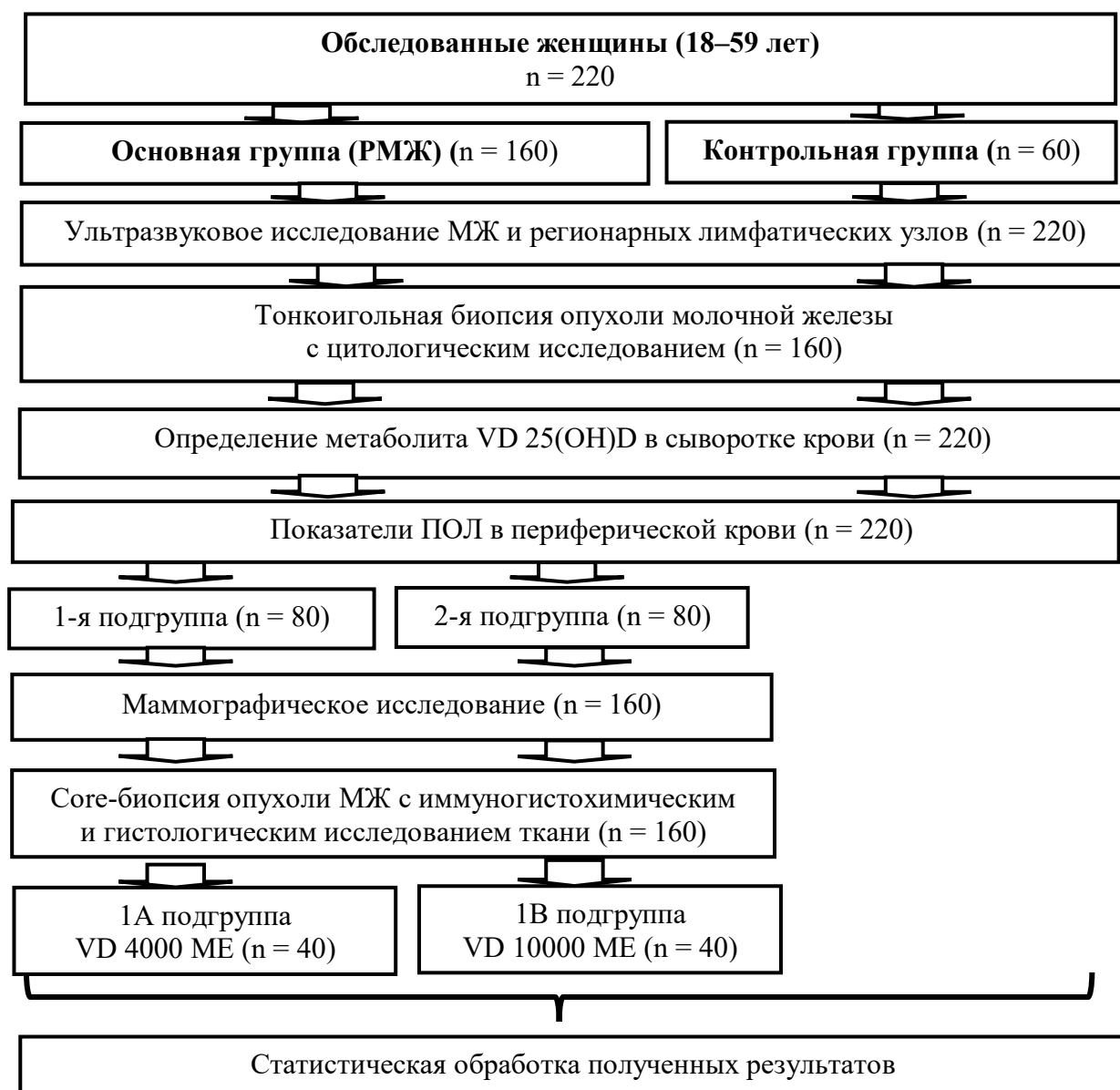


Рисунок 2 – Дизайн клинико-диагностического исследования пациенток

При сборе анамнеза обращали внимание на особенности преморбидного фона, наличие сопутствующих гинекологических и экстрагенитальных заболеваний. Оценивали средний возраст наступления менархе, особенности менструального цикла и наличие его нарушений, возраст начала половой жизни, количество половых партнёров, особенности репродуктивной функции: число беременностей, их течение и исход, особенности лактации, заболевания МЖ; онкологические заболевания в анамнезе и у ближайших родственников.

Для диагностики пациенткам выполнено ультразвуковое исследование (УЗИ) МЖ и регионарных лимфатических узлов, лицам старше 35 лет – цифровая маммография. Верификация злокачественного новообразования молочной железы подтверждалась результатами гистологического исследования ткани опухоли МЖ, которые были получены при выполнении core-биопсии.

Объектом исследования выбрана венозная кровь, которая забиралась из локтевой вены натошак с 7:00 до 9:00 часов утра.

УЗИ МЖ и регионарных лимфатических узлов проводилось у пациенток с ЗНО при первичном стадировании на аппарате экспертного класса Logiq F9 (США) с описанием данных согласно классификации BIRADS (2017).

Рентгеновская маммография проводилась на аппарате цифровой маммографии Senographe («Дженерал электрик») в двух проекциях (прямой и косой). Маммографические снимки описывались согласно системе Reporting and Data System, которая включает в себя шесть категорий.

Категория 1 – без очаговых изменений. Рекомендуемая тактика: дообследование не требуется, дальнейшее обследование проводится соответственно возрасту.

Категория 2 – доброкачественные изменения, отсутствуют признаки злокачественного процесса.

Категория 3 – доброкачественный процесс, при данной категории требуется более короткий интервал контроля очаговых образований.

Категория 4 – подозрение на злокачественные изменения ткани МЖ

Категория 5 – злокачественный процесс (рак).

Категория 0 – необходимо дообследование.

2.3 Гистологическое и иммуногистохимическое исследования ткани опухоли молочной железы

При core-биопсии опухоли МЖ проводилось гистологическое и иммунохимическое исследование тканей в патологоанатомическом отделении ОБУЗ ИвООД. При анализе первичного гистологического материала определялся гистологический тип рака – протоковый, дольковый и особые формы. Иммуногистохимическое исследование выполнялось с определением рецепторов стероидных гормонов, онкопротеина Her-2/neu, Ki-67 у 160 пациенток с ЗНО МЖ. Для определения рецепторов эстрогенов и прогестерона использовали полуколичественный метод, обозначаемый в Н-баллах. При оценке экспрессии Her-2/neu отмечали выраженность окрашивания цитоплазматической базальной мембраны: реакция «-», «+» – отсутствие гиперэкспрессии, реакция «+++» – наличие гиперэкспрессии Her-2/neu, в случаях реакции «++» гиперэкспрессии Her2/neu проводился метод гибридизации in situ с использованием флюоресцентной метки FISH (флюоресцентная in situ гибридизация). При выявлении экспрессии Ki67 в ядрах опухолевых клеток производили подсчет окрашенных клеток и оценивали результат в %.

2.4. Биохимические исследования крови обследованных женщин

Исследование крови пациенток проводилось с помощью хемилюминесцентного иммуноферментного анализа на микрочастицах (ARCHITECT i1000sr, Abbott Core Laboratory, США), по стандартным

методикам [15] осуществлялось биохимическое определение уровня 25(OH)D и 1,25(OH)D.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови пациенток определяли методом индуцированной биохемилюминесценции и измеряли на приборе БХЛ-07 («ИМБИО», Нижний Новгород). Рассчитывали следующие показатели: I_{\max} – максимальная интенсивность за все время измерения (мВ), S – светосумма за 30 с, обратно пропорциональная антиоксидантной активности (мВ×с), tg со знаком «-» – показатель активности антиоксидантной системы: чем выше значение tg , тем напряженной антиокислительная защита (мВ/с). Уровень малонового диальдегида (МДА) – показатель деструкции мембран клеток и конечный продукт неферментативной утилизации продуктов ПОЛ [162].

Количество клеток эндотелия, циркулирующих в крови, определяли методом J. Hladovec (1973). С помощью аденозиндифосфата (АДФ) происходит осаждение тромбоцитов и выделение эндотелиальных клеток. Для этого выполняется забор венозной крови в объеме 4–5 мл и помещается в пробирки, для стабилизатора применяется 3,8 %-ный раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 9. Далее кровь центрифугируется в течение 10 мин при 200 g (1000 оборотов). В результате образуется плазма, богатая тромбоцитами. Чтобы отделить уровень тромбоцитов, к 1 мл плазмы добавляется 0,4 мл раствора АДФ в концентрации 0,5 мг/мл, полученную смесь перемешивают в течение 10 мин, тщательно встряхивая пробирки и центрифугируя в прежнем режиме.

Полученный супернатант, отделенный от тромбоцитов, переносится в другие пробирки и центрифугируется в течение 10 мин при 200 g (1000 оборотов) с целью осаждения эндотелиальных клеток. Полученный осадок в 0,1 мл 0,9 %-ного раствора NaCl суспензируется и перемешивается стеклянной палочкой. Готовая суспензия помещается в камеру Горяева. В двух сетках камеры подсчитывается общее количество эндотелиальных клеток, учитывая соотношения между числом клеток в сетке и объемом

камеры Горяева, объема плазмы и объема полученной суспензии. Стандартным способом по методике J. Hladovec (1978) приготавливаются препараты десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК) и определяется их концентрация в 1 л плазмы по формуле:

$$\text{ДЭК} = 0,56 \cdot N \cdot 10^5,$$

где N – число ДЭК в двух сетках камеры Горяева, 0,56 – коэффициент, который учитывают при объеме камеры и изменения объема исследуемого материала в процессе приготовления препаратов ДЭК. Для расчета концентрации ДЭК в 1 л цельной крови использовали следующую формулу:

$$\text{ДЭК} = (0,56 \cdot N \cdot (100 - \text{Ht}) / 100) \times 10^5,$$

где 10^5 – степень, учитывающая концентрацию ДЭК; N – количество ДЭК, полученное при их подсчете в двух сетках камеры Горяева; Ht – показатель гематокрита [79].

2.5 Фармакокинетические исследования различных форм холекальциферола у женщин-добровольцев

Изучалась фармакокинетика фармакологических субстанций, разных форм холекальциферола (масляный раствор, капсула, водный раствор) для выбора наилучшего варианта на дальнейших этапах исследования. С этой целью отобрана группа женщин-добровольцев в возрасте 24–53 лет ($n = 18$) без патологических изменений в МЖ, которые были разделены на три равные группы. Обследуемые однократно получили разные формы холекальциферола в дозе 10 000 МЕ (рис. 3).

Фармакокинетический многокамерный анализ выполнялся с использованием пакета SimBiology в составе программного комплекса MATLAB-2016 [63], а бескамерный – с помощью электронных таблиц Excel, дополненных модулями программного пакета PKSolver [170].

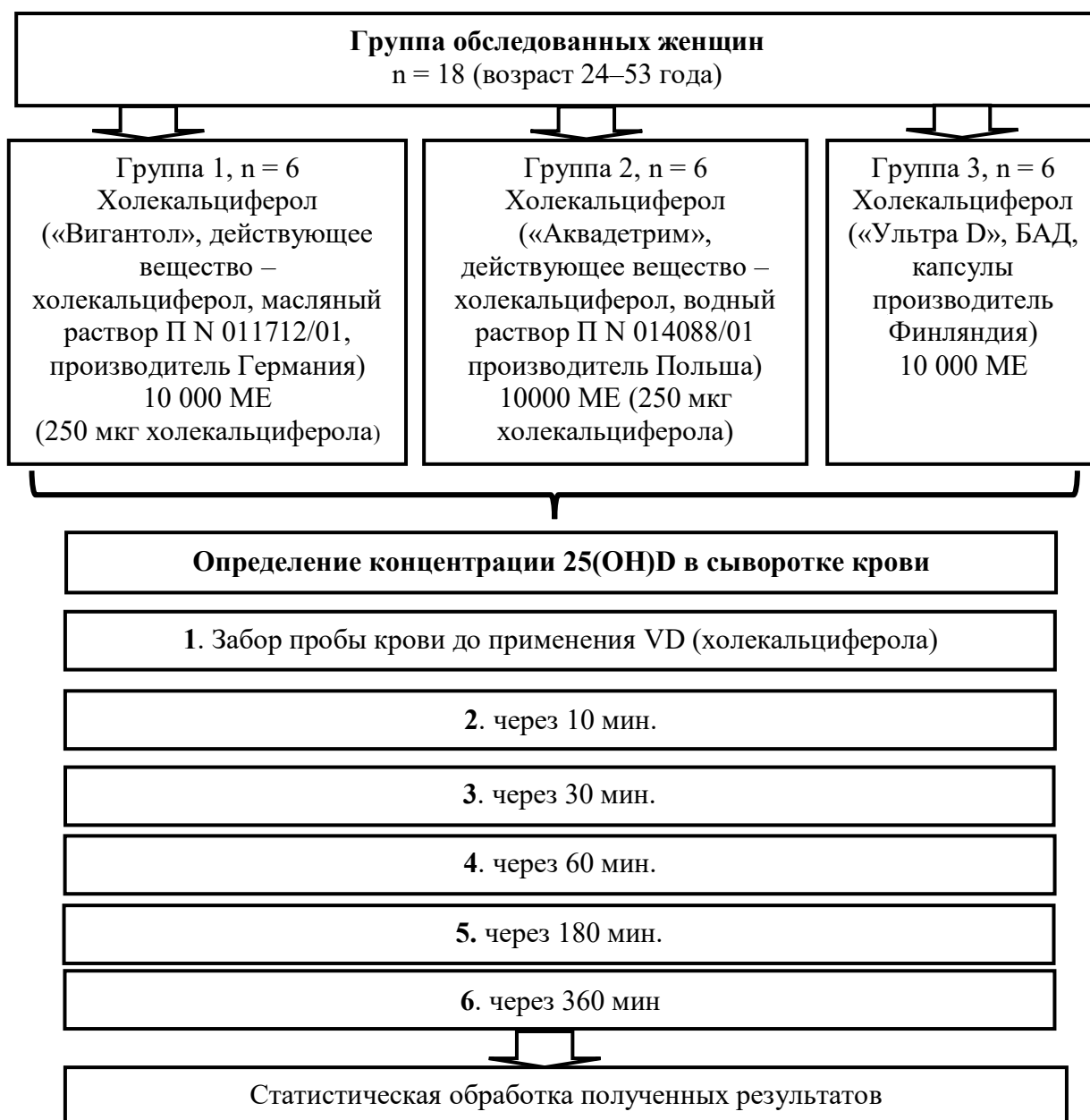


Рисунок 3 – Дизайн фармакокинетического исследования женщин-добровольцев 24–53 лет

2.6. Экспериментальное исследование противоопухолевого эффекта холекальциферола на модели перевиваемой карциномы лёгких Льюиса у мышей-гибридов

Воздействие холекальциферола (в виде водного раствора мицелл в дозе 5 мкг/кг/сут) на рост и метастазирование ЗНО изучалось на модели КЛЛ у

мышей-гибридов F₁. Для этого отобраны 30 самцов мышей-гибридов F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) массой тела 26–29 г и возрастом 2,5–3 месяца.

В питомнике ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Андреевка») получили лабораторных животных, которые имели ветеринарный сертификат и были выдержаны на карантине в течение 20 дней в виварии МРНЦ им. А.Ф. Цыба. В соответствии с нормами размещения групп животных мыши содержались на простерилизованных древесных стружках, в клетках Т-3 при естественном освещении, при влажности воздуха 40–70 %, температуре воздуха 18–20 °С, а также при 16-кратном регулярном принудительном проветривании и свободном доступе к питанию и питьевой воде (брикетированный корм ПК-120-1, ООО «Лабораторснаб», Россия стандартный по ГОСТ Р50258-92). С помощью морфометрических методов проводили оценку воздействия VD на рост и метастазирование КЛЛ [156].

Для этой цели на 7-е, 10-е, 13-е, 17-е и 21-е сутки после перевивки КЛЛ у животных ($n = 30$), когда опухолевые узлы уже достигали измеряемого размера, определяли линейные параметры первичной опухоли в ортогональных плоскостях, вычисляли их объёмы в эллиптическом приближении: $V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{x}{2} \cdot \frac{y}{2} \cdot \frac{z}{2} \approx 0,524 \cdot x \cdot y \cdot z$, где V – объём опухоли (мм³); x, y, z – ортогональные линейные размеры (мм). Далее выполняли статистическую проверку различий объёмов опухоли на различных этапах роста.

По результатам полученных данных подсчитывали значение индекса торможения роста опухоли (ТРО) или индексы их роста (ИР):

$$TPO = \frac{V_K - V_O}{V_K} \cdot 100\%; \quad IP = \frac{V_O}{V_K} \cdot 100\%,$$

где V_K и V_O – средние объёмы опухоли у животных контрольной и подопытной групп на определённом сроке наблюдения.

По экспоненциальным кривым роста оценивали продолжительность торможения роста ЗНО и, соответственно, противоопухолевое действие холекальциферола (рис. 4).



Рисунок 4 – Дизайн экспериментального исследования на модели КЛЛ у мышей-гибридов F₁.

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. Затем осуществляли проверку статистических данных межгрупповых различий количества метастазов в легких и проводили расчет ИИМ: $ИИМ = \frac{f_o}{f_k} \cdot \frac{M_k - M_o}{M_k} \cdot 100\%$, где f_o , f_k – число лабораторных животных с метастазами в опытной и контрольной группах, M_o , M_k – среднее число метастазов у мышей-

гибридов опытной и контрольной групп, по которым оценивали антиметастатическое действие изучаемых соединений.

О статистической значимости различий между групп суждали с помощью рангового дисперсионного анализа Краскела – Уоллиса с использованием критерия Данна. Во всех случаях различия считали достоверными при $p < 0.05$.

2.7. Хемотранскриптомный анализ дозозависимого действия витамина D на экспрессию генов в опухолевых клетках MCF7 и в клетках-предшественниках нейронов NPC

В базе данных GEO (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 молекул.

Результаты транскриптомных экспериментов в базе данных GEO представлены в виде таблиц, столбцам которых соответствуют гены, а строкам – соответствующие воздействия на клетку (например, те или иные молекулы). Элементами таблиц являются изменения экспрессии гена при соответствующем воздействии. Каждой такой «таблице транскриптомного эксперимента» соответствуют (1) *тип клеток*, для которых изучались изменения экспрессии, (2) *интенсивность воздействия* (прежде всего, концентрации воздействующих молекул) и (3) *время воздействия* (6, 12, 24 ч и др.). Изменения экспрессии оцениваются относительно контроля (как правило, ДМСО, диметилсульфоксид).

При задании (1) типа клеток (например, фибробласты), (2) концентрации и (3) времени воздействия каждый столбец такой таблицы соответствует химической реакции «Ген_{*i*} → мРНК_{*i*}», в результате которой

осуществляется синтез i -й молекулы мРНК_i , соответствующей i -му гену (Ген_i). Данные, содержащиеся в таком столбце таблицы \mathbf{T} транскриптомного эксперимента, включающей информацию об изменении экспрессии N генов при воздействии n молекул, могут рассматриваться как описание определённого элемента реактома (т. е. совокупности всех химических реакций). Соответственно, становится возможным применение теории хемографов [144], методологии хемоинформационного [144] и хемореактомного анализа [7] для осуществления хемотранскриптомного моделирования.

2.7.1. Хемотранскриптомный анализ

Исходной выборкой информации для изучения алгоритмов хемотранскриптомного анализа является i -й $\mathbf{g}_i = (\mathbf{X}_{ij}, \Delta_{ij})^T$ столбец таблицы $\mathbf{T} = ((\mathbf{X}_{ij}, \Delta_{ij})), i = 1, \dots, N, j = 1, \dots, n$, соответствующий i -му гену и содержащий информацию о структуре j -й воздействующей молекулы (хемограф \mathbf{X}_{ij}) и изменение транскрипции (экспрессии) генов при воздействии данной молекулы, $\Delta_{ij} \in \mathbb{R}$. Хемограф (χ -граф) – особая разновидность графа (т. е. математического объекта, являющегося совокупностями множества вершин и множества ребер – связей между вершинами). Хемографом называется конечный, связный, неориентированный, размеченный граф без петель, с кликовым числом, не превышающим 3.

Данные, представленные в столбцах \mathbf{g}_i , обрабатываются методами хемоинформационного анализа, основанными на комбинаторной теории разрешимости [7], представляющей собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания. Эта теория является современным математическим инструментом для исследования признаков описаний объектов. В применении к анализу хемографов практически важны *теорема о полноте кортежей инвариантов произвольного хемографа* и *теорема соответствия критерия полноты инварианта критерию разрешимости/регулярности*

[144], на основании которых становится возможным определение и настройка («обучение») функций расстояния между хемографами.

При использовании *метрики Хэмминга* функция расстояния между хемографами d_χ над бинарными χ -инвариантами определяется как
$$d_\chi(\mathbf{X}_1, \mathbf{X}_2) = \frac{1}{|\chi|} \sum_{k=1}^{|\chi|} \omega_k \hat{\mathbf{i}}[k] \hat{\mathbf{\beta}}[\mathbf{X}_1]_\chi \oplus \hat{\mathbf{i}}[k] \hat{\mathbf{\beta}}[\mathbf{X}_2]_\chi,$$
 где χ – множество элементарных χ -инвариантов (всех возможных фрагментов химических структур), $\hat{\mathbf{i}}[\chi]$ – кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы), $\hat{\mathbf{\beta}}[\mathbf{X}_j]$ – способ вычисления бинарных признаков описаний для хемографа \mathbf{X}_j , соответствующих фрагментам молекулярной структуры из множества χ , ω_k – вес k -го признака. Приведённое выше выражение, отражающее «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами \mathbf{X}_1 и \mathbf{X}_2 , является основой хемоинформационного анализа вообще, и хемотранскриптомного анализа в частности.

Расстояние d_χ является настраиваемой метрикой, т. к. содержит произвольно настраиваемые параметры – веса ω_k . Для набора данных, заданных i -м столбцом (\mathbf{g}_i) таблицы \mathbf{T} транскриптомного эксперимента, настройка вектора параметров (ω_k) может осуществляться теми или иными методами машинного обучения. Мы используем метод хеометрического анализа, который подразумевает использование процедуры согласования пар метрик, одной из которых является «химическое расстояние» d_χ , а второй – метрика d_Δ , вычисляемая на основе значений изменений экспрессии Δ_{ij} , представленных в столбце \mathbf{g}_i . Согласование заключается в подборе таких значений весов ω_k , при которых различия между значениями согласуемой пары метрик, d_χ и d_Δ , минимально.

Задача машинного обучения для согласования метрик формулируется как $\arg \min_{(\omega_k)} [L(d_\chi(\mathbf{X}_{ij}, \mathbf{X}_{ij}), d_\Delta(\Delta_{ij}, \Delta_{ij}))]$, $i = 1, \dots, N$, $j = 1, \dots, n$, где L – используемая функция потерь (сумма квадратов невязок, стандартное отклонение и т. п.). В результате обучения алгоритма «химическое расстояние» $d_\chi(\mathbf{X}_{i1}, \mathbf{X}_{i2})$ между парой молекул \mathbf{X}_{i1} и \mathbf{X}_{i2} соответствует различию в значениях изменений экспрессии Δ_{i1} и Δ_{i2} , отражаемых метрикой $d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2})$ с точностью до линейного преобразования y_i , т. е.

$$d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2}) = y_i(d_\chi(\mathbf{X}_{i1}, \mathbf{X}_{i2})) = a_{\chi \rightarrow \Delta} d_\chi(\mathbf{X}_{i1}, \mathbf{X}_{i2}) + b_{\chi \rightarrow \Delta}.$$

В целом, на первом этапе хемотранскриптомного анализа для i -го гена, описываемого столбцом \mathbf{g}_i таблицы \mathbf{T} , проводится обучение алгоритмов для вычисления химических расстояний d_χ .

На втором этапе для исследуемой молекулы \mathbf{x} рассчитываются расстояния $d_\chi(\mathbf{x}, \mathbf{X}_{ij})$ до всех хемографов \mathbf{X}_{ij} столбца $\mathbf{g}_i = (\mathbf{X}_{ij}, \Delta_{ij})^T$ и, по формуле $d_\Delta = y_i(d_\chi)$, вычисляются оценки расстояний d_Δ от искомого изменения экспрессии Δ_χ до известных значений Δ_{ij} столбца \mathbf{g}_i . Затем для каждой j -й молекулы по формуле $\Delta_{xj} = d^{-1}(d_\Delta, \Delta_{ij})$ вычисляются оценки искомого изменения экспрессии, образующие множество чисел $A = \{\Delta_{x1}, \Delta_{x2}, \dots, \Delta_{xj}, \dots, \Delta_{xn}\}$, к которому применяется оператор $\hat{f}(x)$ для формирования эмпирической функции распределения (э. ф. р.), так что $\hat{f}(x)A = \sup\{B \subseteq A \mid \forall a \in B : a \leq x\} / |A|$, $x \in \mathbb{R}$. С использованием полученной э. ф. р. $\hat{f}(x)A$ искомое изменение экспрессии Δ_χ вычисляется как математическое ожидание $\hat{f}(x)A$, а точность вычисления Δ_χ – как стандартное отклонение $\hat{f}(x)A$. Представленные далее в таблицах и рисунках оценки изменений экспрессии различных констант были получены как математическое ожидание и дисперсия соответствующей эмпирической функции распределения.

На третьем этапе для исследуемой молекулы X для каждого гена вычисляются оценки $\Delta_X(c_m)$ при различных концентрациях c_m вещества X . Графики в координатах $\{(\Delta_X(c_m), c_m)\}$ анализируются методами регрессионного анализа и выявляются достоверные дозозависимые тренды изменения экспрессии в зависимости от c_m . Отбираются только те кривые $\Delta_X(c_m)$, которые могут быть описаны достоверными линейными трендами (коэффициент корреляции 0,6 и более, $p < 0,05$ по критерию Колмогорова – Смирнова) во всем диапазоне исследуемых концентраций (0,01...10 мкмоль кальцитриола). Для каждого из отобранных трендов устанавливается знак изменения экспрессии i -го гена («+»-тренд – достоверное повышение экспрессии при увеличении концентрации кальцитриола, «-»-тренд – достоверное снижение экспрессии i -го гена при увеличении концентрации кальцитриола) и соответствующие трендам гены подразделяются на список генов, для которых показано достоверное повышение экспрессии, и список генов со сниженной экспрессией. К двум полученным спискам применяются методы системно-биологического анализа.

2.7.2. Системно-биологический анализ

Списки генов с достоверным повышением или снижением экспрессии генов, которые были получены в результате применения описанного выше хемотранскриптомного подхода, анализировались посредством метода функционального связывания [144]. Анализ проводится с использованием международной номенклатуры Gene Ontology (GO), описывающей физиологические функции генов и соответствующих белков. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов – белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов) в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определенной геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго

очерченный круг специфических функций. Как мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (ионов металлов – кальция, магния, цинка; витаминов группы В и др.) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики.

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней (сведения о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, о клеточных ролях белков, симптоматику и критерии диагностики заболеваний и т. д.) позволяет систематически рассмотреть все возможные функциональные эффекты воздействия кальцитриола на транскрипцию каждого из генов. На основе анализа функциональных взаимосвязей для каждого гена человека составляется аннотированная таблица изменений экспрессии генов, включающая следующие описания [144]:

- соответствующий гену белок;
- список биохимически необходимых эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности ионов кальция для его активности);
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка;
- список клеточных функций белка (по номенклатуре GO и др.);
- список отдельных симптомов заболеваний и диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее в полученной таблице выделяются гены, частота встречаемости функциональных описаний которых существенно отличается при достоверном повышении экспрессии по сравнению с достоверным снижением экспрессии и проводятся последующие анализы их функций на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчет числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и

дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия χ^2 , Т-критерий Вилкоксона – Манна – Уитни и тест Стьюдента.

2.8. Методы статистической обработки результатов исследования

Результаты клинического исследования обрабатывали с использованием методов математической статистики: производился расчет числовых характеристик случайных величин, проверка статистических гипотез на основе параметрических и непараметрических критериев. Сравнивая прогнозируемую и наблюдаемую частоты встречаемости исследуемых признаков использовали критерии χ^2 , Вилкоксона–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 предиктора, концентрации 25(OH)D проводили с использованием ROC-анализа для представления результатов.

Помимо стандартных подходов были применены новейшие методы анализа информативных численных параметров, определения метрических сгущений показателей биомедицинского исследования и построения метрических карт [142] с использованием программного пакета MEDSTUDY, разработанного в Федеральном исследовательском центре «Информатика и управление» РАН.

Глава 3. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ ЛЬЮИСА

Одной из задач нашего диссертационного исследования было изучение воздействия VD (в виде водного раствора мицелл) на рост опухолей КЛЛ и их метастазирование. Для этого было отобрано 30 мышей-гибридов F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) (2,5–3 месяца, масса 26–29 г)

3.1. Модель перевиваемой эпидермоидной карциномы легких Льюиса

В качестве опухолевой модели принята перевиваемая эпидермоидная КЛЛ, которая относится к опухолевым системам, обязательным для доклинических исследований возможных противоопухолевых и антиметастатических средств [61]. Нами был получен штамм клеток КЛЛ из банка опухолевых препаратов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина, который поддерживался на самцах мышей C₅₇BL_{6j}.

Ткань опухоли забирали на 14-е сутки роста, затем измельчали до гомогенного состояния, далее фильтровали через нейлоновый фильтр в камере Горяева под микроскопом CX21 (Olympus Corp., Япония), определяли концентрацию взвеси средой 199 («Пан-Эко», Россия), доводили до $1,9 \cdot 10^7$ кл/мл ее клеточность. С помощью подкожного введения 0,1 мл суспензии ($1,9 \times 10^6$ клеток) на внешнюю поверхность правого бедра осуществляли перевивку КЛЛ.

Мышей-гибридов F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) после перевивки КЛЛ разделили на две группы: опытную (n = 15) и контрольную (n = 15). Опытная группа (15 особей) со 2-е по 20-е сутки ежедневно интрагастрально однократно получала раствор холекальциферола в объёме 0,1 мл на 10 г массы тела (в расчете 5 мкг/кг/сут). Животным контрольной группы по такой же схеме, таким же путём и в таком же объёме вводили дистиллированную воду в объёме 0,1 мл на 10 г массы тела.

3.2. Оценка показателей состояния лабораторных животных, первичной опухоли и метастатического процесса в модели перевиваемой карциномы легкого Льюиса

Каждый день в процессе наблюдения за состоянием животных оценивали объем потребления корма и воды, поведенческие реакции, двигательную активность. Измеряли массу тела каждые трое-четверо суток.

С помощью морфометрических методов проводили оценку воздействия холекальциферола на рост первичных опухолей и метастатического процесса КЛЛ [156]. Для этой цели на 7-е, 10-е, 13-е, 17-е и 21-е сутки после перевивки КЛЛ, когда опухолевые узлы уже достигали измеряемого размера, у животных ($n = 30$) определяли линейные размеры первичной опухоли в ортогональных плоскостях, вычисляли их объёмы в эллиптическом приближении и затем выполняли статистическую проверку различий объёмов опухоли на различных этапах роста. По результатам этих расчётов вычисляли индекс ТРО.

По экспоненциальным кривым роста оценивали продолжительность торможения роста ЗНО и, соответственно, о противоопухолевом действии холекальциферола.

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. Далее осуществляли проверку статистических данных межгрупповых различий числа метастазов в легких и проводили расчет ИИМ: $ИИМ = \frac{f_o}{f_k} \cdot \frac{M_k - M_o}{M_k} \cdot 100\%$, где f_o , f_k – число лабораторных животных с метастазами в опытной и контрольной группах, M_o , M_k – среднее число метастазов у мышей-гибридов опытной и контрольной групп, по которым оценивали антиметастатическое действие изучаемых соединений.

О статистической значимости различий между группами судили с помощью рангового дисперсионного анализа Краскела – Уоллиса с использованием критерия Данна. Во всех случаях различия считали достоверными при $p < 0,05$.

3.3. Результаты экспериментального исследования воздействия холекальциферола (в виде водного раствора мицелл) на карциному легких Льюиса

Изучение действия VD на рост первичной опухоли и метастатическое поражение перевиваемой КЛЛ в экспериментальном исследовании показало, что подопытные животные с легкостью переносили препарат холекальциферол в виде водного раствора мицелл. При ежедневном однократном интрагастральном введении препарата общее состояние мышей не изменялось. Двигательной активности, повышения возбудимости у подопытных животных не определялось. В результате введения изучаемого препарата прибавление массы тела у мышей не произошло (табл. 3).

Таблица 3 – Прирост массы тела животных в исследованных группах

| Срок наблюдения, сут | Средняя масса тела, отн. ед. ($M \pm m$) * | |
|----------------------------|--|---|
| | опытная группа (холекальциферол водный раствор) | контрольная группа (дистиллированная вода) |
| 0-е | 1,00 | 1,00 |
| 3-и | $1,01 \pm 0,07$ | $1,01 \pm 0,08$ |
| 7-е | $1,05 \pm 0,07$ | $1,04 \pm 0,09$ |
| 10-е | $1,05 \pm 0,07$ | $1,05 \pm 0,09$ |
| 13-е | $1,07 \pm 0,05$ | $1,06 \pm 0,10$ |
| 17-е | $1,06 \pm 0,06$ | $1,06 \pm 0,09$ |
| 21-е | $1,11 \pm 0,05$ | $1,10 \pm 0,09$ |

Примечание. * – данные нормированы на исходную массу тела.

У особей контрольной группы рост первичных опухолей КЛЛ был типичным для данной опухолевой системы: к 7-м суткам после перевивки у

100% животных определялся опухолевый узел объёмом 50–70 мм³, изучаемый препарат в ходе эксперимента не оказывал статистически достоверного влияния на средний объём опухоли к 21-му дню эксперимента (табл. 4).

Таблица 4 – Динамика роста перевиваемой карциномы лёгких Льюиса в экспериментальных группах

| Срок наблюдения, сут | Средний объём опухоли, мм ³ (M ± m) | |
|----------------------|--|---|
| | Опытная группа (холекальциферол водный раствор) | Контрольная группа (дистиллированная вода) |
| 7-е | 52,9 ± 24,0 | 54,1 ± 37,5 |
| 10-е | 202,1 ± 97,3 | 193,1 ± 119,0 |
| 13-е | 483,1 ± 215,6 | 414,1 ± 209,0 |
| 17-е | 1133,1 ± 504,2 | 1002,5 ± 386,6 |
| 21-е | 1831,7 ± 661,5 | 1826,9 ± 665,6 |

Кроме того, влияние холекальциферола до 13-х суток развития КЛЛ приводило к нарастающей тенденции торможения роста опухолей: индекс ТРО возрастал на 25–30 % по сравнению с контролем/плацебо (дистиллированная вода) (табл. 5).

Таблица 5 – Индекс торможения роста опухоли в опытных группах (%)

| Срок наблюдения, сутки | 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 |

На 13-е сутки статистически значимые различия между опытной и контрольной группами были обоснованы результатами анализа пучка индивидуальных кривых скорости роста опухолей (рис. 5).

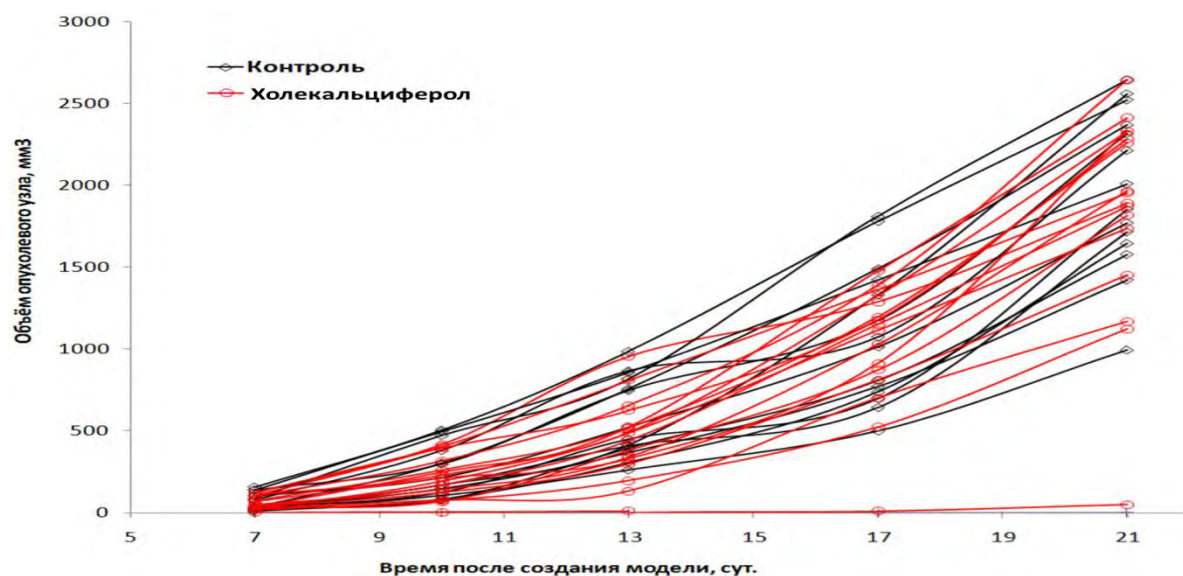


Рисунок 5 – Индивидуальные кривые скорости роста опухолей в опытной и контрольной группах.

Хотя различия между группами не были статистически значимыми к 21-м суткам, но к 13-м суткам установлено достоверное снижение интенсивности скорости роста первичной опухоли на фоне приёма холекальциферола ($p = 0.016$) (рис. 6).

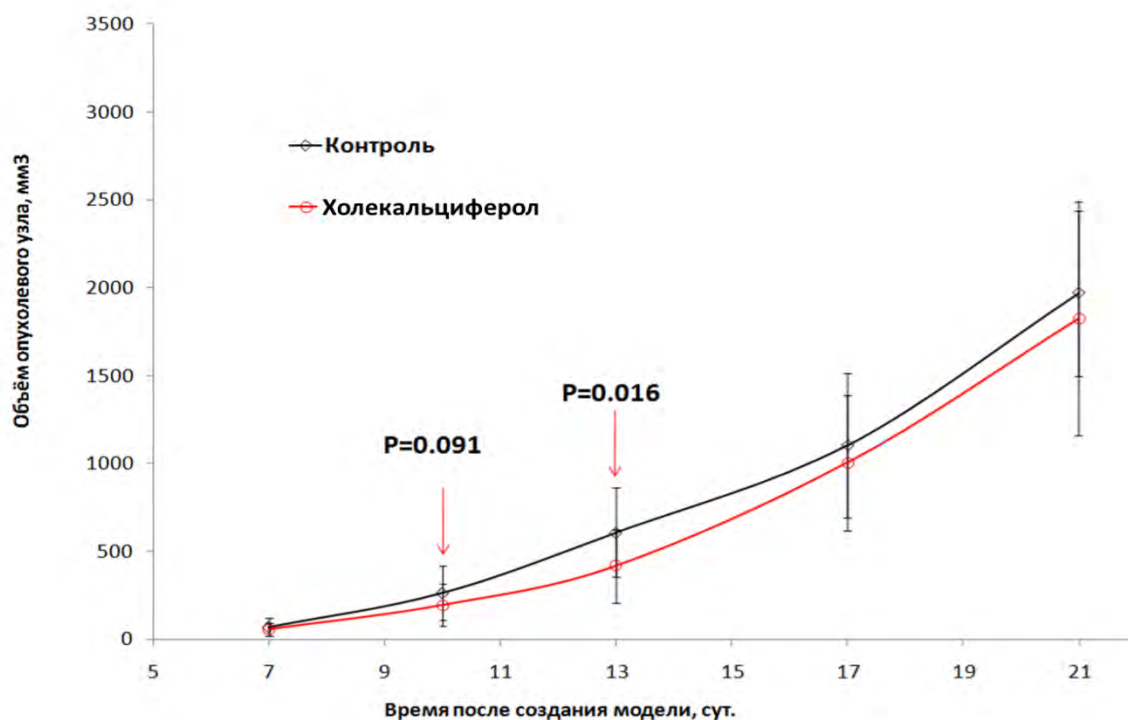


Рисунок 6 – Достоверные различия скорости роста первичной опухоли в экспериментальных группах

Сопоставление усреднённых кривых скорости роста первичной опухоли у животных предоставило статистически значимые отличия по t-тесту между экспериментальными группами. На 13-е сутки эксперимента при расчете непараметрических параметров с помощью теста Колмогорова – Смирнова зафиксировано статистически значимое снижение скорости роста первичной опухоли в опытной группе. Максимальное отклонение (D) между распределениями, построенными для экспериментальных групп на 13-е сутки, составило $D = 0,36$ ($p = 0,033$) (рис. 7).

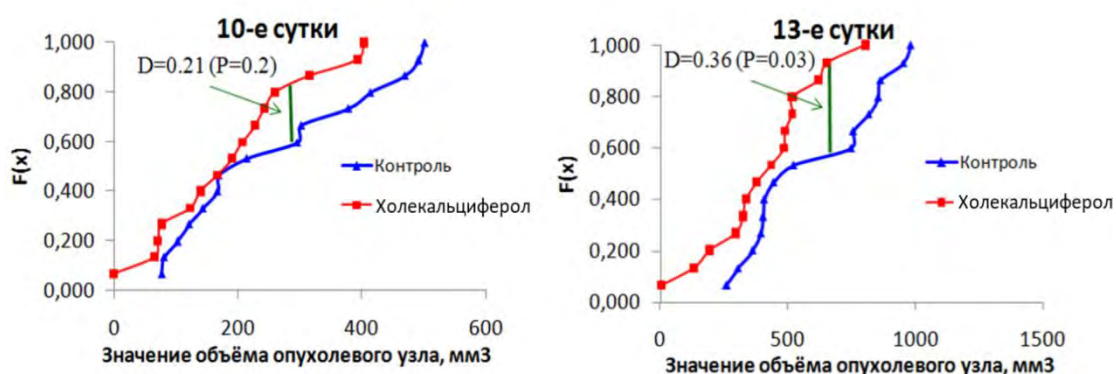


Рисунок 7 – отличия в динамике роста первичной опухоли в экспериментальных группах. $F(x)$ – значения эмпирической функции распределения значений объёма опухолевого узла

Анализ отличий в динамике развития вторичных опухолей показал, что более выраженным было антиметастатическое действие холекальциферола (табл. 6).

Таблица 6 – Среднее число метастазов в легких на 21-е сутки роста карциномы лёгких Льюиса у экспериментальных животных

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

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

Необходимо отметить, что число крупных метастазов в опытной группе не отличалось от данных в группе контроля. В опытной группе отчётливо отмечались признаки торможения метастазирования – статистически значимое уменьшение числа малых метастазов, так что значение ИИМ достигало 35–40 % (рис. 8). Из этого следует, что при пероральном приеме холекальциферола статистически значимо подавлялись процессы метастазирования перевиваемой КЛЛ.

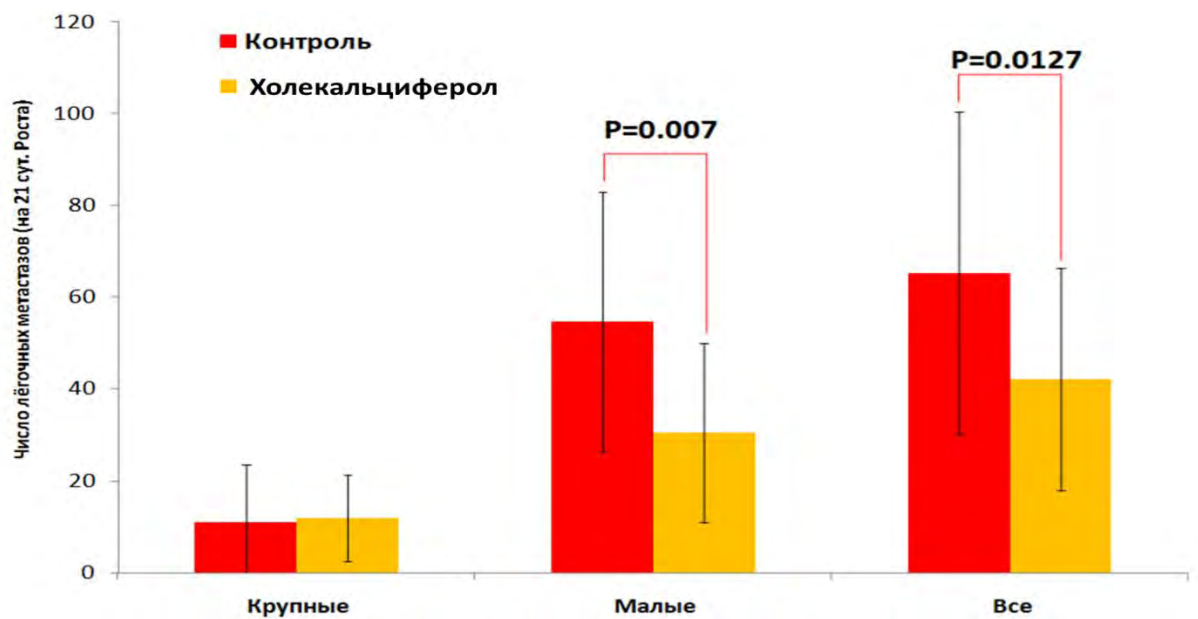


Рисунок 8 – Среднее число метастазов в лёгких на 21-е сутки роста карциномы легких Льюиса у экспериментальных животных по t-тесту

По данным фундаментальных молекулярно-биологических исследований установлено, что VD активирует механизмы противоопухолевой защиты. Подавляющее большинство биологических эффектов VD, включая противоопухолевые эффекты, осуществляются посредством взаимодействий рецепторов типа VDR с геномной ДНК.

К сожалению, к настоящему времени не получены результаты оценок геномного и транскриптомного воздействия холекальциферола или других форм VD на линии клеток, соответствующих КЛЛ (LLC1 и др.).

Резюме к главе 3

Проведенные на этом этапе исследования на модели перевиваемой КЛЛ у мышей отчетливо показали наличие противоопухолевого эффекта холекальциферола: на 13-е сутки отмечено достоверное торможение развития опухоли (возрастание индекса ТРО на 25–30 %, $p = 0,016$), подавление процессов метастазирования (увеличение ИИМ на 35–40 %, $p < 0,05$). Таким образом, полученные данные соответствуют результатам фундаментальных исследований противоопухолевых эффектов VD.

Глава 4. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА У ЖЕНЩИН

Препараты на основе холекальциферола для перорального приёма призваны компенсировать недостаточность и дефицит VD, содержание которого контролируется по уровню 25(OH)D в крови. На сегодняшний день известны более 50 метаболитов VD. Тем не менее только два из них: 25-гидроксивитамин D (25(OH)D) и 1,25-дигидроксивитамин D (1,25(OH)D) – привлекли пристальное внимание ученых. Содержание 25(OH)D в крови наиболее четко ассоциировано с показателями здоровья, в то время как уровень 1,25(OH)D считается «низкоинформативным» маркёром недостатка VD3 и слабо коррелирует с содержанием 25(OH)D [28]. Такую низкую взаимосвязь между уровнями 25(OH)D и 1,25(OH)D можно объяснить тем, что концентрация 1,25(OH)D, являющегося высокоактивным стероидным гормоном, подвергается жёсткой регуляции со стороны физиологических систем организма.

4.1. Фармакокинетика различных форм холекальциферола

Фармакокинетика фармакологических субстанций, заключенных в разные формы (масляный раствор, капсула, «водорастворимая» форма, раствор), имеет ряд отличий, что обусловило необходимость их изучения для выбора наилучшего варианта проведения всех этапов нашего исследования.

Группа относительно здоровых добровольцев ($n = 18$) женского пола 24–53 лет была разделена на три равные подгруппы по 6 человек, которые натошак однократно в дозе 10 000 ME (250 мкг холекальциферола) получили один из трёх препаратов VD: «Аквадетрим» (действующее вещество – холекальциферол, водный раствор, 375 мкг/мл холекальциферола,

№ 014088/01, MEDANA PHARMA, Польша), «Вигантол» (действующее вещество – холекальциферол, масляный раствор 500 мкг/мл, № 011712/01, MERCK KGaA, Германия) и «Ультра-Д» (БАД, ORION PHARMA, действующее вещество – холекальциферол, капсула, содержащая 25 мкг, Финляндия). Для определения уровня метаболитов VD в течение шести часов забиралась кровь из локтевой вены с помощью катетера, который устанавливался каждой относительно здоровой женщине-добровольцу на всё время исследования.

Для построения фармакокинетических кривых уровней 25(OH)D и 1,25(OH)D для точек 0, 10, 30, 60, 180 и 360 минут проведены многокамерный и бескамерный фармакокинетический анализ. Курение и приём пищи в это время были запрещены.

4.2. Определение уровня метаболитов витамина D в организме женщин

Особенности биохимии VD обуславливают сложность его фармакокинетического анализа. Прежде всего VD (холекальциферол) и его биологически активные формы 25(OH)D и 1,25(OH)D являются эндогенными молекулами. Поэтому при определении содержания 25(OH)D и 1,25(OH)D без использования изотопных меток требуется учитывать не только концентрацию введенного препарата, но и эндогенный уровень VD. Поэтому для выделения «сигнала», опосредованного приёмом VD, нужно оценивать статистическую значимость различий концентраций, полученных в определенные моменты времени.

Кроме того, у добровольцев выявлен существенный разброс начальных уровней 25(OH)D (от 10 до 90 нг/мл) и 1,25(OH)D (от 8 до 33 пг/мл), что и объясняет сложность выполнения фармакокинетического анализа. Столь значительная разница начальных концентраций 25(OH)D и 1,25(OH)D обусловлена состоянием здоровья (недостаток VD коморбиден многочисленным хроническим заболеваниям, особенности метаболизма VD и

стероидов в организме обследуемого). Поэтому полученные в настоящем исследовании фармакокинетические кривые (ФК-кривые) были нормализованы и приведены к фиксированным начальным уровням: 20 нг/мл – для 25(OH)D и 20 пг/мл – для 1,25(OH)D. По индивидуальным ФК-кривым отмечено, что при употреблении водной формы холекальциферола «Аквадетрим» наблюдаются более выраженные кривые и самые высокие концентрации 25(OH)D, в то время как при использовании масляного раствора «Вигантол» и капсул «Ультра-Д» таких высоких концентраций 25(OH)D не получено (рис. 9).

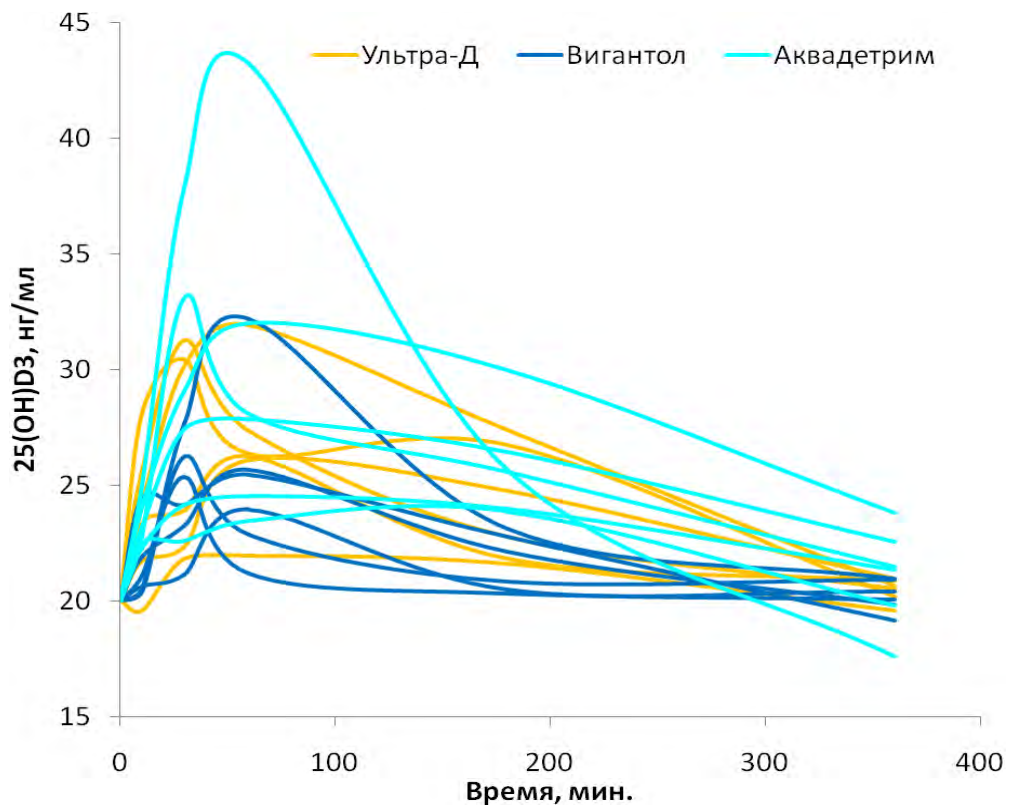


Рисунок 9 – Индивидуальные фармакокинетические кривые добровольцев, полученные после однократного приема холекальциферола в дозе 10 000 ME

Самые высокие концентрации 1,25(OH)D определены в разные временные промежутки при использовании масляного раствора «Вигантола» и капсул «Ультра-Д» (рис. 10).

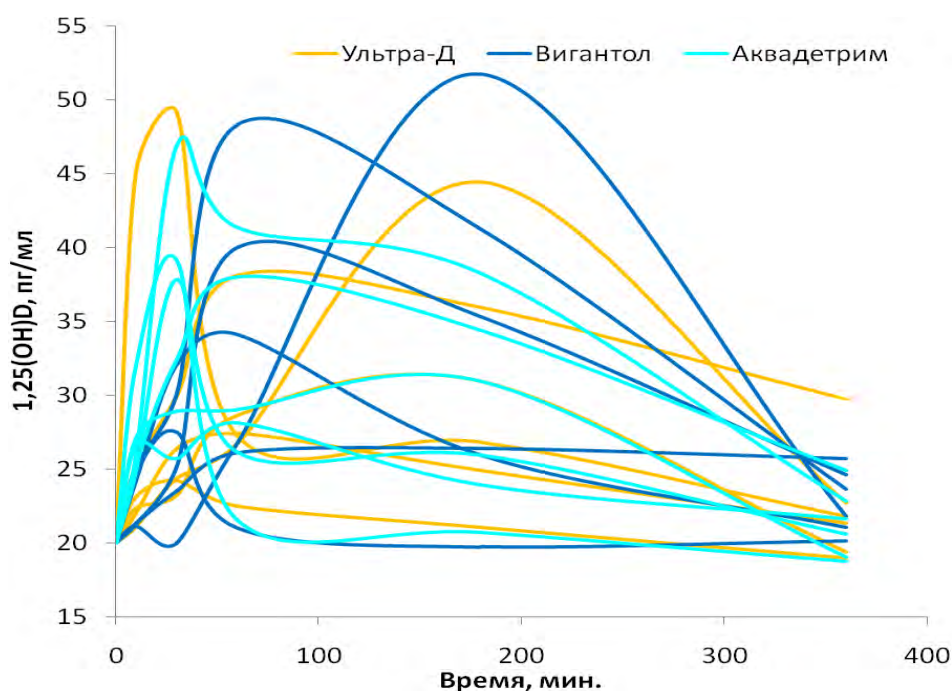


Рисунок 10 – Индивидуальные фармакокинетические кривые добровольцев, полученные после однократного приема холекальциферола в дозе 10 000 МЕ

На основании индивидуальных нормализованных ФК-кривых добровольцев (см. рис. 9 и 10) были получены усреднённые ФК-кривые, необходимые для дальнейшего анализа (рис. 11) и оценки статистической значимости различных концентраций, измеренных в разное время.

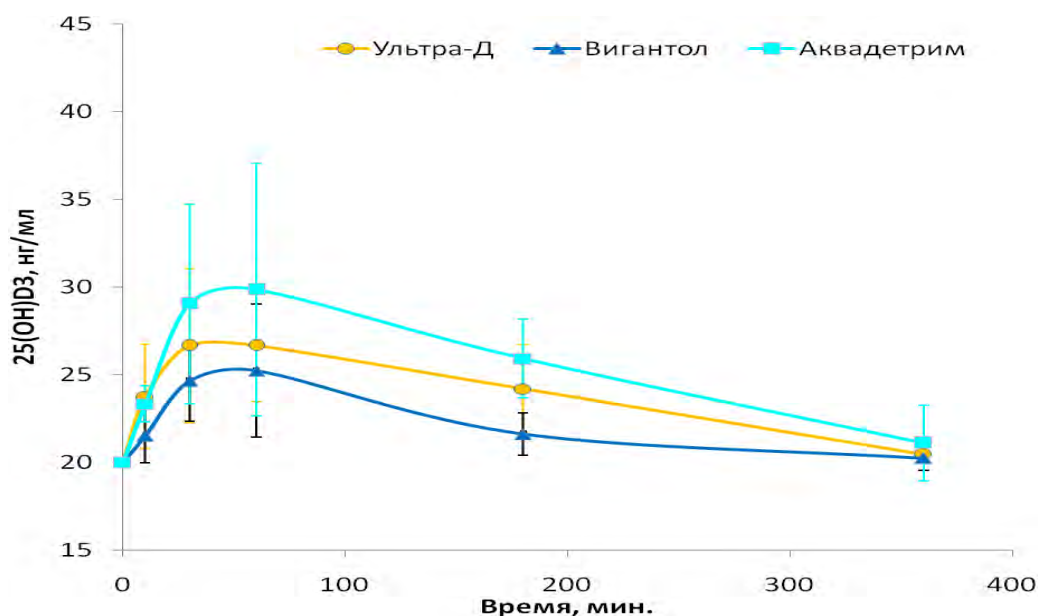


Рисунок 11 – Усреднённые фармакокинетические кривые (для каждой кривой, однократный приём препаратов витамина D в дозе 10 000 МЕ)

В случае усреднённой ФК-кривой содержания 25(OH)D достоверные отличия всех препаратов наблюдались для $t = 10$ мин ($p < 0,03$), $t = 60$ мин ($p < 0,04$) и $t = 360$ мин ($p < 0,05$). Статистически значимых различий такого рода для усреднённых кривых уровней 1,25(OH)D найдено не было.

Таким образом, на усреднённых ФК-кривых достоверно идентифицируются пики концентрации 25(OH)D, ассоциированные с приёмом соответствующих препаратов VD, которые могут использоваться для расчёта фармакокинетических параметров.

4.3. Бескамерный фармакокинетический анализ

Для индивидуальных ФК-кривых добровольцев были рассчитаны параметры бескамерной модели, затем было проведено усреднение показателей для получения значений, соответствующих усреднённым ФК-кривым и их стандартных отклонений (табл. 7).

Таблица 7 – Оценка значений фармакокинетических параметров для бескамерной модели препаратов витамина D3 (однократная доза 10 000 ME)

| Препарат | C_{\max} , нг/мл | t_{\max} , мин | C_{last} , нг/мл | AUC _t , нг/мл*мин | MRT _t , мин | L _z , мин ⁻¹ | T _{1/2} , ч | CL, мл/мин | V _d , л |
|-------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------|---------------|--------------------|
| Ультра Д | 28 ± 4 | 50 ± 15 | 20 ± 1 | 8586 ± 693* | 170 ± 4 | 0,00087 ± 0,0004 | 15,5 ± 7,2 | 7 ± 2 | 9,04 ± 1,24 |
| Вигантол* | 26 ± 3 | 50 ± 15 | 20 ± 1 | 7988 ± 489 | 172 ± 4 | 0,00068 ± 0,0005 | 28,2 ± 23,2 | 6 ± 3 | 9,9 ± 1,4 |
| Аккаде-трим | 31 ± 7 | 75 ± 53 | 21 ± 2 | 9196 ± 856 | 168 ± 10 | 0,0011 ± 0,0009 | 14,7 ± 7,0 | 8 ± 4 | 8,3 ± 1,8 |

Примечание. * – статистически значимое отличие $p = 0,059$.

Полученные с помощью бескамерного анализа ФК-параметры свидетельствуют, что все три препарата имеют схожие показатели фармакокинетики (см. табл. 7). Статистически значимых различий между параметрами, полученными у добровольцев трёх исследованных групп, не установлено, за исключением площади под кривой (AUC_t). Сравнительно высокие показатели периода полувыведения (T_{1/2} – 14,7–28 ч) указывают на

то, что для поддержания действующих концентраций 25(OH)D достаточно принимать VD один раз в день. Достаточно высокий объём распределения (8–9 л при объёме крови в 4–5 л) свидетельствует о формировании своего рода «депо» VD в тканях организма. При этом замечено, что полученные фармакокинетические параметры практически не зависели от возраста добровольцев.

«Ультра-Д», «Вигантол» и «Аквдетрим» имели схожие значения C_{\max} , t_{\max} , C_{last} , MRT_t , L_z , CL , V_d . В то же время AUC_t была достоверно выше для холекальциферола в форме капсул по сравнению с масляным раствором, и самый высокий показатель AUC_t наблюдался для холекальциферола в форме водного раствора (рис. 12).

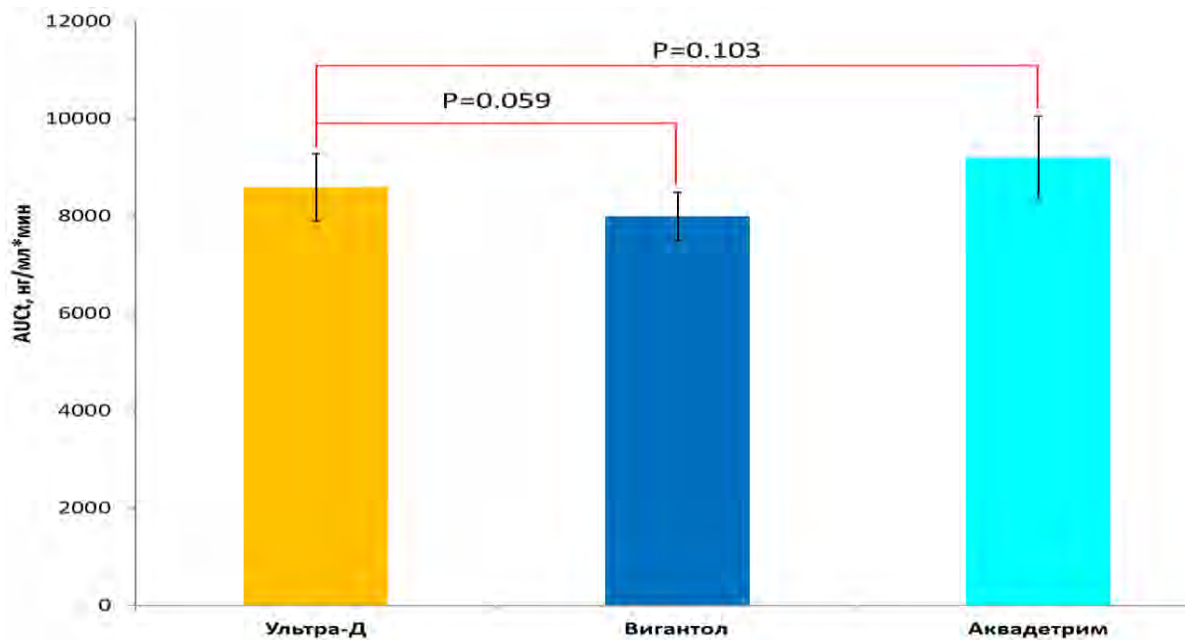


Рисунок 12 – Площадь под кривой (показатель AUC_t) для холекальциферола в форме капсул, масляного и водного раствора ($p < 0,05$)

Ввиду того, что AUC_t косвенно характеризует биодоступность препарата, при рассасывании капсул холекальциферол усваивается быстрее, чем при приёме масляного раствора препарата. Кроме того, всасывание холекальциферола из капсулы начинается уже в ротовой полости, причём компоненты слюны ускоряют солюбилизацию молекул препарата. В результате в желудок поступает частично солюбилизированный холекальциферол.

Установлены статистически значимые корреляции между начальными уровнями 25(OH)D в индивидуальных образцах крови добровольцев и фармакокинетическими параметрами, рассчитанными на основании индивидуальных ФК-кривых добровольцев. Начальные (базовые) уровни 25(OH)D составили 27 ± 20 нг/мл. При этом у 10 из 18 обследованных (78 %) отмечена недостаточность VD (25(OH)D < 30 нг/мл), а у 8 из 18 (44 %) – его дефицит (25(OH)D < 20 нг/мл).

Важно отметить, что в ходе фармакокинетического анализа начальные (базовые) уровни 25(OH)D были нормализованы с учетом типичного для популяции россиянок значения (20 нг/мл). Следовательно, базовые уровни 25(OH)D не использовались при вычислении фармакокинетических параметров, представленных в таблице 7. Тем не менее были установлены статистически значимые корреляции ($p < 0,05$ по тесту Стьюдента) между начальными уровнями 25(OH)D и C_{\max} (коэффициент корреляции – $r = 0,60$), C_{last} ($r = -0,47$), AUC_t ($r = 0,41$), MRT_t ($r = -0,66$), L_z ($r = 0,65$), $T_{1/2}$ ($r = -0,29$), CL ($r = 0,55$) и V_d ($r = -0,48$).

4.4. Многокамерный фармакокинетический анализ

Для многокамерного ФК-анализа применялись усреднённые ФК-кривые для содержания 25(OH)D в крови со статистически значимым пиком концентраций через 50–75 мин после приёма препаратов и относительно пологим участком, указывающим на постепенное выведение VD из крови (см. рис. 12). Для получения наиболее адекватной многокамерной модели были изучены различные конфигурации одно-, двух-, трех- и четырехкамерных моделей. Результаты моделирования показали, что самой простой моделью, максимально точно описывающей исследуемую ФК-кривую (см. рис. 12), является трехкамерная модель (рис. 13), включающая желудочно-кишечный тракт (первый компартмент), кровь (центральный, второй компартмент) и депо (третий компартмент).

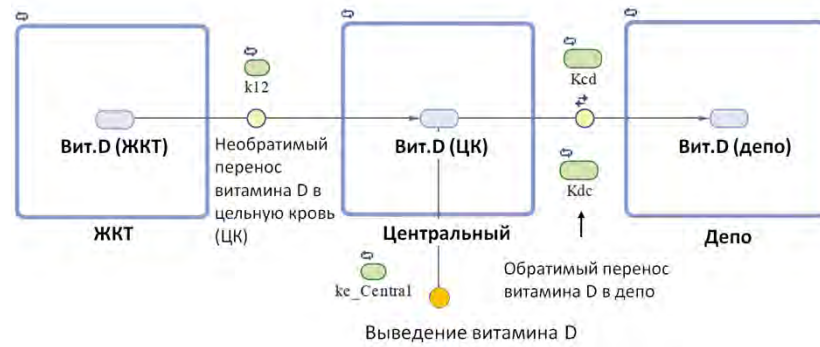


Рисунок 13 – Трёхкамерная модель фармакокинетики исследованных препаратов витамина D, полученная в результате многокамерного фармакокинетического моделирования в среде MATLAB. Приведены условные обозначения соответствующих констант (k_{12} , K_{cd} , K_{dc} , $k_{e_central}$)

Как видим, постепенная элиминация VD осуществляется именно из центрального компартмента, а не из депо.

На изученных многокамерных моделях видно стандартное отклонение концентраций 25(OH)D в крови, а также коэффициент корреляции между теоретической и измеренной ФК (рис. 14).

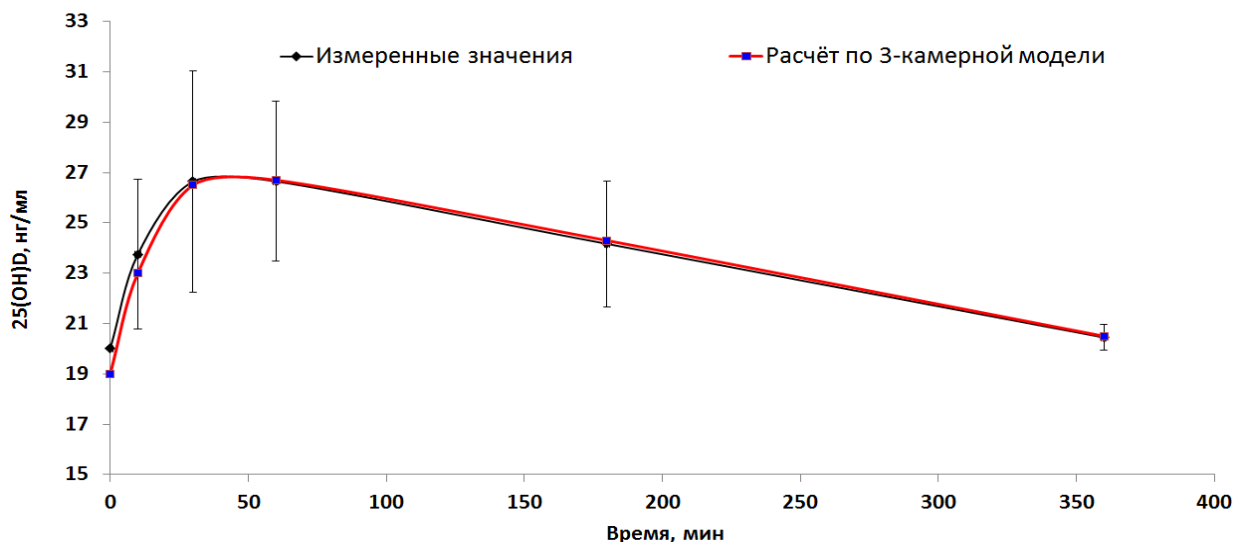


Рисунок 14 – Показатели качества трёхкамерной ФК-модели. Измеренные концентрации для точек ФК-кривой

Для полученной трёхкамерной модели, представленной на рисунке 14, среднеквадратичное отклонение концентраций составило $\sigma = 0,7$ нг/мл (при коэффициенте корреляции, равном $r = 0,99$) (рис. 15), что указывает на весьма высокое качество предлагаемой модели.

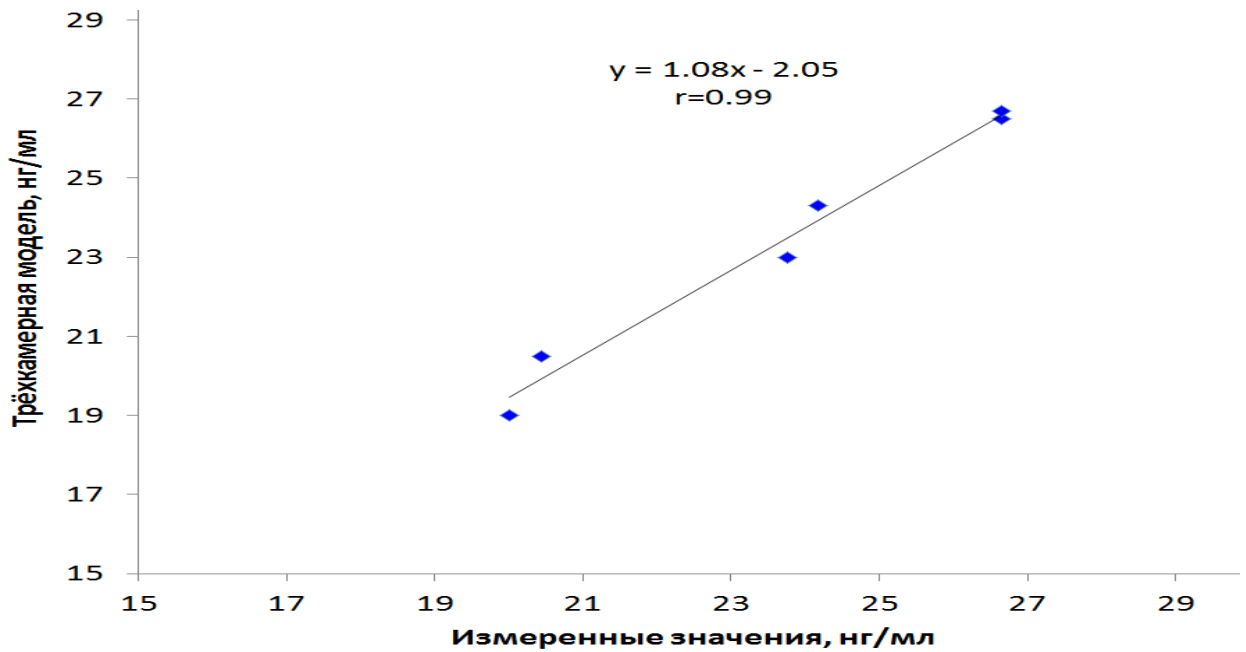


Рисунок 15 – Среднеквадратичное отклонение концентраций 25(OH)D

Полученная модель является оптимальной по качеству и сложности. Простые многокамерные ФК-модели имели гораздо более низкое качество. Так, удаление компартмента «депо» из модели (см. рис. 13) способствовало значительному снижению ее качества (ср. кв. откл. $a = 3$ нг/мл), так же, как и удаление компартмента «ЖКТ» (ср. кв. откл. $a = 5$ нг/мл). Более сложные модели (в частности, моделирование элиминации и из «депо», и из центрального компартмента) не приводили к существенному повышению их качества.

Итак, трёхкамерная модель фармакокинетики, где VD переходит из желудочно-кишечного тракта в центральный компартмент (кровь), затем – в «депо», а выведение происходит только из центрального компартмента (см. рис. 13) в «нулевой» компартмент (мочу), является наиболее адекватной из исследованных многокамерных моделей. Как видим, с помощью ФК-моделирования можно получить количественные оценки соответствующих констант скорости и объёмов компартментов. В частности, скорость оказалась схожа для всех трёх препаратов VD.

В ходе многокамерного ФК-анализа установлены некоторые особенности фармакокинетики препаратов VD. Обращает на себя внимание весьма малый объём компартмента «ЖКТ» ($V(GI) = 1$ усл. ед.), гораздо

больший объём центрального компартмента ($V(C) = 562$ усл. ед.) и ещё больший объём компартмента «депо» ($V(D) = 1283$ усл. ед.). В печени происходит биотрансформация холекальциферола в $25(OH)D$, что вызывает относительно медленное ($k_{12} = 4,66 \text{ мин}^{-1}$) поступление VD (в виде холекальциферола) в кровь из желудочно-кишечного тракта. При этом печень, вероятно, становится также и «депо» VD , причём перенос $25(OH)D$ из крови в «депо» происходит очень быстро ($K_{cd} = 130 \text{ мин}^{-1}$). Печень является «депо», которое отдаёт $25(OH)D$ гораздо медленнее ($K_{dc} = 7,44 \text{ мин}^{-1}$), чем поглощает ($K_{cd} = 130 \text{ мин}^{-1}$), а из центрального компартмента $25(OH)D$ элиминируется ещё медленнее ($k_{e_Central} = 1 \text{ мин}^{-1}$), на что и указывает достаточно пологий характер участка кривой, соответствующий выведению (элиминации) VD (см. рис. 10).

Резюме к главе 4

При сравнительном анализе фармакокинетики препаратов VD в форме масляного раствора (препарат «Вигантол»), водного мицеллированного раствора (препарат «Аквадетрим») и капсул (препарат «Ультра-Д») выявлено, что начальный (базовый) уровень $25(OH)D$ составил 27 ± 20 нг/мл. У 10 из 18 женщин 24–53 лет (78 %), принявших участие в исследовании, отмечена недостаточность ($25(OH)D$ менее 30 нг/мл), а у 8 (44 %) – выраженный дефицит VD ($25(OH)D$ менее 20 нг/мл). Препараты применялись в одно и то же время (в 8:00) натошак однократно внутрь в дозе 10 000 МЕ холекальциферола. Несмотря на то что VD использовался в разных формах, все три препарата имели сравнимые фармакокинетические показатели (C_{max} , $T_{1/2}$, C_{last} , t_{max} , MRT_t , L_z , CL , V_d , AUC_t), полученные в ходе бескамерного анализа, и кинетические константы k_{12} , $k_{e_Central}$, K_{cd} и K_{dc} , установленные в результате многокамерного анализа. Определенные фармакокинетические параметры практически не зависели от возраста добровольцев и имели выраженные корреляции с начальным (базовым)

уровнем 25(OH)D. В крови концентрации 25(OH)D тем выше, чем выше был исходный уровень, и наоборот. Как видим, любой из исследованных препаратов обеспечивал достаточно стабильную концентрацию 25(OH)D при однократном суточном приеме в организме и повышал приверженность к приему VD. Однако для дальнейшего исследования БАД «Ультра-Д» был исключен, так как биологически активные добавки к пище не разрешены для коррекции недостаточности VD у пациентов с коморбидной патологией. Препарат «Вигантол» (масляный раствор) также показал стабильную концентрацию промежуточного метаболита VD 25(OH)D, но усваивался медленнее, чем при приёме водного раствора препарата внутрь. Поэтому для проведения дальнейших этапов исследования нами был выбран холекальциферол в виде лекарственного препарата «Аквадетрим» в форме водного раствора для приема внутрь.

Глава 5. ХЕМОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ РАЗНЫХ ДОЗ ВИТАМИНА D НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ НЕЙРОНОВ NPC И В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ MCF7 ЧЕЛОВЕКА

В работе представлены результаты хемотранскриптомного исследования дозозависимых эффектов кальцитриола на транскрипцию 12 700 аннотированных генов человека в клетках-предшественниках линии MCF7 опухолевых клеток РМЖ. Для этого в течение 24 часов моделировалась стимуляция клеток кальцитриолом в шести различных концентрациях.

Установлены функциональные группы генов и конкретные гены, экспрессия которых дозозависимо и достоверно изменяется под воздействием кальцитриола клеток MCF7. Кроме того, получена комплексная дифференциальная картина возможного воздействия кальцитриола на транскриптом опухолевых и нормальных клеток человека.

5.1. Дозозависимые эффекты витамина D на транскрипцию генов в линии клеток MCF7 и в клетках-предшественниках нейронов NPC

Хемотранскриптомный анализ определил достоверные дозозависимые эффекты VD на транскрипцию 3620 генов в линии клеток MCF7. Статистически значимые дозозависимые изменения транскрипции соответствовали значению $p < 0,05$ (t-тест), модулю коэффициента корреляции более 0,5 и изменению транскрипции на 5 % или более в расчёте на 1 мкмоль VD. Для опухолевых клеток MCF7 экспрессия 1012 генов снижалась (список генов «MCF7-»), а экспрессия 2607 генов повышалась (список «MCF7+»). В случае нейрональных клеток NPC экспрессия 2010 генов снижалась (список «NPC-»), а экспрессия 2454 генов повышалась (список «NPC+»). Таким образом, выявленные различия в числах генов

указывают на дифференцированность воздействия VD на разные типы клеток.

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. В результате были выявлены различия в частоте встречаемости ключевых слов в описаниях генов (данные UNIPROT), функциональных категорий генов/белков по номенклатуре GO, данных о распространенности различных кофакторов, ассоциированных с генами заболеваний и элементами реактома человека.

Анализ с использованием функциональной аннотации генов по международной номенклатуре GO позволил установить дифференцированное действие VD на опухолевые и нейрональные клетки. Были выявлены достоверные различия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры GO. Экспертный анализ позволил рубрицировать эти 97 категорий в 9 функциональных групп генов: «синтез/транспорт белка», «регуляция экспрессии генов», «ремонт ДНК», «энергетический метаболизм», «деление клеток», «воспаление», «внутриклеточная передача сигнала», «деградация белка», «иммуномодуляция» (табл. 8).

Таблица 8 – Категории экспрессии генов, в которых одинаковым образом изменялась экспрессия генов в обеих линиях клеток (опухолевых MCF7, нейрональных NPC) при воздействии витамина D

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|-----------------------------------|---|----|----|----------|
| <i>Синтез/транспорт белка</i> | | | | |
| [GO:0070125] | трансляция белка в митохондриях | 35 | 1 | 1,25E-08 |
| [GO:0006409] | экспорт тРНК из ядра | 19 | 1 | 5,46E-05 |
| [GO:0005761] | митохондриальная рибосома | 13 | 0 | 0,000305 |
| <i>Регуляция экспрессии генов</i> | | | | |
| [GO:0060964] | регулирование подавления генов посредством микроРНК | 28 | 1 | 4,85E-07 |

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|---|---|-----|----|----------|
| <i>Ремонт ДНК</i> | | | | |
| [GO:0036297] | межниточный перекрестный ремонт ДНК | 21 | 1 | 1,9E-05 |
| [GO:0032201] | поддержание теломер через полуконсервативную репликацию | 31 | 2 | 3,99E-07 |
| [GO:0032212] | позитивное регулирование поддержания теломер посредством теломеразы | 14 | 2 | 0,002647 |
| [GO:1900034] | регулирование клеточного ответа на тепло | 35 | 8 | 3,48E-05 |
| <i>Энергетический метаболизм</i> | | | | |
| [GO:0006110] | регуляция гликолитического процесса | 19 | 1 | 5,46E-05 |
| <i>Деление клеток</i> | | | | |
| [GO:0007052] | организация митотического шпинделя | 19 | 1 | 5,46E-05 |
| [GO:0060071] | сигнальный путь Wnt | 40 | 7 | 1,28E-06 |
| [GO:0051301] | деление клеток | 136 | 28 | 7,19E-18 |
| [GO:0090263] | позитивная регуляция канонического сигнального пути Wnt | 40 | 11 | 4,37E-05 |
| [GO:0000278] | клеточный цикл (митоз) | 41 | 12 | 6,07E-05 |
| [GO:0000086] | G2/M митотический переход | 47 | 14 | 2,06E-05 |
| [GO:0071850] | остановка клеточного цикла | 1 | 7 | 0,033717 |
| <i>Воспаление</i> | | | | |
| [GO:0038061] | передача сигналов через NF-kB | 36 | 4 | 3,67E-07 |
| <i>Внутриклеточная передача сигнала</i> | | | | |
| [GO:0070374] | позитивное регулирование каскадов ERK1 и ERK2 | 7 | 31 | 9,16E-05 |
| [GO:0007188] | аденилатциклаза-модулирующий G-белковый сигнальный путь рецепторов | 0 | 7 | 0,008095 |
| <i>Деградация белка</i> | | | | |
| [GO:0000502] | протеасомный комплекс | 32 | 2 | 2,38E-07 |
| [GO:0031398] | позитивная регуляция убиквитирования белков | 14 | 5 | 0,038484 |

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|------------------------|---|----|----|----------|
| <i>Иммуномодуляция</i> | | | | |
| [GO:1901687] | процесс биосинтеза производных глутатиона | 1 | 7 | 0,033717 |
| [GO:0071347] | клеточный ответ на интерлейкин-1 | 2 | 15 | 0,001579 |
| [GO:0071354] | клеточный ответ на интерлейкин-6 | 0 | 5 | 0,025256 |
| [GO:0070498] | сигнальный путь интерлейкина-1 | 0 | 4 | 0,045392 |

Примечание: «n-» – число генов со сниженной экспрессией; «n+» – число генов со повышенной экспрессией при воздействии VD; p – статистическая значимость различий по критерию χ^2 .

Анализ профилей частоты встречаемости генов девяти функциональных групп в зависимости от количественного изменения экспрессии гена на 1 мкмоль VD 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». Одновременно в опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (рис. 16).

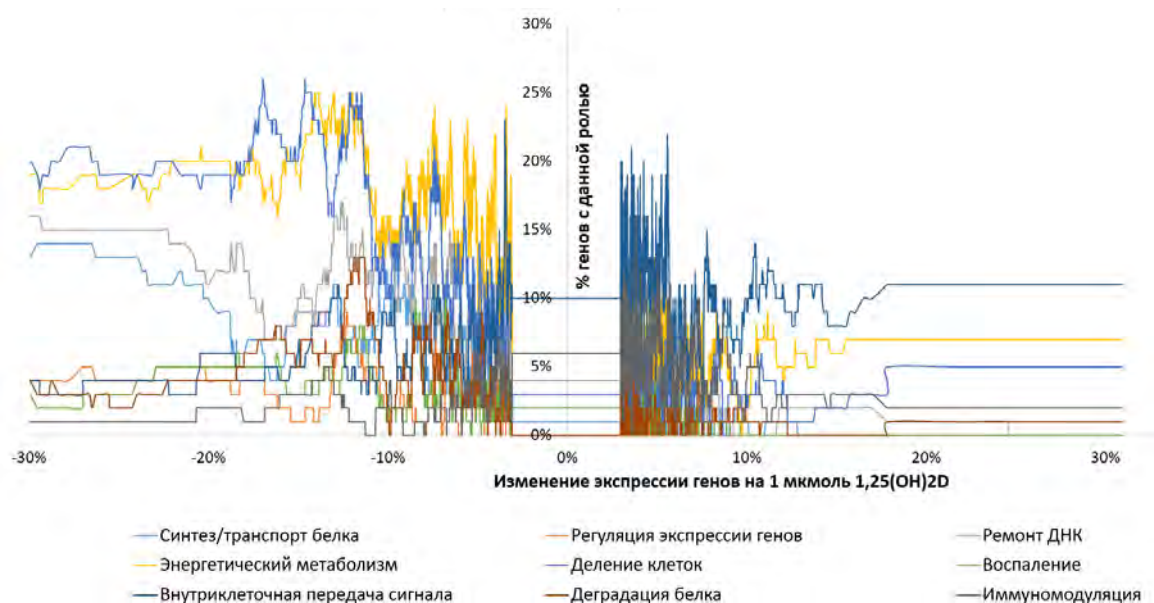


Рисунок 16 – Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для опухолевых клеток MCF7

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. 17).

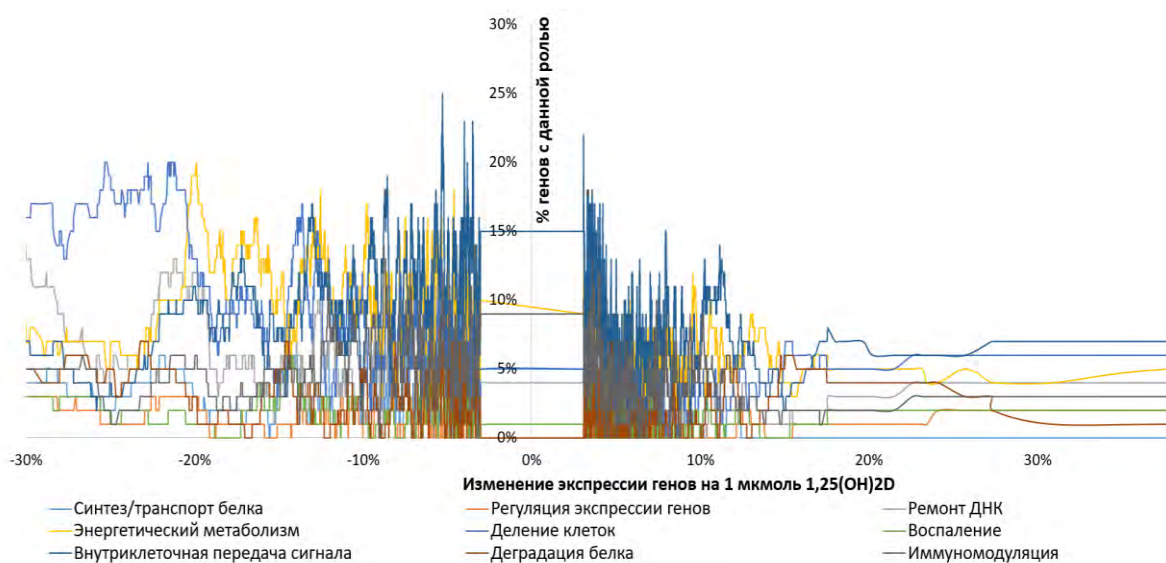


Рисунок 17 – Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для нейрональных клеток NPC

При этом из 97 выявленных функций генов по номенклатуре GO достоверные изменения экспрессии 73 из них наблюдались исключительно в линии опухолевых клеток MCF7, но не в линии нейрональных клеток. Следовательно, 74 категории генов подтверждают дифференцированное противоопухолевое воздействие VD (табл. 9).

Таблица 9 – Категории международной номенклатуры генов GO, в которых экспрессия генов при воздействии витамина D достоверно изменялась только в линии опухолевых MCF7

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|-------------------------------|---|----|----|----------|
| <i>Синтез/транспорт белка</i> | | | | |
| [GO:0006626] | транспорт белков в митохондрию | 19 | 1 | 5,46E-05 |
| [GO:0030150] | импорт белка в митохондриальный матрикс | 10 | 1 | 0,006581 |
| [GO:0000028] | сборка малой рибосомальной субъединицы | 10 | 1 | 0,006581 |
| [GO:0032543] | митохондриальный синтез белка | 10 | 1 | 0,006581 |
| [GO:0006400] | модификация tPHK | 5 | 0 | 0,025256 |

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|-----------------------------------|---|----|----|----------|
| [GO:0046826] | отрицательная регуляция экспорта белка из ядра | 5 | 0 | 0,025256 |
| [GO:0005840] | рибосома | 14 | 3 | 0,007505 |
| [GO:0006413] | инициирование синтеза белка (трансляции) | 35 | 8 | 3,48E-05 |
| [GO:0061077] | фолдинг белков | 13 | 3 | 0,012245 |
| <i>Регуляция экспрессии генов</i> | | | | |
| [GO:0003899] | 5'-3'-РНК-полимеразная активность | 18 | 0 | 2,12E-05 |
| [GO:0000375] | сплайсинг мРНК | 13 | 0 | 0,000305 |
| [GO:0006362] | продолжение транскрипции от промотора РНК-полимеразы I | 13 | 1 | 0,001315 |
| [GO:0006361] | инициация транскрипции от промоторов РНКазы-1 | 13 | 1 | 0,001315 |
| [GO:0048026] | позитивная регуляция сплайсинга мРНК | 10 | 1 | 0,006581 |
| <i>Ремонт ДНК</i> | | | | |
| [GO:0006303] | ремонт двухконцевых обрывов ДНК | 25 | 0 | 5,28E-07 |
| [GO:0006297] | ресинтез ДНК при ремонте ДНК | 23 | 1 | 6,66E-06 |
| [GO:0042276] | синтез ДНК поверх повреждений, подверженный ошибкам | 20 | 0 | 7,35E-06 |
| [GO:0070987] | безошибочный синтез ДНК поверх повреждений | 18 | 0 | 2,12E-05 |
| [GO:0000731] | синтез ДНК при ремонте ДНК | 18 | 1 | 9,25E-05 |
| [GO:0006284] | ремонт ДНК посредством вырезки поврежденных нуклеотидов | 15 | 0 | 0,000104 |
| [GO:0045739] | позитивная регуляция репарации ДНК | 14 | 0 | 0,000178 |
| [GO:0006301] | ремонт ДНК после репликации | 11 | 1 | 0,003839 |
| [GO:0043968] | ацетилирование гистона H2A | 9 | 1 | 0,011309 |
| [GO:0003684] | связывание повреждённой ДНК | 26 | 3 | 1,81E-05 |
| [GO:0031571] | контрольная точка повреждения ДНК G1 | 7 | 1 | 0,033717 |
| [GO:0000076] | контрольная точка репликации ДНК | 5 | 0 | 0,025256 |
| [GO:0043097] | переработка пиримидиновых нуклеозидов | 5 | 0 | 0,025256 |

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|----------------------------------|--|-----|-----|----------|
| [GO:0000002] | поддержание митохондриального генома | 5 | 0 | 0,025256 |
| [GO:0071480] | клеточный ответ на гамма-излучение | 9 | 4 | 0,034559 |
| [GO:0070911] | глобальный ремонт геномной ДНК вырезкой нуклеотидов | 9 | 2 | 0,034559 |
| [GO:0010224] | ответ на УФО | 4 | 0 | 0,045392 |
| [GO:0034644] | клеточный ответ на УФО | 11 | 3 | 0,032206 |
| [GO:0006977] | отклик на повреждение ДНК, передача сигнала посредством p53, приводящая к остановке клеточного цикла | 19 | 6 | 0,009103 |
| [GO:0060548] | отрицательная регуляция апоптоза | 15 | 5 | 0,024982 |
| [GO:0000723] | поддержание теломер | 22 | 10 | 0,033183 |
| <i>Энергетический метаболизм</i> | | | | |
| [GO:0006120] | митохондриальный перенос электронов, от НАДФ к убихинону | 16 | 1 | 0,000267 |
| [GO:0008137] | активность НАДФ-дегидрогеназы | 15 | 1 | 0,000453 |
| [GO:0005747] | митохондриальный комплекс I дыхательной цепи | 15 | 1 | 0,000453 |
| [GO:0001836] | высвобождение цитохрома c из митохондрий | 7 | 0 | 0,008095 |
| [GO:0006119] | окислительное фосфорилирование | 6 | 0 | 0,014233 |
| [GO:0005753] | митохондриальный АТФ-синтазный комплекс | 6 | 0 | 0,014233 |
| [GO:0006094] | глюконеогенез | 16 | 4 | 0,007145 |
| [GO:0051156] | метаболизм глюкозо-6-фосфата | 4 | 0 | 0,045392 |
| [GO:0051539] | кофактор 4/4-железо-серный кластер | 14 | 5 | 0,038484 |
| [GO:0005759] | матрикс митохондрий | 81 | 35 | 1,46E-05 |
| [GO:0005739] | митохондрия | 283 | 133 | 7,88E-15 |
| <i>Деление клеток</i> | | | | |
| [GO:0008543] | сигнальный путь рецептора фактора роста фибробластов | 25 | 5 | 0,000247 |
| [GO:0005657] | репликационная «вилка» | 5 | 0 | 0,025256 |

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|---|--|----|-----|----------|
| [GO:0046655] | метаболизм фолиевой кислоты | 5 | 0 | 0,025256 |
| [GO:0015631] | связывание тубулина | 16 | 4 | 0,007145 |
| [GO:0035999] | интерконверсия тетрагидрофолатов | 4 | 0 | 0,045392 |
| [GO:0070531] | комплекс BRCA1-A (подавление роста опухолей) | 4 | 0 | 0,045392 |
| [GO:0045652] | регуляция дифференциации мегакариоцитов | 4 | 13 | 0,028708 |
| <i>Воспаление</i> | | | | |
| [GO:0033209] | сигнальный путь ФНО-альфа | 35 | 9 | 8,1E-05 |
| [GO:0032481] | позитивная регуляция синтеза интерферона типа I | 14 | 4 | 0,01816 |
| [GO:0035722] | сигнальный путь интерлейкина-12 | 20 | 9 | 0,040355 |
| <i>Внутриклеточная передача сигнала</i> | | | | |
| [GO:0007165] | передача сигнала | 76 | 130 | 0,000112 |
| [GO:0005509] | связывание ионов кальция | 45 | 87 | 0,000201 |
| [GO:0001972] | связывание ретиноидов рецепторами | 0 | 5 | 0,045069 |
| [GO:0007259] | каскад JAK-STAT | 0 | 8 | 0,004637 |
| [GO:0030574] | катаболизм коллагена | 2 | 13 | 0,004434 |
| [GO:0045597] | положительная регуляция клеточной дифференциации | 0 | 7 | 0,008095 |
| <i>Деградация белка</i> | | | | |
| [GO:0019773] | альфа-субъединица протеасомы | 7 | 0 | 0,008095 |
| [GO:0000209] | полиубиквитирование белков | 68 | 20 | 2,29E-07 |
| [GO:0042787] | убиквитирование и катаболизм белков | 30 | 13 | 0,009147 |
| <i>Иммуномодуляция</i> | | | | |
| [GO:0010629] | отрицательная регуляция экспрессии генов | 18 | 34 | 0,025525 |
| [GO:0006955] | иммунный ответ | 12 | 42 | 3,95E-05 |
| [GO:0002250] | адаптивный иммунный ответ | 6 | 31 | 3,64E-05 |
| [GO:0030593] | хемотаксис нейтрофилов | 2 | 13 | 0,004434 |
| [GO:0038111] | сигнальный путь интерлейкина-7 | 1 | 8 | 0,019493 |

| Категория GO | Описание категории GO | n- | n+ | p |
|--------------|---|----|----|----------|
| [GO:0043124] | отрицательная регуляция IκB-киназы/NF-κB | 1 | 9 | 0,011309 |
| [GO:0042347] | отрицательная регуляция импорта NF-κappaB в ядро клетки | 0 | 4 | 0,045392 |

Примечание. «n-» – число генов со сниженной экспрессией; «n+» – число генов со повышенной экспрессией; p – статистическая значимость различий по критерию χ^2 .

На рисунке 18 отображены числа генов «n-» и «n+», соответствующие функциональным категориям генов, перечисленным в таблицах 8 и 9.

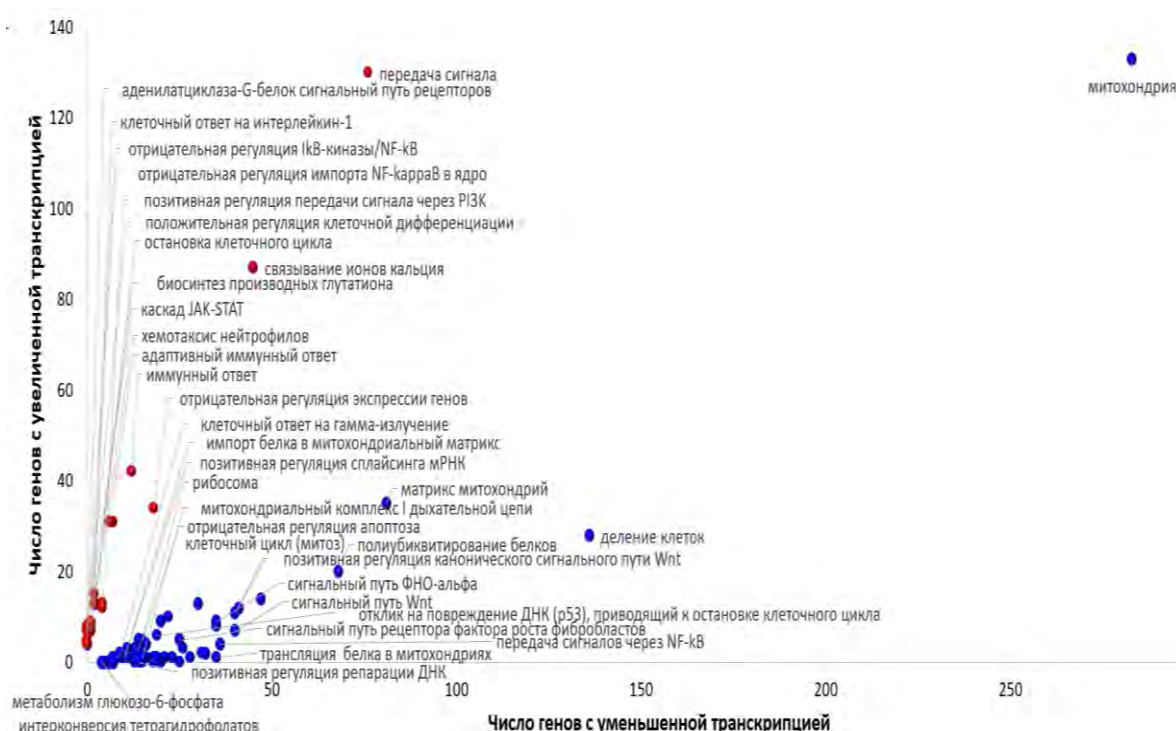


Рисунок 18 – Функциональные аннотации по номенклатуре GO и изменения экспрессии группы генов, вызываемые витамином D при воздействии на опухолевые клетки молочной железы линии MCF7 (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Таким образом, гены, экспрессия которых дозозависимо повышается при воздействии VD, существенно отличаются по своим биологическим функциям от генов, экспрессия которых дозозависимо снижается (на что наглядно указывают диаграммы процентных соотношений функциональных групп генов на рисунке 19).

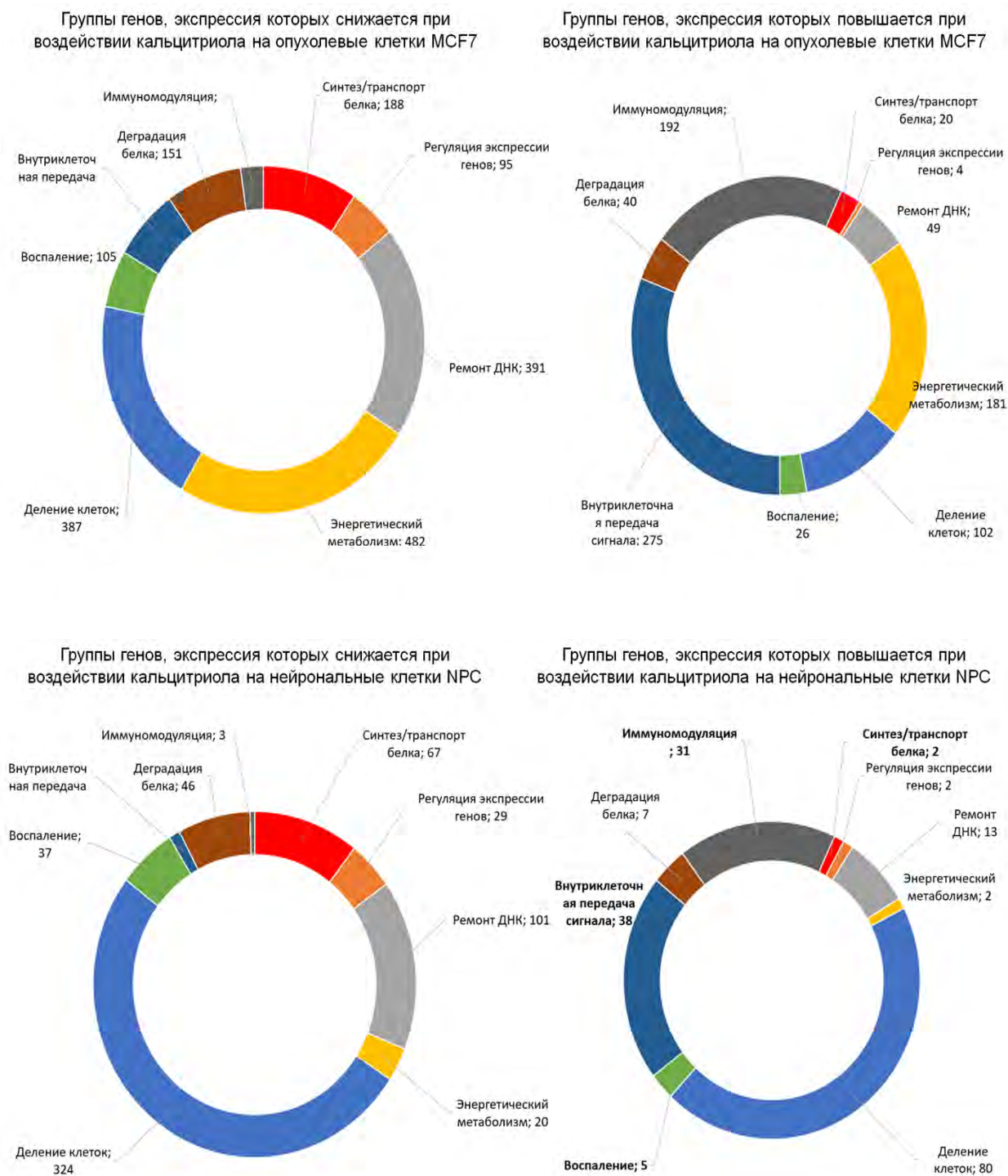


Рисунок 19 – Процентное соотношение встречаемости функциональных групп генов со сниженной и с повышенной экспрессией при воздействии витамина D3 на клетки (по результатам хемотранскриптомного анализа)

5.2. Эффекты витамина D в опухолевых клетках MCF7

Установленные изменения транскрипции имеют важную физиологическую интерпретацию.

Во-первых, хемотранскриптомный анализ воздействия VD на опухолевые клетки MCF7 указывает на систематическое снижение экспрессии генов, вовлечённых в синтез и транспорт белков (188 генов) и в деградацию белков (151 ген). Эти изменения соответствуют ингибированию *гомеостаза белков*: и новые, и старые дисфункциональные белки синтезируются медленнее. Снижение протеасомного распада белков способствует уменьшению хронического воспаления (каскад NF-kB, см. далее) и одновременно увеличению продолжительности активации апоптотических сигнальных каскадов. Снижение синтеза белка (в том числе митохондриального синтеза белка, сплайсинга мРНК, транспорта и фолдинга белков) соответствует уменьшению количества ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков (в том числе противоопухолевых средств) и содержания белков, участвующих в энергетическом метаболизме клетки (синтез АТФ).

Во-вторых, под воздействием VD происходит выраженное ослабление экспрессии генов, вовлечённых в энергетический метаболизм (482 гена, нейрональные клетки – только 20 генов, в том числе генов, кодирующих митохондриальные комплексы дыхательной цепи, ферменты окислительного фосфорилирования, метаболизма глюкозо-6-фосфата, НАДФ-дегидрогеназу) (см. табл. 5.1, 5.2), что соответствует *снижению обеспеченности опухолевых клеток АТФ*. Иначе говоря, VD дифференцированно уменьшает энергообеспеченность именно опухолевых клеток, что способствует снижению интенсивности процессов их пролиферации и сопротивляемости терапевтическому воздействию.

В-третьих, VD способствует снижению транскрипции генов, вовлечённых в пролиферацию опухолевых клеток (387 генов, нейрональные –

324 гена) и в процессы ремонта ДНК (391 ген, нейрональные – 101 ген). Белки, соответствующие этим генам, осуществляют такие фундаментальные процессы, как поддержание целостности теломер, ремонт ДНК, активность сигнального пути рецептора фактора роста фибробластов, метаболизм фолиевой кислоты (см. табл. 8, 9). Подавление активности теломеразы приводит к уменьшению числа возможных делений клетки, а вмешательство в ремонт ДНК является одним из механизмов преодоления резистентности опухолевых клеток к терапии [34]. Снижение репарации ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, усиливая эффекты замедления синтеза АТФ.

В-четвёртых, хемотранскрипционный анализ продемонстрировал подавление транскрипции генов из функциональной группы «хроническое воспаление» (MCF7 – 105 генов, нейрональные клетки – 37 генов). В основном гены этой группы проявляют себя в биологическом действии провоспалительных факторов ФНО-альфа и NF- κ B. Установлено, что эффект провоспалительного транскрипционного фактора NF- κ B действительно угнетается VD [6]. Определено, что VD воздействует путем предотвращения протеасомной деградации регуляторного белка I κ -B и торможения транслокации NF- κ B внутрь клеточного ядра. Таким образом, транскрипционный фактор NF- κ B при взаимодействии с регулятором I κ -B не может перемещаться в клеточное ядро и активировать экспрессию генов, опосредующих провоспалительные эффекты цитокина ФНО-альфа.

В-пятых, эффект VD в опухолевых клетках MCF7 проявлялся в достоверном повышении экспрессии генов, участвующих в иммуномодуляции (192 гена) и во внутриклеточной передаче сигналов от рецепторов (275 генов). Транскрипция этих категорий генов повышалась и в нейрональных клетках, но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция – 31 ген, внутриклеточная передача сигналов – 38 генов), что соответствует дифференцированному противоопухолевому действию VD.

В опухолевых клетках MCF7 отмечено преимущественное повышение экспрессии генов, поддерживающих адаптивный иммунный ответ (31 ген),

хемотаксис нейтрофилов (13 генов) и сигнальный путь интерлейкина-7 (8 генов). Дефицит интерлейкина-7 может быть одной из причин тяжёлого комбинированного иммунодефицита, что обуславливает его особую роль в делении и вызревании клеток лимфоидного ряда [85].

Антиканцерогенный эффект VD выражается в увеличении *внутриклеточной передачи сигнала*. Опухолевые процессы сопровождаются усилением пролиферативных сигнальных каскадов, при этом блокируются каскады, координирующие дифференцировку клеток [133]. Поэтому при проведении противоопухолевой терапии так важна поддержка внутриклеточной передачи сигнала, поддерживающей дифференциацию клеток.

В клетках MCF7 VD стимулирует экспрессию генов, поддерживающих положительную регуляцию клеточной дифференциации (категория [GO:0045597], 7 генов). Так, каскад JAK-STAT (8 генов) активизирует дифференциацию клеток эпителия МЖ [140]. VD снижает жёсткость внеклеточного матрикса вокруг опухолевых клеток, дав толчок экспрессии генов в категории [GO:0030574] «катаболизм коллагена» (13 генов). Известно, что в мезенхимальных клетках происходит механосенситивная передача сигнала, которая стимулирует пролиферацию клеток опухолей МЖ. К этому приводит повышенная механическая жёсткость внеклеточного матрикса [88]. Помимо этого, рецепторы ретиноидов (категория [GO:0001972] «связывание рецепторами ретиноидов») обуславливают ингибирование метаболизма углеводов опухолевых клеток и регуляцию процессов дифференциации. Происходит подавление роста опухолей через сигнальные каскады p53/p21/p16 и PI3K-AKT [169]. Следовательно, VD интенсифицирует противоопухолевые эффекты витамина А.

5.3. Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D

Крайне интересно отметить, что *VD* способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (категория [GO:0071480], 9 генов). Например, при приеме *VD* подавляется экспрессия гена *ATR* (в среднем на 8 % на 1 мкмоль *VD*), кодирующего одноимённый белок *ATR* – серин/треониновую протеинкиназу, которая выступает как датчик повреждения ДНК и активирует внутриклеточную сигнализацию при ионизирующем или ультрафиолетовом излучении. *ATR* фосфорилирует белки *BRCA1*, *CHEK1*, *MCM2*, *RAD17*, *RPA2*, *SMC1*, *p53/TP53*, гистоны *H2AX/H2AFX*, тем самым регулируя механизм ответа на повреждение ДНК [168]. *VD* также снижает экспрессию генов *TMEM109* (трансмембранный белок 109, который вызывает ответ клеток на повреждение ДНК излучением [163], *XRCC5* (белок ремонта ДНК, участвующий в стабилизации поврежденных концов ДНК [158], *GTF2H5* (транскрипционный фактор ПН-5, восстанавливающий повреждения нуклеотидов). Снижение экспрессии генов этой функциональной категории усиливает отклик опухолевых клеток на радиотерапию.

В заключение приведём ещё несколько примеров конкретных генов, экспрессия которых дозозависимо изменялась при хемотранскриптомном моделировании эффектов *VD* на опухолевые клетки *MCF7*. *VD* подавлял экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, *c-src* тирозинкиназа, *c-myc* тирозинкиназа, *c-myc* и др. (табл. 10 и рис. 20).

Повышение экспрессии гена *CTNNBIP1* (11,98 % на 1 мкМ) указывает на увеличение общей внутриклеточной активности отрицательного регулятора сигнального пути *Wnt* – бета-катенин-взаимодействующего белка, многие ингибиторы которого используются в борьбе с опухолями [74].

Таблица 10 – Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D₃ (по результатам хемотранскриптомного анализа)

| Ген | %ИЭ | Белок | Функция белка |
|----------|-------|---|---|
| CSNK1A1 | -46,5 | Казеинкиназа альфа-1 | Передача сигналов в каскаде Wnt |
| CSK | -32,5 | c-src, тирозинкиназа | Подавляет передачу сигналов различными рецепторами |
| MTHFD1 | -29,6 | Метилентетрагидрофолат дегидрогеназа | Синтез биологически активных фолатов |
| ZDHHC7 | -24,3 | Цинковый палец ZDHHC7 | Пальмитоилирует рецепторы эстрогенов |
| HSD17B10 | -23,7 | Гидроксистероид 17-бета дегидрогеназа 10 | Катализирует 17-бета-окисление андрогенов |
| KLF8 | -22,8 | Крупнель-подобный фактор 8 | Способствует прогрессии цикла деления клетки |
| MYCBP | -20,4 | C-мус-связывающий белок | Активирует транскрипционную активность MYC-киназы |
| PLCB3 | 11,5 | Фосфолипаза C-бета-3 фосфатидилинозитол-специфическая | Синтез сигнальных молекул диацилглицерина (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ3) |
| CTNNBIP1 | 12,0 | Бета-катенин-взаимодействующий белок 1 | Отрицательный регулятор сигнального пути Wnt |
| RASSF4 | 12,5 | Ras-ассоциированный 4 | Супрессор роста опухолей |
| DDIT4 | 14,5 | Транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК | Ингибирует белок mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB |
| IRF5 | 15,6 | Интерферон-регуляторный фактор 5 | Участвует в активации транскрипции интерферонов А и В |

Примечание. %ИЭ – процент изменения экспрессии на 1 мкмоль VD₃.

Следует отметить, что многие из перечисленных в таблице 103 и на рисунке 20 изменений транскрипции генов под воздействием витамина D подтверждают эффекты уже имеющихся перспективных противоопухолевых препаратов.

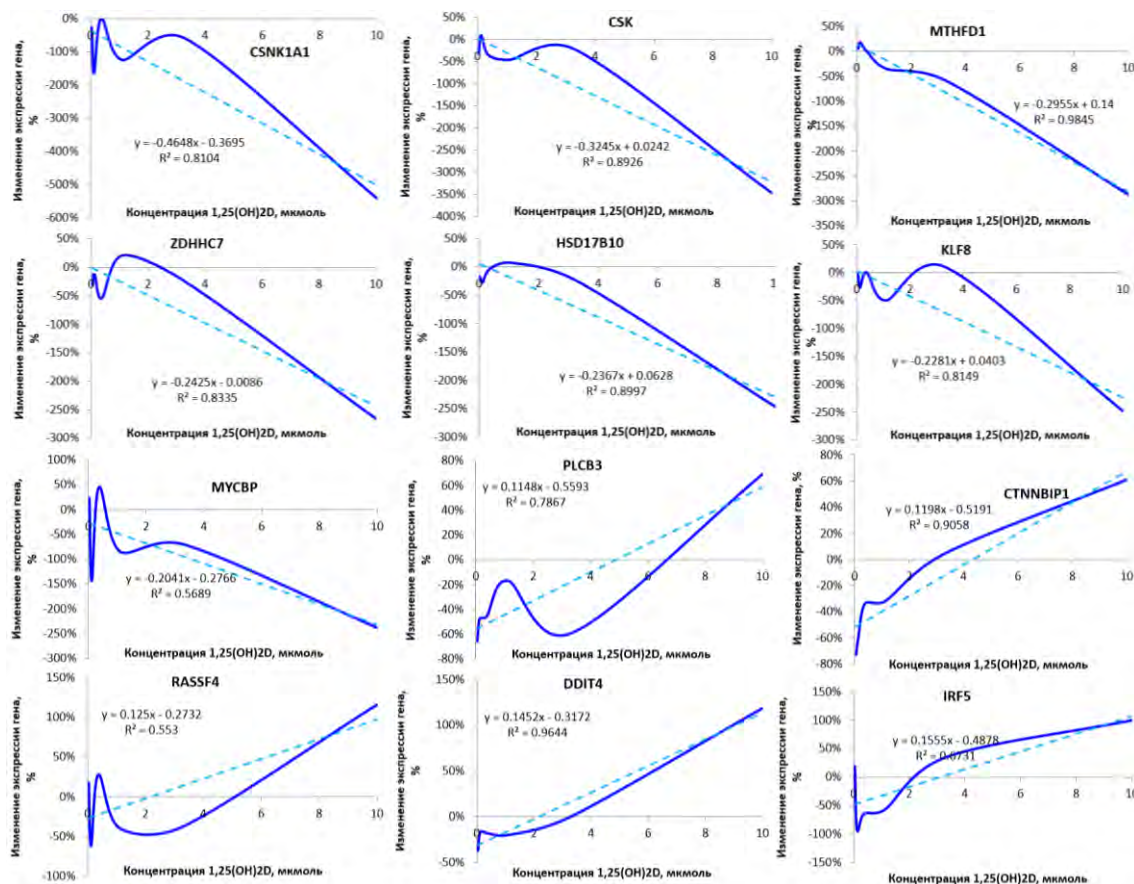


Рисунок 20 – Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D (по результатам хемотранскриптомного анализа). Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Так, ослабление транскрипции гена CSNK1A1 (казеинкиназа-1, альфа-1) приводит к снижению количества молекул этого фермента в клетке. Казеинкиназа участвует в передаче сигналов Wnt-сигнального пути, который координирует с помощью фосфорилирования белков дифференцировку клеток и развитие ЗНО, а ее ингибиторы являются перспективными противоопухолевыми препаратами [100].

Подавление транскрипции генов CSK (-32,45 % на 1 мкМ), MYCBP (-20,41 % на 1 мкМ) и MTHFD1 (-29,55 % на 1 мкМ) также соответствует

эффекту противоопухолевых средств. Ген CSK кодирует c-src тирозинкиназу, вовлеченную в регуляцию роста дифференцировки, миграции клеток и иммунного ответа (фосфорилирует киназы LCK, SRC, HCK, FYN, LYN и подавляет передачу сигналов разными рецепторами) [136]. Ген MYCBP, кодирующий c-мус-связывающий белок, необходим для повышения транскрипционной активности MYC-киназы. Ингибиторы MYC-киназы – перспективные противоопухолевые средства. Ген MTHFD1 кодирует метилентетрагидрофолат дегидрогеназу, участвующую в эндогенном синтезе биологически активных фолатов. Как известно, антифолиевые препараты (метотрексат, триметоприм, азатиоприн, азидотимидин) также обладают противоопухолевым эффектом.

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, тем самым усиливая воздействие этих стероидов на клетку [119]. 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 [18996107]. Для такой эстроген-зависимой опухолевой линии клеток, как MCF7, особенно значимо противодействие VD эффектам стероидных гормонов.

VD также способствует *повышению транскрипции генов, кодирующих белки с известным противоопухолевым действием*: белок «Ras-ассоциированный домен 4» (RASSF4) (12,50 % на 1 мкМ) – супрессор роста опухолей, который приводит к остановке цикла деления клетки и апоптозу [59], «транскрипт-4, индуцируемый повреждением ДНК» (DDIT4) (14,52 % на 1 мкМ) подавляет mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB и активирует апоптоз в ответ на повреждение ДНК [68], белок SLURP1 (18 % на 1 мкМ) обладает противоопухолевым действием [130].

Итак, в результате хемотранскриптомного анализа установлено, что под воздействием VD происходят характерные изменения транскрипции генов, способствующие снижению интенсивности метаболизма белков и ДНК, пролиферации клеток и хронического воспаления. Следовательно, VD обладает противоопухолевым эффектом. При этом было показано дифференцированное действие VD именно на опухолевые клетки (MCF7), на нейроны, напротив, – разноплановое цитопротекторное действие.

Резюме к главе 5

Изучение дифференцированного действия VD на опухолевые клетки имеет особое значение, поскольку предполагает длительное использование его препаратов. В действительности, резистентность опухолевых клеток к различным противоопухолевым препаратам формируется в основном на уровне протеома (секвестрация и выведение лекарств, повышение активности ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков, и репарации ДНК, подавление апоптотических сигнальных каскадов, пребывание клетки вне фазы клеточного цикла, взаимодействие с ростовыми факторами и цитокинами) [34]. Таким образом, если препарат не только «тактически» подавляет тот или иной белок протеома, но и «стратегически» снижает экспрессию генов, важных для выживания и пролиферации опухолевых клеток (что и наблюдается в случае кальцитриола), то не растет их сопротивляемость воздействию того или иного препарата.

Транскриптомные исследования предоставляют возможность выявлять скрытые механизмы действия препаратов и более детально обозначать спектр патологий, при которых исследуемая молекула может оказать благоприятное воздействие. Как правило, для подавляющего большинства имеющихся на рынке лекарств данные о действии на транскриптом уровне, а следовательно, и о пролонгированных последствиях применения препаратов, отсутствуют. Особенно важно изучение долговременных транскриптомных эффектов противоопухолевых лекарственных средств [143].

В данной главе представлены результаты дифференциального хемотранскриптомного анализа воздействия VD на клетки опухоли МЖ (линии MCF7) в условиях их инкубации с кальцитриолом в течение 24 часов. Достоверные дозозависимые эффекты влияния VD на транскрипцию генов (что соответствует изменению транскрипции на 5 %, или более на 1 мкмоль VD) показаны для 3620 генов в линии клеток MCF7 и для 4465 генов в линии клеток NPC. При этом оценки изменений экспрессии 2831 генов были приблизительно одинаковы в обеих линиях клеток. Анализ с использованием функциональной аннотации генов по международной номенклатуре GO позволил установить дифференцированное действие VD на опухолевые и на нейрональные клетки. Были выявлены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры GO. В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов). Транскрипция генов этих категорий повышалась и в нейрональных клетках, но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция – 31 ген, внутриклеточная передача сигналов – 38 генов). В опухолевых клетках существенно снижалась экспрессия генов, вовлечённых в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в стабилизацию хронического воспаления (факторы ФНО/NF- κ B, 105 генов). Вовлечение в ремонт ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, подавляет энергетический метаболизм, снижает способность опухолевых клеток к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что VD способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (9 генов), и усилению противоопухолевых эффектов витамина А (5 генов). Поэтому изучение транскриптомных эффектов препаратов представляет собой «передовой фронт» современной молекулярной фармакологии.

Глава 6. ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D НА ПРОГРЕССИРОВАНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Гиповитаминоз D (снижение концентрации метаболита 25(OH)D – менее 20 нг/мл) и авитаминоз D (снижение концентрации метаболита 25(OH)D – менее 10 нг/мл) ассоциированы с повышенным риском развития опухолевых и аутоиммунных заболеваний, РМЖ [95], рака простаты, толстого кишечника [75], сахарного диабета, сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологии [131].

Ранее было установлено воздействие VD на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз опухолевых клеток посредством влияния на синтез генов, регулирующих рост, деление и гибель клеток [64]. Поэтому одной из задач настоящего исследования является проведение корреляционного анализа между содержанием метаболита VD 25(OH)D с показателями активности ПОЛ и прогрессированием РМЖ.

Консенсус экспертов Международного эндокринологического общества установил, что уровень 25(OH)D в сыворотке крови не более 20 нг/мл (50 нмоль/л) указывает на недостаток VD. По мнению многих экспертов, значения от 20 до 30 нг/мл (50–75 нмоль/л) следует рассматривать как дефицит VD, а уровень 25(OH)D более 30 нг/мл (75 нмоль/л) – как оптимальный [81]. В настоящее время в ряде исследований показано, что более высокое содержание 25(OH)D оказывает существенное влияние на состояние здоровья и качество жизни человека. Так, в рекомендациях «The Vitamin D Society», разработанных сообществом экспертов (Канада), уровень 25(OH)D в сыворотке крови 40–60 нг/мл (100–150 нмоль/л) можно принимать за оптимальный. При такой концентрации 25(OH)D значительно снижается риск развития сахарного диабета 2-го типа, опухолевых заболеваний, увеличивается продолжительность и качество жизни. Для коррекции и

лечения гиповитаминоза VD наиболее часто используются препараты с действующим веществом холекальциферол (VD) [81].

6.1. Результаты ретроспективного исследования пациенток со злокачественной опухолью молочной железы

Выполнено ретроспективное контролируемое исследование, в основу которого положен анализ наблюдений за пациентками со ЗНО МЖ, получившими лечение в ОБУЗ ИвООД с 2018 по 2020 гг. В исследование включены 220 пациенток в возрасте от 29 до 59 лет с гистологически верифицированным РМЖ ($n = 160$) и относительно (условно) здоровых женщин ($n = 60$) с наличием дефицита или недостаточности VD.

Все обследуемые были разделены на две группы. Контрольная группа включала в себя 60 относительно здоровых женщин. В основную группу ($n = 160$) вошли пациентки с ЗНО МЖ, которым было проведено комплексное лечение, включающее радикальную мастэктомию по Маддену, послеоперационную лучевую терапию в суммарной очаговой дозе 50–55 Грей, нео/адьювантную полихимиотерапию по стандартной схеме первой линии: 4 курса АС (доксорубин 60 мг/м²; циклофосфамид 600 мг/м²), 4 цикла доцетаксела 75 мг/м², терапию трастузумабом 6 мг/кг общей длительности 12 месяцев при Her2/neu-положительном подтипе РМЖ.

Женщины этой группы разделены на две подгруппы: подгруппа 1 ($n = 80$) принимала препарат VD («Аквадетрим», действующее вещество: холекальциферол, водный раствор) в суточной дозе 4000 МЕ/сут и 10 000 МЕ/сут в течение шести месяцев. Все пациентки подгруппы 1 разделены еще на две подгруппы: 1А – лица с РМЖ ($n = 40$), принимающие препарат VD в суточной дозе 4000 МЕ; 1В – пациентки с РМЖ ($n = 40$), принимающие препарат VD в суточной дозе 10 000 МЕ. В подгруппу 2 вошли женщины с РМЖ ($n = 80$), которые получали такое же комплексное лечение, но не принимали препарат VD.

Всем пациенткам со ЗНО МЖ проводились исследования: рентгеновская маммография (РМ) в двух проекциях, ультразвуковое исследование молочных желез и регионарных лимфатических узлов, core-биопсия (трепанобиопсия) опухоли МЖ, иммуногистохимическое исследование с определением рецепторного статуса, наличия онкогена Her2/neu (рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа; (англ. human epidermal growth factor receptor 2) и Ki67 (количественная оценка уровня пролиферации клеток, то есть число антигенпозитивных клеток от общего числа клеток, выраженное в процентах).

Биохимическое определение уровней 25(ОН)D по стандартным методикам [15] посредством хемилюминесцентного иммуноферментного анализа проводилось у всех пациенток трижды: в исходном состоянии (до лечения) (визит 1, V1), через шесть месяцев (после первого визита) (визит 2, V2), через 12 месяцев после V1 (визит 3, V3). Процессы свободнорадикальной дегградации мембран клеток крови исследовались по интенсивности ПОЛ в плазме крови, а также определялось количество циркулирующих в крови клеток эндотелия.

Самой молодой пациентке было 29 лет ($n = 1$; 3,75 %), большая же часть больных ($n = 154$; 96,25 %) были в возрасте 46–48 лет. Стадия I РМЖ определена у 52 (32,5 %), IIa – у 50 (31,25 %), IIb – у 19 (11,875 %), IIIa – у 14 (8,75 %), IIIb – у 14 (8,75 %), IIIc – у 11 (6,875 %). Пациенток со стадией IV в исследовании не было. Лечение носило комплексный характер и включало нео/адьювантную полихимиотерапию, радикальную мастэктомию, послеоперационную лучевую терапию, таргетную и гормонотерапию.

6.2. Гистологические и клиническо-биохимические характеристики обследованных женщин со злокачественной опухолью молочной железы

По гистологическому строению преобладал инфильтрирующий протоковый рак – 48,75 %, дольковый рак встретился в 28,75 % случаев, в

22,5 % – «редкие» гистологические РМЖ. Преобладали следующие молекулярные подтипы опухолей: Lum A – у 13 пациенток (8,125 %); Lum B (Her2/neu положительный) – у 32 (20 %); Lum B (Her2/neu отрицательный) – у 53 (33,125 %); Her2/neu – у 20 (12,5 %), Trip.neg тип (трижды негативный РМЖ) – у 42 (26,25 %).

В исследованной выборке пациенток с РМЖ ($n = 160$) прогрессия заболевания была установлена у 8. Женщины с прогрессированием заболевания существенно различались по 10 клиническим и биохимическим показателям (табл. 11).

Таблица 11 – Показатели, отличающие пациенток с прогрессированием рака молочной железы от больных со стабильным течением

| Признак | Прогрессия | Стабильные | p |
|--|-------------------|-------------------|--------|
| 25(OH)D3, нг/мл, V3, $M \pm \sigma$ | $17,10 \pm 1,55$ | $43,10 \pm 23,48$ | 0,0011 |
| Биolumинисценция Tg мВ/сек, V2, $M \pm \sigma$ | $-28,25 \pm 1,77$ | $-41,32 \pm 9,84$ | 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 |
| Биolumинисценция S мВ/с, V2, $M \pm \sigma$ | 797 ± 37 | 934 ± 146 | 0,0245 |
| Биolumинисценция I_{\max} мВ, V2, $M \pm \sigma$ | $4,15 \pm 0,71$ | $6,66 \pm 1,17$ | 0,0255 |
| Биolumинисценция I_{\max} мВ, V1, $M \pm \sigma$ | 734 ± 72 | 902 ± 132 | 0,0498 |
| Длительность менструации, сут, $M \pm \sigma$ | $7,00 \pm 1,00$ | $5,43 \pm 1,38$ | 0,0516 |
| 25(OH)D3, нг/мл, V2, $M \pm \sigma$ | $27,06 \pm 6,67$ | $41,42 \pm 23,87$ | 0,0532 |
| Биolumинисценция Tg мВ/с, V1, $M \pm \sigma$ | $-25,50 \pm 4,95$ | $-34,32 \pm 8,99$ | 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, то есть по возрастанию статистической значимости различий между группами.

Концентрация 25(OH)D в сыворотке крови снижалась к третьему визиту (V3), что явилось наиболее сильным предиктором прогрессирования опухоли: содержание 25(OH)D менее 18,9 нг/мл выявлена у 100 % пациенток с прогрессией РМЖ и только у 16 % – без прогрессии. Следует отметить, что уровень 25(OH)D перед началом прогрессирования заболевания снижался вне зависимости от приема препаратов VD, результатов гистологического исследования опухоли и молекулярных подтипов РМЖ.

6.3. Оценка влияния дефицита витамина D на риск прогрессирования рака молочной железы

Выполнен ROC-анализ, по результатам которого 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; площадь под кривой (AUC) – 0,914 (рис. 21).

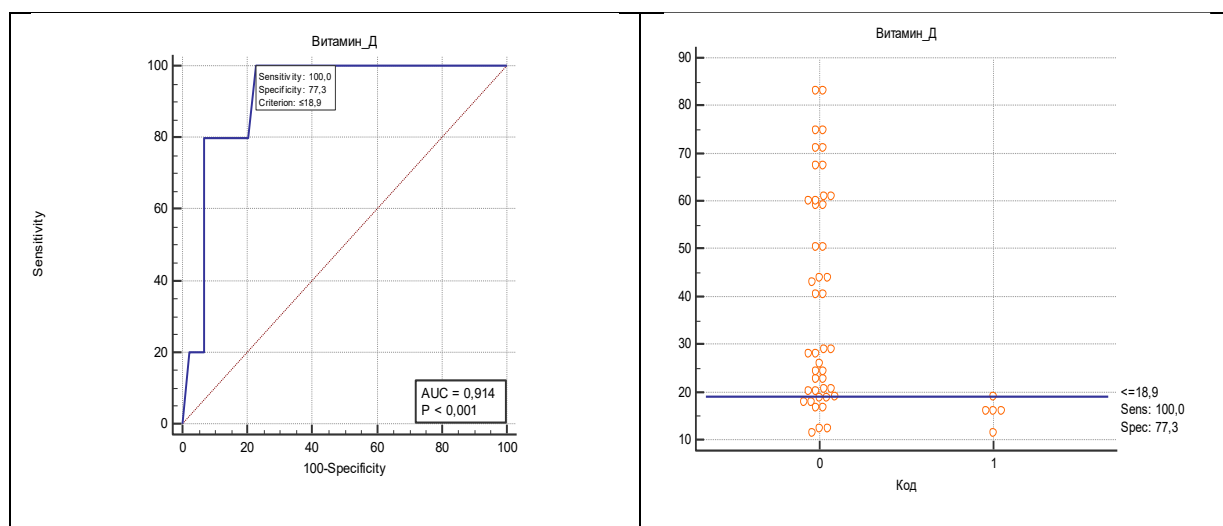


Рисунок 21 – Концентрация промежуточного метаболита витамина 25(OH)D в крови больных РМЖ на третьем визите (V3).

Вторым, наиболее информативным, предиктором явился показатель биолуминесценции – Tg (на второй визит, V2), который отражает антиоксидантный статус пациенток. Показатель Tg V2 выше –30 ед.

определялся у всех пациенток с прогрессией РМЖ (100 %) и ни у одной больной без прогрессии заболевания (0 %).

Наиболее информативные показатели – концентрация 25(OH)D V3 и Tg V2 являются биохимическими параметрами, измерение которых инвазивно, так как требует отбора проб крови. Многие из менее информативных показателей (см. табл. 11) получены при физикальном обследовании пациенток и при анализе анамнеза жизни (неинвазивно).

Пациентки с прогрессированием опухоли отличались так называемым «гиперэстрогеновым фенотипом», включающим наличие предменструального синдрома (ПМС), чистую кожу при отсутствии акне, обильных и длительных менструаций, а также локализацией опухоли слева (см. табл. 11). Гиперэстрогеновый профиль у них усугублялся при регулярном потреблении пива и алкоголя, эстрогены являлись активаторами пролиферативных процессов, особенно в эстрогензависимых тканях, в том числе в МЖ и яичниках.

У пациенток с прогрессированием опухоли был серый или голубой, но не карий цвет глаз. Известно, что цвет радужной оболочки глаз ассоциирован с наличием определенных нуклеотидных вариантов генов, кодирующих цитохромы P450 [97, 143], поэтому ассоциация между цветом глаз и риском прогрессирования опухолевых заболеваний имеет генетическую природу, в частности, у обследуемых с глазами голубого цвета наличие варианта цитохрома CYP2D6-EM соответствует повышенному риску развития ЗНО.

Сочетания перечисленных физикальных и анамнестических признаков являются более важными и информативными предикторами, чем наличие каждого из признаков по отдельности. Так, совокупность восьми информативных физикальных и анамнестических признаков (отсутствие акне, высокий уровень стресса, ПМС, длительные – 6 и более дней, болезненные и обильные менструации, локализация опухоли слева, голубой или серый цвет глаз) встречалась у всех пациенток с прогрессией (100 %) и только у 13 из 152 больных без прогрессии (8,55 %). Следовательно, наличие

у больной сочетания этих восьми признаков соответствует крайне высокому риску прогрессирования опухоли (ОР 97,33; 95% ДИ 8,18–1158,71; $p = 4,56 \times 10^{-9}$ по тесту χ^2).

Как видим, у пациенток с высоким риском прогрессирования РМЖ, оцененным по физикальным и анамнестическим данным, измерение уровня 25(ОН)D на третий визит и Tg на второй визит позволяет зарегистрировать раннее начало прогрессирования заболевания.

6.4. Алгоритм скринингового обследования пациенток с раком молочной железы

Итак, по результатам настоящего исследования предложен двухшаговый алгоритм скринингового обследования пациенток с РМЖ. На первом этапе, который проводится при первичном посещении врача-онколога или маммолога (первый визит, V1), устанавливается принадлежность женщины к группе с повышенным риском прогрессирования РМЖ (при наличии всех восьми информативных физикальных и анамнестических признаков). Если больная отнесена к группе с повышенным риском прогрессирования опухоли, то на втором этапе каждые шесть месяцев у нее измеряется концентрация 25(ОН)D и Tg (по данным анализа крови). Негативная динамика этих показателей – 25(ОН)D не более 18,9 нг/мл при третьем визите и Tg свыше –30 ед. – при втором, свидетельствует о начале прогрессирования опухоли. При этом снижение показателей происходит даже на фоне приема препаратов VD в дозе 4000–10 000 ME/сут.

Резюме к главе 6

В данной главе на основании полученных результатов были разработаны критерии, позволяющие прогнозировать прогрессирование РМЖ: сниженное содержание 25(ОН)D, отсутствие акне, высокий уровень

стресса, наличие ПМС, длительные (6 и более дней) и обильные менструации, локализация опухоли слева, голубой или серый цвет глаз. Установлено, что при содержании промежуточного метаболита VD – 25(OH)D не более 18,9 нг/мл диагностируется прогрессирование заболевания.

Таким образом, нами показано, что снижение уровня промежуточного метаболита VD – 25(OH)D в сыворотке крови является прогностическим признаком прогрессирования РМЖ независимо от молекулярного подтипа опухоли и потребления VD. Следовательно, для выявления вторичных изменений у пациенток с РМЖ и для улучшения наблюдения за ними *рекомендуется использовать дополнительные методы диагностики и определять уровень промежуточного метаболита VD – 25(OH)D в периферической крови.*

Глава 7. ВЫБОР ЛЕЧЕБНОЙ ДОЗЫ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА ДЛЯ ПАЦИЕНТОК С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ИЛИ ДЕФИЦИТОМ ВИТАМИНА D, ПЕРЕНЕСШИХ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В настоящее время отсутствует единый подход к назначению дозы холекальциферола пациенткам с дефицитом и недостаточностью 25(ОН)D (E55) и с диагнозом РМЖ (C50.0 по МКБ-10). Поэтому одной из задач данного исследования было определение оптимальной дозы холекальциферола у женщин с РМЖ. Для решения этой задачи были изучены эффекты холекальциферола в физиологической дозе 4000 ME (рекомендованной для восполнения дефицита VD в крови и 10 000 ME) с оценкой ПОЛ, определением количества эндотелиальных клеток с дальнейшим проведением корреляционного анализа динамики концентраций 25(ОН)D при приеме разных доз холекальциферола. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов, Минздрава России «Дефицит витамина D у взрослых» (приняты в 2016 г., пересмотрены и дополнены в 2021 г.) рекомендуют диапазон использования и различные схемы назначения холекальциферола (в более высоких дозах – 6000–10 000 ME/сут (при дефиците VD) и еще более высоких (7000 ME/сут, 50 000 ME/нед. в течение восьми недель, 150 000 ME/мес. – трех месяцев, 200 000 ME/мес. – двух месяцев).

В данной главе мы обобщили результаты использования различных доз холекальциферола (водный раствор, содержащий в 1 мл 375 мкг холекальциферола, 1 капля – 500 ME, N014088/01, Medana Pharma, Польша) у женщин с сочетанием двух диагнозов. Недостаточность VD (E55 по МКБ-10) (1) оценивалась нами (согласно рекомендациям Российской ассоциации эндокринологов) и как его дефицит (2), так как концентрация VD по метаболиту 25(ОН)D была выше 10 нг/мл, но ниже 20 нг/мл; выраженный дефицит VD (концентрация 25(ОН)D в крови – ниже 10 нг/мл) не был зарегистрирован у женщин с РМЖ. Согласно Клиническим рекомендациям

Российской ассоциации эндокринологов, для коррекции недостаточности VD (уровень 25(OH)D – 20–29 нг/мл) необходимо использовать насыщающие дозы 50 000 МЕ еженедельно в течение четырех недель внутрь и далее переходить на поддерживающую терапию, но с применением половины суммарной насыщающей дозы. Пациенткам, принимающим препараты, которые нарушают метаболизм VD, имеющим ожирение, страдающим мальабсорбцией, для восполнения дефицита VD (при уровне 25(OH)D ниже 20 нг/мл) или при поддержании адекватных уровней 25(OH)D в крови применяются дозы, в 2–3 раза выше требующихся для лечения лиц, не имеющих этих нарушений, то есть порядка 6000–10 000 МЕ в сутки.

Таким образом, остается весьма актуальной разработка оптимальной лечебной дозы холекальциферола у пациенток с дефицитом и недостаточностью VD и РМЖ с учетом соматических характеристик (показатели веса, индекс массы тела, сочетанной лекарственной и химиотерапии и т. д.).

7.1. Характеристика женщин со злокачественной опухолью молочной железы, имеющих дефицит или недостаточность витамина D

Пациентки с РМЖ (n = 160) с недостаточностью или дефицитом 25(OH)D были разделены на три группы в зависимости от лечебной дозы ежедневного приема холекальциферола: 1-я группа – женщины с РМЖ (n = 40), принимавшие VD в суточной дозе 4000 МЕ в течение шести месяцев, 2-я (n = 40) – лица, которым препарат холекальциферол назначался в дозе 10 000 МЕ/сут также на протяжении шести месяцев, 3-я (n = 80) – больные РМЖ, не принимавшие VD.

В сыворотке крови у всех 160 обследованных измеряли уровень промежуточного метаболита VD 25(OH)D в крови в исходном состоянии и

через шесть месяцев ежедневного приема холекальциферола с определением показателей ПОЛ и количества ДЭК в крови в (табл. 12).

Таблица 12 – Содержание витамина D (25(OH)D), эндотелиальных клеток и показатели перекисного окисления липидов в крови женщин с раком молочной железы

| Показатель и | 1-я группа (n = 40) | | 2-я группа (n = 40) | | Контроль (n = 80) |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------|
| | исх. | через 6 мес. | исх. | через 6 мес. | исх. |
| 25(OH)D нг/мл | 16 [11,73; 20,2] | 26 [23,7; 32] | 29,35 [19,55; 31] | 49,83 [31,77; 58,57] | 24,52 [19,79; 34,89] |
| ДЭК (ДЭ шт./камере Горяева) | 6 [4,25; 7] ^x | 4,5 [4; 5,75] | 11 [9; 11] ^{xx} | 16 [14; 16] | 6 [4; 9] |
| I _{max} , мВ | 127 [125; 140] ^{xx} | 112 [109; 117] ^{*k} | 121,5 [110,25; 140] ^x | 129,5 [114,5; 151] | 128 [121; 147] |
| S, мВ/с | 1380 [1199; 1423] ^{*kk} | 1377 [1175; 1425] [*] | 835 [688; 886] ^{*kk x} | 864,5 [824; 895] | 1033 [936; 1185] |
| Tg альфа, мВ/с | -29,25 [-31,13; - 24] ^{*xx} | -34,75 [-42,13; -32] | -26,5 [-35; -24,5] ^x | -35,25 [-38,25; -34,5] | -36 [-42; -28] |
| МДА, нмоль/мл | 3,91 [3,08; 4,43] | 4 [3,32; 4,05] [*] | 3,16 [2,51; 4] ^x | 4,21 [3,18; 4,84] [*] | 2,86 [2,48; 3,42] |

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

7.2. Показатели перекисного окисления липидов у пациенток с раком молочной железы, принимавших разные дозы холекальциферола

У 40 пациенток с РМЖ, с суточным приемом холекальциферола в дозе 10 000 МЕ выявлено достоверное увеличение в крови количества ДЭК (исх. – 11 [9; 11] ДЭ шт./камере Горяева; через шесть месяцев – 16 [14; 16] ДЭ шт./камере Горяева; $p = 0,001$) и МДА (исх. – 3,16 [2,5; 4] нмоль/мл; через шесть месяцев – 4,21 [3,18; 4,84] нмоль/мл; $p = 0,001$), которые находились в прямой корреляционной связи ($r = +0,85$), тогда как у женщин, принимавших 4000 МЕ/сут холекальциферола, количество ДЭК в крови составило 6 [4,25; 7] и 4,5 [4; 5,75] ДЭ шт./камере Горяева соответственно; $p = 0,001$), а МДА (-3,91 [3,08; 4,43] и -4 [3,32; 4,05] нмоль/мл; $p = 0,05$) оставались в пределах референтных значений. Высокая доза холекальциферола в объеме 10 000 МЕ у пациенток с РМЖ способствовала повышению активности ПОЛ и формированию эндотелиальной дисфункции.

Статистически значимые показатели ПОЛ в динамике параметров групп 4000 МЕ и 10 000 МЕ отражены в таблице 13.

Таблица 13 – Динамика показателей активности перекисного окисления липидов у женщин, получающих разные дозы холекальциферола

| Параметр | 4000 МЕ | М | 10000 МЕ | m | p |
|----------------------|---------|-------|----------|-------|---------|
| $\Delta * I_{\max}$ | -20,00 | 5,83 | 5,33 | 5,24 | 0,00001 |
| $\Delta S I_{\max}$ | 15,33 | 84,75 | -70,83 | 76,90 | 0,04760 |
| ΔMDA | 0,03 | 0,63 | 1,21 | 1,06 | 0,02298 |
| Δ Эндотел кл. | -1,00 | 1,55 | 4,67 | 1,97 | 0,00015 |
| $\Delta 25(OH)D3$ | 11,58 | 265 | 23,88 | 12,99 | 0,03408 |

Примечание. « Δ » – разность по окончании терапии (шесть месяцев) и исходного значения (день 0*).

Таким образом, из двух изученных вариантов нами определена наиболее оптимальная лечебная доза холекальциферола 4000 МЕ у пациенток с недостаточностью или дефицитом VD с ЗНО МЖ в анамнезе. При анализе

динамики параметров после приема холекальциферола в дозе 4000 МЕ в течение шести месяцев отмечено достоверное снижение в крови I_{\max} ($\Delta I_{\max} = -20,00 \pm 5,83$ мВ); MDA ($\Delta MDA = 0,03 \pm 0,63$ нмоль/мл) и уровня ДЭК ($\Delta ДЭК = -1,00 \pm 1,55$ ДЭ шт./камере Горяева) в пределах референтных значений, тогда как прием холекальциферола в дозе 10 000 МЕ в течение шести месяцев способствовал увеличению I_{\max} ($+5,33 \pm 5,24$ мВ, $p = 0,00001$), MDA $1,21 \pm 1,06$ нмоль/мл, $p = 0,02298$) и ДЭК ($4,67 \pm 1,97$ ДЭ шт./камере Горяева, $p = 0,00015$).

Следовательно, для пациенток со ЗНО МЖ в анамнезе оптимальной лечебной дозой ежедневного приема холекальциферола является 4000 МЕ/сут. Полученные результаты свидетельствуют о повышении активности ПОЛ и формировании эндотелиальной дисфункции при ежедневном приеме VD (холекальциферола) в дозе 10 000 МЕ/сут, тогда как ежедневный прием препарата в суточной дозе 4000 МЕ способствовал *изостазии гомеостаза процессов окисления и нормализации эндотелиальной функции сосудов*.

Клинический случай № 1

Из анамнеза пациентки Ю., 29 лет: диагноз «ЗНО левой МЖ урТ2N2M0 IIIa ст. LumB (Her2/neu3+) позитивный. Состояние после радикальной мастэктомии слева, АПХТ – 8 курсов (АС+Т) лучевой терапии. В процессе гормонотерапии (тамоксифен 20 мг). Дефицит VD». В течение шести месяцев принимала холекальциферол по 4000 МЕ/сут, согласно клиническим рекомендациям Российской ассоциации эндокринологов (2020).

Гистологическое заключение – инфильтративный рак неспецифического типа GII в 9 лимфатических узлах – метастазы рака.

Иммуногистохимическое заключение – РЭ+; РП+; Her2/neu-положительный по FISH; Ki67 = 11 %.

Изменения уровней VD 25(OH)D, ПОЛ и ДЭК в крови у пациентки на фоне ежедневного приема холекальциферола в дозе 4000 МЕ в течение шести месяцев отражены в таблице 14.

Таблица 14 – Динамика показателей крови у пациентки Ю., ежедневно принимавшей холекальциферол в дозе 4000 МЕ в течение шести месяцев

| Показатель | Исходное значение | Через 6 месяцев приема | p |
|-----------------------|-------------------|------------------------|------------|
| VD 25(OH)D, нг/мл | 11,50 | 24 | p = 0,0001 |
| I _{max} , мВ | 144 | 118 | p = 0,0004 |
| S. мВ × с | 1177 | 1156 | p < 0,05 |
| Tg2, мВ/с | -28,5 | -33 | p = 0,004 |
| MDA | 4,69 | 4,48 | p < 0,05 |
| ДЭК, 10 ⁵ | 4 | 4 | p < 0,05 |

Клинический случай № 2

Из анамнеза пациентки И., 29 лет: диагноз «ЗНО левой МЖ урТ2N0M0 Па стадия. Her2/neu3+ позитивный. Состояние после радикальной мастэктомии слева, АПХТ – 8 курсов (АС+Т) лучевой терапии. Недостаточность VD». Гистологическое заключение – инвазивный дольковый рак. Иммуногистохимическое заключение – РЭ – отриц/; РП – отриц/; Her2/neu = 3+; Ki67 = 80 %. В течение шести месяцев больная И. принимала лекарственную дозу холекальциферола по 10 000 МЕ/сут согласно клиническим рекомендациям Российской ассоциации эндокринологов (2020).

Изменения уровня VD 25(OH)D, ПОЛ и ДЭК в венозной крови у пациентки И., перенесшей РМЖ, на фоне ежедневного приема холекальциферола в дозе 10 000 МЕ в течение шести месяцев отражены в таблице 15.

Таблица 15 – Динамика показателей крови у пациентки И. ежедневно принимавшей холекальциферол в дозе 10 000 МЕ в течение шести месяцев

| Показатель | Исходное значение | Через 6 месяцев приема | p |
|-----------------------|-------------------|------------------------|--------------|
| VD 25(OH)D, нг/мл | 29,35 | 31,77 | p = 0,00014 |
| I _{max} , мВ | 144 | 151 | p = 0,008 |
| S. мВ × с | 536 | 824 | p < 0,05 |
| Tg2, мВ/с | -22 | -27 | p = 0,00004 |
| MDA | 4,2 | 4,21 | p = 0,001 |
| ДЭК, 10 ⁵ | 11 | 16 | p = 0,000014 |

Клинический случай № 3

Из анамнеза пациентки Л., 46 лет: диагноз «ЗНО правой МЖ урТ2N3M0 IIIc стадия. Trip.neg. Состояние после НАПХТ 8 курсов (АС+Т), РМЭ справа, лучевой терапии». Гистологическое заключение – инвазивный протоковый рак, G III. Иммуногистохимическое заключение – РЭ – отриц.; РП – отриц.; Her2/neu = 1+; Ki67 = 40 %. Определен оптимальный уровень промежуточного метаболита VD 25(OH)D. Изменения содержания VD 25(OH)D, ПОЛ и ДЭК в венозной крови у больной Е., перенесшей РМЖ, без приема холекальциферола отражены таблице 16.

Таблица 16 – Динамика показателей крови у пациентки Л., не получающей препарат витамина D

| Показатель | Исходное значение | Через 6 месяцев приема | p |
|-----------------------|-------------------|------------------------|------------|
| VD 25(OH)D, нг/мл | 34,89 | 24,93 | p = 0,0001 |
| I _{max} , мВ | 128 | 130 | p = 0,0001 |
| S. мВ × с | 936 | 939 | p < 0,05 |
| Tg2, мВ/с | -42 | -45 | p < 0,05 |
| MDA | 3,42 | 2,56 | p = 0,004 |
| ДЭК, 10 ⁵ | 6 | 4 | p < 0,05 |

Резюме к главе 7

Анализ содержания 25(OH)D, показателей ПОЛ и ДЭК, совокупность сравнительного и корреляционного анализа показали, что прием холекальциферола в дозе 10 000 МЕ/сут является нерациональным и позволяет нам сделать вывод о большей рациональности дозы холекальциферола 4000 МЕ/сут. Так, при использовании холекальциферола в дозе 4000 МЕ/сут исследованные показатели приходят к нормальным значениям, в то время как при приеме препарата в дозе 10 000 МЕ/сут наблюдалось увеличение показателей ПОЛ и ДЭК.

Таким образом, в данной главе нами показано, что выбор лечебной дозы холекальциферола для пациенток с РМЖ и недостаточностью или дефицитом VD 25(OH)D основывался на анализе динамики изменений уровня VD, показателей ПОЛ, биохимических параметров, данных иммуногистохимии и клинических результатов, изменившихся в динамике приема холекальциферола в дозе 4000 МЕ/сут в течение шести месяцев. У женщин, принимавших физиологическую дозу холекальциферола 4000 МЕ/сут в течение шести месяцев, отмечено достоверное снижение I_{\max} ($\Delta I_{\max} = -20,00 \pm 5,83$ мВ); MDA ($\Delta MDA = -0,03 \pm 0,63$ нмоль/мл); ДЭК ($\Delta DЭК = -1,00 \pm 1,55$ ДЭ шт./камере Горяева) в крови в пределах референтных значений, тогда как у пациенток, получавших 10 000 МЕ/сут через шесть месяцев, напротив, возросли I_{\max} ($\Delta I_{\max} = +5,33 \pm 5,24$ мВ), MDA ($\Delta MDA = 1,21 \pm 1,06$ нмоль/мл) и ДЭК ($\Delta DЭК = 4,67 \pm 1,97$ ДЭ шт./камере Горяева).

Эффект предлагаемой физиологической дозы 4000 МЕ/сут холекальциферола у пациенток с недостаточностью или дефицитом VD 25(OH)D, перенесших РМЖ, заключается в снижении показателей ПОЛ, таких как I_{\max} и MDA, уровня ДЭК, свидетельствующих об изостазии гомеостаза процессов окисления и нормализации эндотелиальной функции сосудов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РМЖ – актуальная проблема современной онкологии. Заболеваемость им ежегодно растет. Особенности эпидемиологии РМЖ привели к увеличению числа молодых пациенток, что значительно ухудшает их качество жизни [93].

У женщин репродуктивного возраста развитие РМЖ обуславливает множество причин. Существенное влияние оказывают и экологические факторы, причем гораздо более значимые, чем генетические. Одним из значимых направлений онкологической помощи считается разрабатывание и усовершенствование мер профилактики РМЖ. Все это показывает целесообразность новых исследований терапевтических и профилактических эффектов VD у пациенток с ЗНО МЖ, которые имеют низкую обеспеченность VD.

Несмотря на известные положительные эффекты действенных и безопасных доз VD для поддержки оптимальной обеспеченности пациенток, препараты VD в практической медицине используются ограниченно в связи с трудностями определения терапевтической дозы, а также дальнейшему мониторингованию его концентрации один раз в шесть месяцев.

Цель данного исследования – оценить возможности влияния метаболитов VD на подавление возникновения и прогрессирования злокачественной опухоли МЖ.

Для достижения поставленных задач проведено клинико-фармакологическое исследование противоопухолевых эффектов холекальциферола на модели перевиваемой КЛЛ. Кроме того, были изучены фармакокинетические характеристики различных лекарственных форм холекальциферола у женщин молодого и среднего возрастов, проведен анализ дозозависимого хемотранскриптомного действия VD на экспрессию генов клеток линии MCF7 опухоли МЖ и оценка влияния дефицита или недостаточности VD на ее прогрессирование, обоснование выбора лечебной

дозы холекальциферола для пациенток с РМЖ с недостаточностью или дефицитом VD 25(OH)D.

По литературным данным, у 56 % пациентов с диагнозом карциномы *in situ* обнаружилось повышение экспрессии гена CYP24A1, который кодирует фермент 24-гидроксилазу. При увеличении экспрессии гена CYP24A1 повышается синтез фермента, который трансформирует активный VD 1,25(OH)D в неактивный метаболит 1,24,25(OH)D. Таким образом, участие фермента 24-гидроксилазы в повышенном количестве способствует синтезу большего количества неактивного метаболита VD. Такие изменения приводят к выраженному функциональному дефициту VD в тканях карциномы.

Так, в исследованиях N. Lopes, B. Sousa (2010) было обнаружено, что низкая экспрессия VDR (56,2 % случаев) и высокая экспрессия CYP24A1 (53,7 %), сохраняется как при инвазивных опухолях, так и при карциноме *in situ*, но, в отличие от карциномы *in situ*, экспрессия гена CYP27B1, участвующего в кодировании фермента 1-альфа-гидроксилаза (1 α -гидроксилаза), который осуществляет вторую из двух реакций превращения VD в его активную форму-1,25-дигидроксивитамин D, также известный как кальцитриол, снижается в 44,6 % случаев. Следовательно, в случаях инвазии выраженный дефицит VD будет наблюдаться именно в тканях инвазивной карциномы.

При изучении противоопухолевых эффектов у мышей-гибридов F1 при КЛЛ установлено: на 13-е сутки происходило достоверное торможение развития КЛЛ, а именно, возрастание индекса ТРО на 25–30 %, также отмечалось статистически значимое подавление процессов метастазирования и увеличение ИИМ на 35–40 %. Проведенные на этом этапе исследования на модели перевиваемой КЛЛ у мышей отчетливо показали наличие противоопухолевого эффекта холекальциферола. Полученные данные соответствуют результатам фундаментальных исследований противоопухолевых эффектов VD.

Одной из задач клинической части нашего исследования явилось определение особенностей фармакокинетики различных форм VD: «Аквадетрим» (действующее вещество – холекальциферол, водный раствор, содержащий в одном мл 375 мкг холекальциферола, N014088/01, MEDANA PHARMA, Польша), «Вигантол» (действующее вещество – холекальциферол, масляный раствор 500 мкг/мл, N011712/01, MERCK KGaA, Германия) и «Ультра-Д» (БАД, действующее вещество – холекальциферол, капсула, содержащая 25 мкг, ORION PHARMA, Финляндия), которые вводились однократно в дозе 10 000 МЕ (250 мкг холекальциферола). Проведен сравнительный анализ фармакокинетики препаратов VD в форме масляного раствора («Вигантол»), водного мицеллированного раствора («Аквадетрим») и жевательных таблеток («Ультра-Д»). Начальный (базовый) уровень 25(OH)D составил 27 ± 20 нг/мл.

У 10 из 18 (78 %) женщин 24–53 лет, принявших участие в исследовании, отмечена недостаточность VD (25(OH)D менее 30 нг/мл), а у 8 (44 %) – выраженный дефицит VD (25(OH)D менее 20 нг/мл). Препараты применялись однократно внутрь в дозе 10 000 МЕ холекальциферола в одно и то же время (в 8:00 натошак). Несмотря на то что VD применялся в различных лекарственных формах, все три препарата обладали сравнимыми фармакокинетическими показателями ($T_{1/2}$, L_z , C_{max} , t_{max} , C_{last} , AUC_t , MRT_t , CL , V_d), полученными в ходе бескамерного анализа, и кинетическими константами k_{12} , $k_{e_Central}$, K_{cd} и K_{dc} , установленными в результате многокамерного анализа. Полученные фармакокинетические параметры практически не зависели от возраста добровольцев и имели статистически значимые отличия от начального (базового) уровня 25(OH)D в крови. Концентрации 25(OH)D и 1,25(OH)D тем выше, чем выше исходный уровень данных метаболитов. Таким образом, несмотря на то что любой из исследованных препаратов обеспечивает достаточно стабильную концентрацию 25(OH)D в организме при однократном суточном приеме и повышает приверженность к приему VD, для дальнейшего исследования был

исключен БАД «Ультра-Д», т. к. биологически активные добавки к пище не разрешены для коррекции недостаточности VD у пациентов с коморбидной патологией. Поэтому для проведения дальнейших этапов исследования нами был выбран холекальциферол в форме раствора для приема внутрь.

Кроме того, при огромном количестве исследований мы не обнаружили научных источников, где приводились бы результаты хемотранскриптомного анализа влияния VD на опухолевые клетки РМЖ.

Как правило, для подавляющего большинства представленных на рынке препаратов VD отсутствуют данные об их действии на транскриптом уровне, а также о долговременных последствиях их применения. Поэтому особую значимость приобретает изучение продолжительных эффектов противоопухолевых препаратов [144]. Транскриптомные исследования позволяют выявлять скрытые механизмы действия препаратов и более детально обозначать спектр патологий, при которых исследуемая молекула может оказать благоприятное воздействие.

Результаты проведенного нами хемотранскриптомного анализа воздействия VD на клетки опухоли МЖ (для 3620 генов в линии клеток MCF7) и на здоровые клетки-нейроны (для 4465 генов в линии клеток NPC) в условиях их инкубации с кальцитриолом в течение 24 часов показывают достоверные дозозависимые эффекты влияния VD на транскрипцию генов (что соответствует изменению транскрипции на 5 %, или более на 1 мкмоль VD). При этом оценки изменений экспрессии 2831 генов были приблизительно одинаковы в обеих линиях клеток. Анализ с использованием функциональной аннотации генов по номенклатуре GO позволил установить дифференцированное действие VD на опухолевые и на нейрональные клетки. Были выявлены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры GO. В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов). Транскрипция генов этих категорий повышалась и в нейрональных клетках,

но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция – 31 ген, внутриклеточная передача сигналов – 38 генов). В опухолевых клетках существенно снижалась экспрессия генов, вовлеченных в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в поддержание хронического воспаления (факторы ФНО/NF-kB, 105 генов). Вовлечение в ремонт ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, подавляет энергетический метаболизм, снижает их способность к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что VD3 способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (9 генов), и усилению противоопухолевых эффектов витамина А (5 генов). Также VD уменьшал транскрипцию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-myc и др). Таким образом, VD3 в существенной мере подавляет деление именно опухолевых клеток.

Анализ транскриптомных эффектов препаратов представляет собой «передовой фронт» современной молекулярной фармакологии.

Одной из задач клинической части исследования было проведение анализа влияния дефицита или недостаточности VD на прогрессирование РМЖ. Определялись уровни 25(ОН)D, показатели ПОЛ и ДЭК. В сыворотке крови у всех обследованных нами женщин с РМЖ (n = 160) измеряли уровень промежуточного метаболита VD 25(ОН)D в исходном состоянии и через шесть месяцев с определением показателей ПОЛ и количества ДЭК в венозной крови. Интенсивность ПОЛ определяли методом индуцированной хемилюминесценции с измерением на приборе БХЛ-07 («ИМБИО», Нижний Новгород).

Концентрация 25(ОН)D в сыворотке крови снижалась на третий визит (V3), что явилось наиболее сильным предиктором прогрессирования опухоли: содержание 25(ОН)D не более 18,9 нг/мл на третий визит выявлена

у 100 % пациенток с прогрессией РМЖ и только у 16 % без прогрессии. Следует отметить, что уровень 25(OH)D перед началом прогрессирования заболевания снижался вне зависимости от приема препарата VD, результатов гистологического исследования опухоли и молекулярных подтипов РМЖ. Таким образом, данные результаты позволили разработать дополнительные критерии, необходимые для прогнозирования прогрессирования РМЖ с учетом концентраций 25(OH)D, биolumинисценции крови, иммуногистохимии, анамнестических и физикальных данных (см. табл. 11): сниженное содержание 25(OH)D, отсутствие акне, высокий уровень стресса, наличие ПМС, длительные (шесть и более дней) и обильные менструации, локализация опухоли слева, голубой или серый цвет глаз.

Итак, нами показано, что снижение уровня промежуточного метаболита VD – 25(OH)D – в крови является прогностическим признаком прогрессирования РМЖ независимо от молекулярного подтипа опухоли и потребления VD. В целом, полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности использования препаратов VD не только для профилактики онкологических заболеваний, но и в качестве средства диагностики прогрессирования ЗНО МЖ.

Следовательно, для выявления вторичных изменений у пациенток с РМЖ и для повышения качества наблюдения за этими пациентками *рекомендуется использовать дополнительные методы диагностики и определять уровень промежуточного метаболита VD – 25(OH)D в периферической крови.*

В последнее время активно исследуются вопросы потребления VD для профилактики и лечения различных заболеваний, однако в настоящее время отсутствуют отчетливые критерии и рекомендации по приёму VD при злокачественной опухоли МЖ.

У пациенток с РМЖ, принимавших холекальциферол в дозе 10 000 МЕ/сут, выявлено достоверное увеличение в крови количества ДЭК (исх. – 11 [9; 11] ДЭ шт./камере Горяева; через шесть месяцев –

16 [14; 16] ДЭ шт./камере Горяева; $p = 0,001$) и МДА (исх. – 3,16 [2,5; 4] нмоль/мл; через шесть месяцев – 4,21 [3,18; 4,84] нмоль/мл; $p = 0,001$), которые находились в прямой корреляционной связи ($r = +0,85$). У женщин с РМЖ, принимавших холекальциферол в дозе 4000 МЕ/сут, количество ДЭК в венозной крови (6 [4,25; 7] ДЭ шт./камере Горяева и 4,5 [4; 5,75] ДЭ шт./камере Горяева соответственно; $p = 0,001$) и МДА 3,91 [3,08; 4,43] и 4 [3,32; 4,05] нмоль/мл соответственно; $p = 0,05$) оставались в пределах референтных значений. Высокая доза холекальциферола в объеме 10 000 МЕ у пациенток, перенесших РМЖ, способствовала повышению активности ПОЛ и формированию эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, в данном исследовании нами показано, что выбор лечебной дозы холекальциферола для пациенток с ЗНО МЖ и недостаточностью или дефицитом VD 25(OH)D основывался на анализе содержания VD, показателей ПОЛ, биохимических параметрах и клинических данных, изменявшихся в динамике приема холекальциферола в разных дозах – 4000 и 10 000 МЕ/сут в течение шести месяцев.

Эффект предлагаемой физиологической дозы 4000 МЕ/сут холекальциферола у пациенток с недостаточностью или дефицитом VD D25(OH)D с ЗНО МЖ заключается в снижении показателей ПОЛ, таких как I_{\max} и МДА, уровня ДЭК, свидетельствующих об изостазии гомеостаза процессов окисления и нормализации эндотелиальной функции сосудов.

ВЫВОДЫ

1. Холекальциферол в дозе 0,1 мл на 10 г массы тела оказывает противоопухолевое действие на модели перевиваемой карциномы легких Льюиса у мышей-гибридов F₁, которое связано с подавлением процессов метастазирования и торможением развития карциномы легких Льюиса.

2. Холекальциферол в различных формах (масляный, водный раствор, капсулы) имеет сходные фармакокинетические показатели (кроме AUC_t) и обеспечивает одинаковый прирост концентрации 25(OH)D в крови женщин в возрасте 24–53 лет при однократном приеме 10 000 МЕ.

3. Хемотранскриптомный анализ действия витамина D на клетки 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 трехсот генов, ответственных за деление клеток, и более 100 генов, ответственных за воспаление, что приводит к торможению роста опухоли.

4. В клинических исследованиях у 160 женщин с диагнозом рака молочной железы установлены критерии прогрессирования заболевания: содержание 25(OH)D не более 18,9 нг/мл, отсутствие акне, высокий уровень стресса, наличие предменструального синдрома, длительные (шесть и более дней) и 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 количества десквамированных эндотелиальных клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволили научно обосновать целесообразность изучения обеспеченности витамином D организма пациенток со злокачественной опухолью молочной железы. Установлено, что при уровне витамина D 25(OH)D не более 18,9 нг/мл повышается риск прогрессирования рака молочной железы, поэтому следует рассматривать холекальциферол в результативных 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 или недостаточностью витамина D.

Рекомендуется продолжить изучение действия холекальциферола для поиска новых онкопротекторов с целью лечения и профилактики злокачественной опухоли молочной железы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------------------------|--|
| АПХТ | адьювантная полихимиотерапия |
| АС+Т | схемы полихимиотерапии включающие препараты доксорубицин, циклофосфамид и группу таксанов |
| БАД | биологически активная добавка |
| ВОЗ | Всемирная организация здравоохранения |
| ДИ | доверительный интервал |
| ДИ | доверительный интервал |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ДЭК | десквамированные эндотелиальные клетки |
| ИИМ | индекс ингибирования метастазирования |
| КЛЛ | карцинома легких Льюиса |
| МЖ | молочная железа |
| НАПХТ | неoadьювантная полихимиотерапия |
| ОР | относительный риск |
| ПОЛ | перекисное окисление липидов |
| РМЖ | рак молочной железы |
| РНК | рибонуклеиновая кислота |
| РЯ | рак яичников |
| ТРО | индекс торможения роста опухоли |
| ФК-кривые | фармакокинетические кривые |
| 1,25 (ОН) ₂ D | кальцитриол |
| AUC _t | площадь под кривой |
| C _{last} | последняя измеренная концентрация 25(ОН)D ₃ |
| C _{max} | максимальная концентрация 25(ОН)D ₃ в крови |
| Core-биопсия | трепанобиопсия опухоли молочной железы |
| ER | рецепторы эстрогена |
| ER | рецепторы эстрогена |
| GO | gene ontology |

| | |
|-----------------------|--|
| HER2/neu | рецептор эпидермального фактора роста 2 |
| Her2-положительный | молекулярный подтип рака молочной железы с Her2/neu положительным статусом |
| I_{\max} | значение максимальной интенсивности за все время измерения |
| Ki67 | индекс пролиферативной активности опухоли |
| Lum A | люминальный А молекулярный подтип рака молочной железы |
| Lum B (Her2-отрицат.) | люминальный Б молекулярный подтип рака молочной железы с отрицательным Her2/neu статусом |
| Lum B (Her2-положит.) | люминальный Б молекулярный подтип рака молочной железы с положительным Her2/neu статусом |
| MCF7 | эпителиоподобная клеточная линия, полученная из инвазивной карциномы протоков молочной железы человека |
| MDA | показатель деструкции мембран клеток |
| ME | международные единицы |
| PR | рецепторы прогестерона |
| $T_{1/2}$ | период полувыведения |
| t_{\max} | время достижения максимальной концентрации 25(OH)D ₃ |
| Trip. neg. | молекулярный подтип рака молочной железы |
| VD | витамин D |
| VDR | рецептор витамина D |
| Wnt | сигнальный путь, регулирующий дифференцировку клеток |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автомонов, Д. Е. Клинико-морфологические характеристики и прогноз BRCA-ассоциированного рака молочной железы у женщин репродуктивного возраста / Д. Е. Автомонов, А. А. Пароконная, Л. Н. Любченко [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. 2012. № 1. С. 20–24.
2. Байчоров, Э. А. Реконструктивно-пластические операции у больных раком молочной железы с использованием ацеллюлярного дермального матрикса и синтетического имплантата : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12 / Байчоров Эльбрус Асламбекович. Москва, 2020. 150 с.
3. Громова, О. А. Витамин D – смена парадигмы / О. А. Громова, И. Ю. Торшин ; под ред. акад. РАН Е. И. Гусева, проф. И. Н. Захаровой. Москва : ТОРУС ПРЕСС, 2017. 576 с.
4. Громова, О. А. Активные формы витамина D и функция мышечной ткани: анализ молекулярно-биологических и клинических данных / О. А. Громова, А. В. Гилельс, И. Ю. Торшин [и др.] // Вестник эстетической медицины. 2014. Т. 13, № 2. С. 66–75.
5. Громова, О. А. Витамин D – смена парадигмы / О. А. Громова, И. Ю. Торшин. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. 736 с.
6. Громова, О. А. Витамин D. Смена парадигмы / О. А. Громова, И. Ю. Торшин ; под ред. Е. И. Гусева, И. Н. Захаровой. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. 568 с.
7. Громова, О. А. Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, Д. Е. Фролова [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2018. № 2. С. 35–51.
8. Громова, О. А. О противоопухолевом эффекте препаратов витамина D3: фундаментальные исследования и доказательная медицина /

О. А. Громова, И. Ю. Торшин, С. Е. Малыгин [и др.] // Фарматека. 2014. № 19. С. 48–58.

9. Громова, О. А. Полногеномный анализ сайтов связывания рецептора витамина D указывает на широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, В. Б. Спиричев // Медицинский совет. 2016. № 1. С. 12–21.

10. Дефицит витамина D в России: первые результаты регистрового неинтервенционного исследования частоты дефицита и недостаточности витамина D в различных географических регионах страны / Л. А. Суплотова, В. А. Авдеева, Е. А. Пигарова [и др.] // Проблемы эндокринологии. 2021. Т. 66, № 2. С. 84–92.

11. Дефицит витамина D у взрослых : Клинические рекомендации Москва : Минздрав России, 2021 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rae-org.ru/system/files/documents/pdf/kr342_deficit_vitamina_d_u_vzroslyh.pdf.

12. Дефицит витамина D у взрослых : Клинические рекомендации. Москва : Минздрав России, 2016 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rae-org.ru/system/files/documents/pdf/kr342_deficit_vitamina_d_u_vzroslyh.pdf.

13. Зеленская, Е. М. Генетические маркеры метаболизма витамина D и подходы к коррекции гиповитаминоза у взрослых / Е. М. Зеленская, Г. И. Лифшиц // Сибирское медицинское обозрение. 2018. Т. 144, № 6. С. 5–11.

14. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. С. 7–29.

15. Иванова, А. М. Тактика клинической лабораторной диагностики : практическое руководство / А. М. Иванова. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. С. 112.

16. Исмагилов, А. Изучение влияния реконструктивно-пластических операций на качество жизни больных, перенесших радикальное лечение по поводу рака молочной железы / А. Исмагилов, Р. Хасанов, А. С. Ванесян // Хирургия Украины. 2011. № 4. С. 99–103.
17. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова. Москва, 2020. 252 с
18. Каприн, А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии», 2019. С. 18–31.
19. Каприн, А. Д. Сравнительный анализ индикаторов региональных проектов «Контроль онкологических заболеваний» на основании постоянного мониторинга данных с января по май 2018–2019 гг. / А. Д. Каприн, В. В. Старинский // Вестник Росздравнадзора. 2019. № 4. С. 64–71.
20. Каприн, А. Д. Популяционный регистр онкологических больных в Российской Федерации / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова [и др.] // Панорама общественного здравоохранения. 2019. № 05 (01). С. 95–102.
21. Колядина, И. В. Прогностическое значение возраста больных при раннем раке молочной железы / И. В. Колядина, И. В. Поддубная, С. J. H. van de Velde [и др.] // Современные технологии в медицине. 2012. № 3. С. 31–35.
22. Королев, А. А. Гигиена питания : учебник / А. А. Королев. 4-е изд., перераб. и доп. Москва : Академия, 2014. 544 с.
23. Лапочкина, Н. П. Гормональный статус женщин с заболеваниями молочных желез / Н. П. Лапочкина // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. 2006. № 6.

24. Недостаточность витамина D у детей и подростков Российской Федерации: современные подходы к коррекции : Национальная программа. Москва : ПедиатрЪ, 2021.

25. О внесении изменений в порядок проведения диспансеризации определенных групп взрослого населения, утвержденный приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 3 февраля 2015 г. № 36н : Приказ Минздрава России от 9 декабря 2016 г. № 946н. Москва, 2016.

26. Об охране здоровья граждан : Федеральный закон РФ в области здравоохранения от 21 ноября 2011. № 323-ФЗ. Москва, 2011.

27. Об утверждении правил лабораторной практики : Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н. Москва, 2010.

28. Обеспеченность микронутриентами и женское здоровье: интеллектуальный анализ клинико-эпидемиологических данных / О. А. Лиманова, И. Ю. Торшин, И. С. Сардарян [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2014. № 13(2). С. 5–15.

29. Остеопороз : Клинические рекомендации, Москва : Минздрав России, 2021 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/-recommend/87_4.

30. Петрушкина, А. А. Эпидемиология дефицита витамина D в Российской Федерации / А. А. Петрушкина, Е. А. Пигарова, Л. Я. Рожинская // Остеопороз и остеопатии. 2018. Т. 21, № 3. С. 15–20.

31. Пушкарев, А. В. Роль наследственных факторов в патогенезе рака молочной железы / А. В. Пушкарев, К. В. Меньшиков, В. А. Пушкарев [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. 2020. № 2(86). С. 70–78.

32. Рожинская, Л. Я. Применение высокодозных препаратов колекальциферола для лечения дефицита витамина D: результаты открытого многоцентрового сравнительного рандомизированного исследования / Л. Я. Рожинская, Е. А. Пигарова, Ж. Е. Белая [и др.] // Остеопороз и остеопатии. 2020. № 23(3). С. 4–16.

33. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян [и др.]. Москва : Гриф и К, 2012. 944 с.
34. Свирновский, А. И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема / А. И. Свирновский // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2014. № 5 (11). С. 15–38.
35. Щепотин, И. Б. Рак грудной железы и репродуктивная функция женщины: рак грудной железы у беременных и вопросы сохранения фертильности после лечения / И. Б. Щепотин, А. С. Зотов, О. И. Лебедева // Клиническая онкология. 2012. № 1. С. 59–63.
36. Acevedo, F. High prevalence of vitamin D deficiency in women with breast cancer: the first Chilean study / F. Acevedo, V. Pérez, A. Pérez-Sepúlveda [et al.] // Breast. 2016. Vol. 29. P. 39–43.
37. Ahn, J. Serum 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk: a meta-analysis of prospective studies / J. Ahn, K. Yu, R. Stolzenberg-Solomon [и др.] // Tumour Biol. 2013. Vol. 34(6). P. 3509–3517.
38. Aksoy, F. Identification of CHEK2 germline mutations in BRCA1/2 and PALB2 negative breast and ovarian cancer patients / F. Aksoy, H. Tezcan Unlu, G. Cecener [et al.] // Am. Hered. 2022. Jan 6.
39. Amrein, K. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide / K. Amrein, M. Scherkl, M. Hoffmann [et al.] // Eur J Clin Nutr. 2020. Vol. 74. P 1498–1513.
40. Anders, C. K. Breast cancer before age 40 years / C. K. Anders, R. Johnson, J. Litton [et al.] // Semin Oncol. 2009. Vol. 36(3). P. 237–249.
41. Andersson, I. False positives in breast cancer screening with one-view breast tomosynthesis: An analysis of findings leading to recall, work-up and biopsy rates in the Malmö Breast Tomosynthesis Screening Trial / I. Andersson, K. Lång, M. Nergården [et al.] // Eur Radiol. 2016. Vol. 26 (11). P. 3899–3907.

42. Aspray, T. J. National osteoporosis society vitamin D guideline summary. / T. J. Aspray, C. Bowring, W. Fraser [et al.] // Age Ageing. 2014. Jul 28.
43. Assi, H. A. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women / H. A. Assi, K. E. Khoury, H. Dbouk [et al.] // J. Thorac Dis. 2013. Vol. 5(1). P. 2–8.
44. Association of breast cancer progression with a vitamin D receptor gene polymorphism / A. C. Lundin, P. Soderkvist, B. Eriksson [et al.] // Cancer Res. 1999. № 59. P. 2332–2334.
45. Banerjee, P. Antiproliferative role of vitamin D and its analogs – a brief overview / P. Banerjee, M. Chatterjee // Mol Cell Biochem. 2003. Vol. 253. P. 247–254.
46. Beildeck, M. E. Control of TCF-4 expression by VDR and vitamin D in the mouse mammary gland and colorectal cancer cell lines / M. E. Beildeck, M. Islam, S. Shah [et al.] // PLoS One. 2009. Vol. 4 (11). P. 7872.
47. Bharat, A. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women (≤ 40 years) with breast cancer / A. Bharat, R. L. Aft, F. Gao, J. A. Margenthaler // J. Surg Oncol. 2009. Vol. 100 (3). P. 248–251.
48. Bhutia, S. K. Vitamin D in autophagy signaling for health and diseases: Insights on potential mechanisms and future perspectives / S. K. Bhutia // The Journal of Nutritional Biochemistry. 2022. Vol. 99. P. 108841.
49. Brock, K. E. Predictors of vitamin D biochemical status in a large sample of middle-aged male smokers in Finland / K. E. Brock, B. I. Graubard, D. R. Fraser [et al.] // Eur J Clin Nutr. 2010. Vol. 64. P. 280.
50. Chen, J. Vitamin D and its analogs as anticancer and anti-inflammatory agents / J. Chen, Z. Tang, A. T. Slominski [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. 2020. Vol. 207. P. 112738.
51. Chen, P. Higher blood 25(OH)D level may reduce the breast cancer risk: evidence from a Chinese population based case-control study and meta-

analysis of the observational studies / P. Chen, M. Li, X. Gu [et al.] // PLoS One. 2013. Vol. 8(1). P. 49312.

52. Christakos, S. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects / S. Christakos, P. Dhawan, A. Verstuyf [et al.] // *Physiol Rev.* 2016. Vol. 96(1). P. 365–408.

53. Colin, E. M. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultered human peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D / E. M. Colin, A. E. Weel, A. G. Uitterlinden [et al.] // *Clin. Endocrinol. (Oxford)*. 2000. № 52. P. 211–216.

54. Collins, L. C. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer / L. C. Collins, J. D. Marotti, S. Gelber [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* 2012. Vol. 131(3). P. 1061–1066.

55. Cui, Y. Vitamin D, calcium and breast cancer risk: a review / Y. Cui, T. E. Rohan // *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2006. Vol. 15(8). P. 1427–1437.

56. Dalessandri, K. M. Polymorphisms and breast cancer risk in a high-incidence population: a pilot study / K. M. Dalessandri, R. Miike, J. K. Wiencke [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* 2012. Vol. 21, № 5. P. 652–657.

57. Dignam, J. J. Obesity, tamoxifen use, and outcomes in women with estrogen receptor-positive early-stage breast cancer / J. J. Dignam, K. Wieand, K. A. Johnson // *Journal of the National Cancer Institute.* 2003. Vol. 953, № 19. P. 1467–1476.

58. Ditsch, N. The Association between Vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer / N. Ditsch, B. Toth, D. Mayr [et al.] // *J. of Histochemistry & Cytochemistry.* 2012. Vol. 60(2). P. 121–129.

59. Eckfeld, K. RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family / K. Eckfeld, L. Hesson, M. D. Vos [et al.] // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64(23). P. 8688–8693.

60. Eliassen, A. H. Plasma 25 Hydroxy vitamin D and risk of breast cancer in women followed over 20 years / A. H. Eliassen, E. T. Warner, B. Rosner [et al.] // *Cancer. Res.* 2016. Vol.76(18). P. 5423–5430
61. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.
62. Feldman, D. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression / D. Feldman, A. V. Krishnan, S. Swami [et al.] // *Nat Rev Cancer.* 2014. № 14. P. 342–357.
63. Ferreira, A. J. M. MATLAB Codes for Finite Element Analysis / A. J. M. Ferreira. Universidade do Porto. Springer International Publishing, 2009.
64. Filip-Psurska, B. Vitamin D Compounds PRI-2191 and PRI-2205 Enhance Anastrozole Activity in Human Breast Cancer Models / B. Filip-Psurska, M. Psurski, A. Anisiewicz [et al.] // *Int J Mol Sci.* 2021 Vol. 9, № 22(5). P. 2781.
65. Fillenberg, S. Vitamin D and breast density in pre- and postmenopausal women / S. Fillenberg, L. Johannal, R. Loreen [et al.] // *Maturitas.* 2012. Vol. 71. P. 30–31.
66. Garland, C. F. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis / C. F. Garland, E. D. Gorham, S. B. Mohr [et al.] // *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007. Vol. 103(3-5). P. 708–711.
67. Garland, C. F. Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective / C. F. Garland, E. D. Gorham, S. B. Mohr [et al.] // *Ann Epidemiol.* 2009. Vol. 19. P. 468–483.
68. Gery, S. RTP801 is a novel retinoic acid-responsive gene associated with myeloid differentiation / S. Gery, D. J. Park, P. T. Vuong [et al.] // *Exp Hematol.* 2007. Vol. 35(4). P. 572–578.
69. Gil, Á. Vitamin D: Classic and Novel Actions / Á. Gil, J. Plaza-Diaz, M. D. Mesa // *Annals of Nutrition and Metabolism.* 2018. Vol.72, № 2. P. 87–95.
70. Gnagnarella, P. Vitamin D Receptor Polymorphisms and Cancer / P. Gnagnarella, S. Raimondi, V. Aristarco [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* 2020. Vol. 1268. P. 53–114.

71. Goeman, F. VDR primary targets by genome-wide transcriptional profiling / F. Goeman, F. De Nicola, P. D'Onorio De Meo [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2014. Vol. 143. P. 348–356.
72. Goodwin, P. J. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer / P. J. Goodwin, M. Ennis, K. I. Pritchard [et al.] // *J. Clin. Oncol.* 2009. Vol. 27. P. 3757–3763.
73. Gorham, E. D. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta-analysis / E. D. Gorham, C. F. Garland, F. C. Garland [et al.] // *Am. J. Prev. Med.* 2007. Vol. 32(3). P. 210–216.
74. Graham, T. A. The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT / T. A. Graham, W. K. Clements, D. Kimelman, W. Xu // *Mol Cell.* 2002. Vol. 10(3). P. 563–571.
75. Grant, W. B. Review of Recent Advances in Understanding the Role of Vitamin D in Reducing Cancer Risk: Breast, Colorectal, Prostate, and Overall Cancer / W. B. Grant // *Anticancer Res.* 2020 Vol. 40(1). P. 491–499.
76. Hajhashemy, Z. Serum vitamin D levels in relation to abdominal obesity: A systematic review and dose-response meta-analysis of epidemiologic studies / Z. Hajhashemy, F. Shahdadian, R. Ziaei, P. Saneei // *Obes Rev.* 2021. Vol. 22(2). P. 13134.
77. Heer, E. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study / E. Heer, A. Harper, N. Escandor [et al.] // *The Lancet Global Health.* 2020. № 8(8). P. 1027–1037.
78. Heublein, S. Vitamin D receptor, Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor γ are overexpressed in BRCA1 mutated breast cancer and predict prognosis / S. Heublein, D. Mayr, A. Meindl [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2017. Vol. 36. P. 57.
79. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sing of vessels wall lesions / J. Hladovec // *Physiol. Bohemoslov.* 1978. Vol. 27, № 2. P. 140–144.
80. Holick, M. F. Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline /

M. F. Holick, N. C. Binkley, H. A. Bischoff-Ferrari [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. 2011. Vol. 96(7). P. 1911–1930.

81. Holick, M. F. Vitamin D deficiency / M. F. Holick // N Engl J Med. 2007. Vol. 357(3). P. 266–281.

82. Hong, Z. Dietary calcium intake, vitamin D levels, and breast cancer risk: a dose-response analysis of observational studies / Z. Hong, C. Tian, X. Zhang // Breast Cancer Res. Treat. 2012. Vol. 136(1). P. 309–312.

83. Houssami, N. Women's screening accuracy at family risk of breast cancer without a known gene mutation: meta-analysis of individual patients / N. Houssami, M. J. Hoening, C. C. Riedl [et al.] // Eur J. Pak. 2017. Vol. 85. P. 31–38.

84. Hovland, H. N. BRCA1 Norway: comparison of classification for BRCA1 germline variants detected in families with suspected hereditary breast and ovarian cancer between different laboratories / H. N. Hovland, R. Al-Adhami, S. L. Ariansen [et al.] // Fam Cancer. 2022. Vol. 4.

85. Huang, H. Y. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs / H. Y. Huang, S. A. Luther // Semin Immunol. 2012. Vol. 24(3). P. 175–189.

86. Ingraham, B. A. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer / B. A. Ingraham, B. Bragdon, A. Nohe // Curr. Med. Res. Opin. 2008. Vol. 24(1). P. 139–149.

87. Institute of Medicine 2011 Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington, DC : The National Academies Press, 2010.

88. Ishihara, S. Mechano-Signal Transduction in Mesenchymal Stem Cells Induces Prosaposin Secretion to Drive the Proliferation of Breast Cancer Cells / S. Ishihara, D. R. Inman, W. J. Li [et al.] // Cancer Res. 2017. Vol. 77(22). P. 6179–6189.

89. Jeon, S. M. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer / S. M. Jeon, E. A. Shin // Experimental & Molecular Medicine. 2018. Vol. 50, № 4(20). P. 1-14.

90. John, E. M. Vitamin D and breast cancer risk: NHASHES I Epidemiologic follow-up study / E. M. John, G. G. Schwartz, D. M. Dreon [et al.] // *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999. № 8(5). P. 399–406.
91. Kang, Y. Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair / Y. Kang, H. M. Cheong, J. H. Lee [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* 2011. Vol. 404(1). P. 476–481.
92. Khan, Q. J. The relationship between vitamin D and breast cancer incidence and natural history / Q. J. Khan, B. F. Kimler, C. J. Fabian // *Curr. Oncol. Rep.* 2010. Vol. 12(2). P. 136–142.
93. Khodzhaeva D. I. Modern approaches to oropharyngeal cancer therapy / D. I. Khodzhaeva // *International Journal of Discoveries and Innovations in Applied Sciences.* 2021. Vol. 1, № 3. P. 38–39.
94. Kim, I. Clinical significance of age at the time of diagnosis among young breast cancer patients / I. Kim, S. Park, H. Hwang [et al.] // *J Breast Cancer.* 2011. Vol. 14 (4). P. 314–321
95. La Puente-Yagüe, M. Vitamin D: and its role in breast cancer de / M. La Puente-Yagüe, M. A. Cuadrado-Cenzual, M. J. Ciudad-Cabañas [et al.] // *Kaohsiung J Med Sci.* 2018 Vol. 34(8). P. 423–427.
96. Laaksi, I. An associ, ation of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men / I. Laaksi, J. P. Ruohola, P. Tuohimaa [et al.] // *Am J Clin Nutr.* 2007 Vol. 86. P. 714–717.
97. Lear, J. T. Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphisms influence tumour numbers and accrual / J. T. Lear, A. H. Heagerty, A. Smith [et al.] // *Carcinogenesis.* 1996. Vol. 17(9). P. 1891–1896.
98. Lee, J. E. Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: the physicians' health study and a meta-analysis of prospective studies / J. E. Lee, H. Li, A. T. Chan [et al.] // *Cancer Prev Res (Phila).* 2011. Vol. 4(5). P. 735–743.

99. Li, C. Genetic variants of the vitamin D receptor gene alter risk of cutaneous melanoma / C. Li, Z. Liu, Z. Zhang [et al.] // *J Invest Dermatol.* 2007. Vol. 127(2). P. 276–280.
100. Liu, C. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism / C. Liu, Y. Li, M. Semenov [et al.] // *Cell.* 2002. Vol. 108(6). P. 837–847.
101. Lopes, N. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions / N. Lopes, B. Sousa, D. Martins [et al.] // *BMC Cancer.* 2010. Vol. 10. P. 483.
102. Lopes, N. Vitamin D and the mammary gland: a review on its role in normal development and breast cancer / N. Lopes, J. Paredes, L. J. Costa [et al.] // *Breast. Cancer Research.* 2012. № 14. P. 211–218.
103. Lowe, L. C. Plasma 25-hydroxy-vitamin D concentration, vitamin D receptor genotypes and breast cancer risk in UK Caucasian population / L. C. Lowe, M. Guy, J. L. Mansi [et al.] // *Eur. J. Cancer.* 2005. № 41. P. 1164–1169.
104. Lundqvist, J. Williams syndrome transcription factor (WSTF) acts as an activator of estrogen receptor signaling in breast cancer cells and the effect can be abrogated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) / J. Lundqvist, T. Kirkegaard, A. V. Laenkholm // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2017. Vol. 177. P. 171–178.
105. Lykkesfeldt, A. E. Aurora kinase A as a possible marker of endocrine in early estrogen receptor for breast cancer / A. E. Lykkesfeldt, B. R. Iversen, M. B. Jensen [et al.] // *Acta Oncol.* 2018;5. Vol. 7(1). P. 67–73.
106. Maalmi, J. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: Systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies / J. Maalmi, M. Ordonez-Mena, B. Schottker [et al.] // *European. J. of Cancer.* 2014. Vol. 50. P. 1510–1552.
107. Martineau, A. R. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: individual participant data meta-analysis / A. R. Martineau,

D. A. Jolliffe, L. Greenberg [et al.] // Health Technol Assess. 2019. Vol. 23(2). P. 1–44.

108. Martinez, M. E. Calcium, vitamin D, and risk of adenoma recurrence (United States) / M. E. Martinez, J. R. Marshall, R. Sampliner [et al.] // Cancer Causes Control. 2002. Vol. 13(3). P. 213–220.

109. Mehta, R. G. Vitamin D and breast cancer: emerging concepts / R. G. Mehta, X. Peng, F. Alimirah [et al.] // Cancer letters. 2013. Vol. 334. P. 95–100.

110. Mok, C. W. Evolution of minimal access breast surgery / C. W. Mok, H. W. Lai // Gland surgery. 2019. Vol. 8(6). P. 784–793.

111. Nagpal, S. Noncalcemic Actions of Vitamin D / S. Nagpal, N. Songqing, R. Radhakrishnan // Receptor Ligands Full Text Endocrine Reviews. 2005. Vol. 5. P. 662–687.

112. Narvaez, C. J. The impact of vitamin D in breast cancer: genomics, pathways, metabolism / C. J. Narvaez, D. Matthews, E. La Porta [et al.] // Frontiers in Physiology. 2014. Vol. 5, № 213. P. 2–10.

113. Nebbioso, M. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on eye disorders: A critical review / M. Nebbioso, G. Buomprisco, A. Pascarella [et al.] // Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 2017. Vol. 57(3). P. 559–565.

114. Ng, K. Circulating 25-hydroxyvitamin d levels and survival in patients with colorectal cancer / K. Ng, J. A. Meyerhardt, K. Wu [et al.] // J Clin Oncol. 2008. Vol. 26(18). P. 2984–2991.

115. Osanai, M. CYP24A1-induced vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth / M. Osanai, G. H. Lee // Oncol. Rep. 2016. Vol. 36(5). P. 2755–2762.

116. Oskoei, V. K. Assessment of functional variants and expression of long noncoding RNAs in vitamin D receptor signaling in breast cancer / V. K. Oskoei, L. Geranpayeh, M. D. Omrani [et al.] // Cancer Management and Research. 2018. Vol. 10. P. 3451–3462.

117. Parker, J. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis / J. Parker, O. Hashmi, D. Dutton, A. Mavrodaris // *Maturitas*. 2010. Vol. 65(3). P. 225–236.
118. Partridge, A. H. Second international consensus guidelines for breast cancer in young women (BCY2) / A. H. Partridge, S. Paluch-Shimon, O. Pagani [et al.] // *The Breast*. 2016. Vol. 26. P. 87–99.
119. Pedram, A. DHHC-7 and -21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors / A. Pedram, M. Razandi, R. J. Deschenes, E. R. Levin // *Mol Biol Cell*. 2012. Vol. 23(1). P. 188–199.
120. Pérez-López, F. R. Review article: vitamin D acquisition and breast cancer risk / F. R. Pérez-López, P. Chedraui, J. Haya // *Reprod. Sci.* 2009. Vol. 16(1). P. 7–19.
121. Peters, U. Circulating vitamin D metabolites, polymorphism in vitamin D receptor, and colorectal adenoma risk / U. Peters, R. B. Hayes, N. Chatterjee [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004. Vol. 13(4). P. 546–552.
122. Petrelli, J. M. Body mass index, height, and postmenopausal breast cancer mortality in a prospective cohort of US women / J. M. Petrelli, E. E. Calle, C. Rodriguez, M. J. Thun // *Cancer Causes and Control*. 2002. Vol. 13, № 4. P. 325–332.
123. Petroni, P. Prognostic role of vitamin D status and efficacy of vitamin D supplementation in cancer patients: a systematic review / P. Petroni, C. Buttiglieri, C. Monagheddu [et al.] // *Oncologist*. 2011. Vol. 16 (9). P. 1215–1227.
124. Povaliaeva, A. A. The relationship of vitamin D status with the development and course of diabetes mellitus type 1 / A. A. Povaliaeva, E. A. Pigarova, L.K. Dzeranova, L. Ya. Rozhinskaya // *Obesity and Metabolism*. 2020. Vol. 17(1). P. 82–87.
125. Prietl, B. Vitamin D and immune function / B. Prietl, G. Treiber, T. R. Pieber, K. Amrein // *Nutrients*. 2013. Vol. 5. P. 2502–2521.

126. Protani, M. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis / M. Protani, M. Coory, J. H. Martin // *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010. Vol. 123, № 3. P. 627–635.

127. Raimondi, S. Review and metaanalysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk / S. Raimondi, H. Johansson, P. Maisonneuve [et al.] // *Carcinogenesis*. 2009. Vol. 30. P. 1170–1180.

128. Reichrath, J. Vitamins as hormones // J. Reichrath, B. Lehmann, C. Carlberg [et al.] // *Metab. Res*. 2007. Vol. 39(2). P. 71–84.

129. Rejnmark, L. Reduced pre-diagnostic 25-hydroxyvitamin D levels in women with breast cancer / L. Rejnmark, A. Tietze, P. Vestergaard [et al.] // *Bone*. 2009. Vol. 44. P. 162–167.

130. Ridge, R. J. Partial N-terminal amino acid sequence of the anti-neoplastic urinary protein (ANUP) and the anti-tumour effect of the N-terminal nonapeptide of the unique cytokine present in human granulocytes / R. J. Ridge, N. H. Sloane // *Cytokine*. 1996. Vol. 8(1). P. 1–5.

131. Røksahm, T. E. Serum 25-hydroxyvitamin D levels predict cancer survival: a prospective cohort with measurements prior to and at the time of cancer diagnosis / T. E. Røksahm, S. Tretli, P. A. Torjesen [et al.] // *Clin Epidemiol*. 2019. Vol. 8, № 11. P. 695–705.

132. Scragg, R. Effect of monthly high-dose vitamin D supplementation on cardiovascular disease in the Vitamin D Assessment Study: a randomized clinical trial / R. Scragg, A. W. Stewart, D. Waayer [et al.] // *JAMA Cardiol*. 2017. Vol. 2(6). P. 608–616.

133. Sever, R. Signal transduction in cancer / R. Sever, J. S. Brugge // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015. № 5(4).

134. Sidoni, A. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity / A. Sidoni, A. Cavaliere, G. Bellezza [et al.] // *The Breast*. 2003. Vol. 12(4). P. 247–250.

135. Skaaby, T. Vitamin D, cardiovascular disease and risk factors / T. Skaaby, B. H. Thuesen, A. Linneberg // *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. 2017. Vol. 996. P. 221–230.
136. Sun, G. Expression, purification, and initial characterization of human Yes protein tyrosine kinase from a bacterial expression system / G. Sun, R. J. Budde // *Arch Biochem Biophys*. 1997. Vol. 345(1). P. 135–142.
137. Sun, L. Breast cancer screening programme in China: does one size fit all? A cost-effectiveness analysis based on a Markov model / L. Sun // *The Lancet*. 2018. Vol. 392. P. 2.
138. Swami, S. 1,25-Dihydroxyvitamin D downregulates estrogen receptor abundance and suppress estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells / S. Swami, A. V. Kishnan, D. Feldman // *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6(8). P. 3371–3379.
139. Tang, C. Fok I Polymorphism of vitamin D receptor gene contributes to breast cancer susceptibility: a meta-analysis / C. Tang, N. Chen, M. Wu [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* 2009. Vol. 117. P. 391–399.
140. Thomas, S. J. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours / S. J. Thomas, J. A. Snowden, M. P. Zeidler, S. J. Danson // *Br J Cancer*. 2015. Vol. 113(3). P. 365–371.
141. Tokunaga, E. Impact of serum vitamin D on the response and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy / E. Tokunaga, T. Masuda, M. Okamoto [et al.] // *Breast Cancer*. 2022. Vol. 29, №. 1. P. 156–163.
142. Torshin, I. Yu. On the theoretical basis of metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification / I. Yu. Torshin, K. V. Rudakov // *Pattern Recognit Image Anal.* 2015. Vol. 25. P. 577–587.
143. Torshin, I. Yu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine / I. Yu. Torshin // *Bioinformatics in the Post-Genomic Era series* / ed. by O. A. Gromova. NY, USA, 2009.
144. Torshin, I. Yu. Topological chemograph analysis theory as a promising approach to simulation modeling of quantum-mechanical properties of molecules.

Part II: Quantum-chemical interpretations of chemograph theory / I. Yu. Torshin, K. V. Rudakov // Pattern Recognition and Image Analysis. 2022. Vol. 32, № 1. P. 205–217.

145. Touvier, M. Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, and colorectal cancer risk / M. Touvier, D. S. Chan, R. Lau [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011. Vol. 20(5). P. 1003–1016.

146. Townsend, K. Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue / K. Townsend, C. M. Banwell, M. Guy [et al.] // Clin Cancer Res. 2010. Vol. 11. P. 3579–3586.

147. Trabert, B. Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk in a large population-based case-control study of Caucasian and African-American women / B. Trabert, K. E. Malone, J. R. Daling [et al.] // Breast Cancer Res. 2007. Vol. 9(6). P. 84.

148. Vanoirbeek, E. PDLIM2 expression is driven by vitamin D and is involved in the pro-adhesion, and anti-migration and -invasion activity of vitamin D / E. Vanoirbeek, G. Eelen, L. Verlinden // Oncogene. 2014. Vol. 33(15). – P. 1904–1911.

149. Vitamin D and health report. The Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) recommendations on vitamin D. Public Health England, 2016. P. 289

150. Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force / M. Chung, J. Lee, T. Terasawa [et al.] // Ann Intern Med. 2011. Vol. 155(12). P. 827–838.

151. Wang, D. Serum 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk: a meta-analysis of prospective studies / D. Wang, O. I. Velez de-la-Paz, J. X. Zhai, D. W. Liu // Tumour Biol. 2013. Vol. 34(6). P. 3509–3517.

152. Wang, T. J. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genomewide association study / T. J. Wang, F. Zhang, J. B. Richards [et al.] // *Lancet*. 2010. Vol. 376 (9736). P. 180–188.
153. Wang, T. T. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression / T. T. Wang, F. P. Nestel, V. Bourdeau [et al.] // *J Immunol*. 2004. Vol. 173. P. 2909–2912.
154. Weitsman, G. E. Vitamin D enhances caspasedependent and -independent TNF α -induced breast cancer cell death: The role of reactive oxygen species and mitochondria / G. E. Weitsman, A. Ravid, U. A. Liberman [et al.] // *Int J Cancer*. 2003. Vol. 106. P. 178–186.
155. Welsh, J. Function of the vitamin D endocrine system in mammary gland and breastcancer / J. Welsh // *Mol Cell Endocrinol*. 2017. Vol. 453. P. 1–2.
156. Westerdahl, J. Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity / J. Westerdahl, C. Ingvar, A. Masback [et al.] // *Br. J. Cancer*. 2000. Vol. 82(9). P. 1593–1599.
157. Williams, M. J. Measuring clonal evolution in cancer with genomics / M. J. Williams, A. Sottoriva, T. A. Graham // *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2019. Vol. 20. P. 309–329.
158. Willis, D. M. Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex / D. M. Willis, A. P. Loewy, N. Charlton-Kachigian [et al.] // *J Biol Chem*. 2002. Vol. 277(40). P. 37280–37291.
159. Wu, K. A nested case control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer / K. Wu, D. Feskanich, C. S. Fuchs [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst*. 2007. Vol. 99(14). P. 1120–1129.
160. Wulaningsih, W. Serum calcium and the risk of breast cancer: findings from the Swedish AMORIS study and a meta-analysis of prospective studies / W. Wulaningsih, H. K. Sagoo, M. Hamza [et al.] // *Int J Mol Sci* 2016. Vol. 17. P. 1487.

161. Yaghjyan, L. Vitamin D and mammographic breast density: a systematic review / L. Yaghjyan, G. A. Colditz, B. Drake // *Cancer Causes Control*. 2012. Vol. 23 (1). P. 1–13.
162. Yagi, K. Assay for lipoperoxide in blood serum / K. Yagi, I. Nishigaki, H. Ohama // *Vitamins Jpn*. 1968. Vol. 37. P. 105–112.
163. Yamashita, A. Protective role of the endoplasmic reticulum protein mitsugumin23 against ultraviolet C-induced cell death / A. Yamashita, T. Taniwaki, Y. Kaikoi, T. Yamazaki // *FEBS Lett*. 2013. Vol. 587(9). P. 1299–1303.
164. Yang, A. Identification of Recent Trends in Research on Vitamin D: A Quantitative and Co-Word Analysis / A. Yang, Q. Lv, F. Chen [et al.] // *Med Sci Monit*. 2019. Vol. 25. P. 643–655.
165. Yee, Y. K. Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer / Y. K. Yee, S. R. Chintalacharuvu, J. Lu, S. Nagpal // *Mini Rev Med Chem*. 2005. Vol. 5(8). P. 761–778.
166. Yin, L. Meta-analysis: Serum vitamin D and colorectal adenoma risk / L. Yin, N. Grandi, E. Raum [et al.] // *Prev Med*. 2011. Vol. 53(1-2). P. 10–16.
167. Zendehdel, M. Subtypes of benign breast diseases as a risk factor for breast cancer: a systematic review and meta-analysis protocol / M. Zendehdel, B. Niakan, K. Abbasaly [et al.] // *Iran J of Med Sci*. 2018. Vol. 43(1). P. 1–8.
168. Zhang, J. Protein phosphatase 5 is required for ATR-mediated checkpoint activation / J. Zhang, S. Bao, R. Furumai [et al.] // *Mol Cell Biol*. 2005. Vol. 25(22). P. 9910–9919.
169. Zhang, R. RXR α provokes tumor suppression through p53/p21/p16 and PI3K-AKT signaling pathways during stem cell differentiation and in cancer cells / R. Zhang, H. Li, S. Zhang [et al.] // *Cell Death Dis*. 2018. Vol. 9(5). P. 532.
170. Zhang, Y. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel / Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie // *Comput Methods Programs Biomed*. 2010. Vol. 99(3). P. 306–309.

171. Zhang, Z. Probably Benign lesions at screening Breast Us in a Population with elevated risk: Prevalence and Rate of Malignancy in the ACRIN 6666 / Z. Zhang, G. Richard, B. Jean [et al.] // Trial. Radiology. 2013. Vol. 269 (3). P. 701–712.

172. Zinser, G. Vitamin D(3) receptor ablation alters mammary gland morphogenesis / G. Zinser, K. Packman, J. Welsh // Development. 2002. Vol. 129. P. 3067–3076.