

## **АННОТАЦИЯ**

**диссертационной работы Кукановой Асии Маратовны на тему: «Подавление KRAS мутации колоректального рака при помощи воздействия оксидативного стресса у больных после хирургического лечения», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 8D10102 – Медицина**

### **Актуальность исследования**

По данным ВОЗ, колоректальный рак (КРР) занимает третье место в структуре онкозаболеваемости и второе место по онкосмертности по всему миру и является одной из глобальных проблем мирового здравоохранения. В 2020 году новых случаев заболеваемости колоректальным раком составила 1931590 случаев, а смертность 935173 случая (9,4%) (GLOBOCAN 2020). Согласно статистическим данным КазНИИОР за 2019-2020 гг. ситуация по колоректальному раку в Казахстане выглядит также как и во всем мире. КРР занимает 3 место в структуре онкопатологии, как по заболеваемости, так и по смертности. (Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2023 г., КазНИИОР).

Стандартными видами лечения КРР являются – хирургическое лечение, химиотерапия в моно- или полирежиме. В последние годы для лечения диссеминированных форм применяются таргетные препараты направленного действия на молекулы-мишени в опухолевых клетках. Использование таргетной терапии позволило в отдельных случаях добиться увеличения выживаемости пациентов с метастатическим КРР. Режимы FOLFIRI/FOLFOX или CAPIRI/CAPOX по-прежнему являются основой для химиотерапии КРР. Таргетные препараты, такие как ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста и сосудистого эндотелиального фактора роста, входят в комбинированные схемы лечения на основе химиотерапевтических режимов и представляются перспективными с точки зрения эффективности и безопасности (Андреев Д.А., Завьялов А.А., Кокушкин К.А., Давыдовская М.В., 2018г.).

Определение статуса мутаций в генах KRAS и NRAS является необходимым требованием в лечении пациентов с КРР. Пациенты с определенными мутациями в генах KRAS и NRAS являются резистентными к терапии анти-EGFR-препаратами и имеют медиану выживаемости ниже, чем при WT (wild type) генотипах, что говорит о негативном прогнозе в случае наличия мутаций. Наличие мутантного аллеля в одном из этих генов говорит о неблагоприятных прогнозах для пациента и нечувствительности к анти-EGFR-терапии. В настоящий момент не существует официально зарегистрированного препарата, ингибирующего ГТФазы Ras (Бровкина О.И., Никитин А.Г. М, 2020г.). В ходе экспериментальных исследований было отмечено, что культивируемые клетки КРР человека, содержащие мутации KRAS или BRAF, избирательно погибают при воздействии высоких уровней витамина С. Этот эффект обусловлен повышенным поглощением окисленной

формы витамина С, дегидроаскорбата (ДГА), через транспортер глюкозы GLUT1. Повышенное поглощение ДГА вызывает окислительный стресс, поскольку внутриклеточная ДГК снижается до витамина С, истощая глутатион. Таким образом, активные формы кислорода накапливаются и инактивируют глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Ингибирование GAPDH в высокогликолитических клетках-мутантах KRAS или BRAF приводит к энергетическому кризису и гибели клеток, которые не наблюдаются в клетках дикого типа KRAS и BRAF (Jihye Yun, и соавтр., 2015г.).

Данные этих исследований позволяют обосновать дальнейшее изучение влияния высоких доз ДГА на KRAS-мутантные клетки КРР с целью улучшения терапевтического ответа.

**Цель исследования:**

Разработка терапии лечения колоректального рака посредством комбинации окислительных препаратов, нацеленных на kras мутантные раковые клетки.

**Объект исследования:**

Больные с диагнозом колоректальный рак I, II, III, IV стадии, имеющие подтвержденный статус мутации KRAS.

**Предмет исследования:**

Мутация KRAS у больных с колоректальным раком после хирургического лечения.

**Задачи исследования:**

1. Изучить взаимосвязь между типами мутаций и распространенностью процесса.
2. Изучить взаимосвязь между типами мутаций и ответом на лечение.
3. Определение цитотоксической генерации АФК при воздействии комбинации окисляющих препаратов на KRAS мутантные раковые клетки.
4. Определение типов колоректального рака, чувствительных к комбинации окислительных препаратов.
5. Разработка рекомендаций по применению и комбинированию окислительных препаратов согласно типу колоректального рака.

**Научная новизна:**

Определены прогностические факторы, обуславливающие правостороннюю локализацию мутации KRAS «дикого типа» и левостороннюю локализацию мутации KRAS G12D, G13D, которые влияют на распространенность и агрессивность заболевания.

Впервые проведены экспериментальные биохимические исследования митохондриально-зависимой продукции АФК, индуцированной комбинацией окислительных препаратов АТО/D-VC, D-VC, АТО/L-VC и L-VC в KRAS мутантных клетках колоректального рака и произведено регулирование метода детекции АФК. Комбинация АТО и D-VC показала высокую эффективность, вызывая гибель до 80% KRAS мутантных клеток через 48 часов и значительное увеличение окислительного стресса.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Комбинация препаратов АТО и D-VC действует, вызывая митохондриальную генерацию АФК и цитотоксический окислительный стресс KRAS мутантных раковых клеток.

2. Комбинация препаратов АТО/D-VC эффективен в подавлении опухолевого роста мутантных опухолей KRAS G12D.

### **Практическая значимость:**

Разработана комбинация окислительных препаратов АТО/D-VC для супрессии KRAS-мутантных клеток колоректального рака.

Наши результаты указывают на терапевтический потенциал для разработки нового типа противоопухолевой терапии и выход на клинические исследования.

Научный проект №0122РК00015 от 16 октября 2023 года «Разработка противораковой терапии путем индуцированного глюкозозависимого цитотоксического окислительного стресса». Клиническое исследование I и II фазы на базе КазНИИОиР

### **Выводы**

1. Мутация KRAS G12D характерна для правостороннего рака толстой кишки, чаще чем «дикий тип» имеет низкую дифференцировку ( $\chi^2=22,8$ ,  $p < 0,001$ ), характеризуется более длительным периодом госпитализации 16 дней [IQR, 14,00;32,00] ( $p = 0,007$ ), средняя медиана выживаемости 411 дней [IQR, 324,00; 583,00] ( $p < 0,001$ ) и безрецидивность 467 дней [IQR, 301,00; 842,00] ( $p = 0,018$ ). В то время как KRAS WT встречался при левосторонней локализации рака толстой кишки и при раке прямой кишки, характеризовался умеренной и высокой дифференцировкой, средняя медиана выживаемости составила 1004 дня [IQR, 749,00; 1069,00] ( $p < 0,001$ ) и безрецидивность 627 дней [IQR, 456,00; 1039,50] ( $p = 0,018$ ).

2. При правостороннем раке толстой кишки отмечаются снижение индекса Гаркави до 0,24 ( $p = 0,003$ ), что свидетельствует о неполноценном иммунном ответе при воспалительном процессе. Индекса иммунореактивности снижен при всех локализациях колоректального рака ( $p = 0,003$ ), индекса агрунолоцита и СОЭ также был снижен при правостороннем раке толстой кишки до 0,72 ( $p = 0,002$ ). В то время как при левостороннем раке толстой кишки и прямой кишки был снижен лейкоцитарный индекс интоксикации по Островскому до 0,3 и 0,34 соответственно ( $p < 0,001$ ).

3. Комбинация 5 мкМ АТО и 1 мМ D-VC вызвала гибель 70% KRAS мутантных раковых клеток АК 192 через 24 ч и 80% через 48 ч. 70% и 90% апоптотических клеток наблюдались после комбинированной обработки 5 мкМ АТО и 1 мМ D-VC через 24 и 48 ч соответственно. АТО/D-VC вызвала 7,3- и 7-кратное увеличение митохондриальных АФК (mtROS) через 24 и 48 часов соответственно по сравнению с контролем. Это указывает на то, что комбинация АТО/D-VC более эффективна для индукции апоптоза клеток.

4. Экспериментально доказано, что KRAS-мутантные клетки аденокарциномы обладают различной чувствительностью к комбинации АТО/D-VC. Наиболее агрессивные опухолевые линии клеток АК 192 с

мутацией KRAS G12D показали выраженную чувствительность к данной комбинации, что подтверждает возможность использования окислительного стресса в терапии конкретных подтипов опухолей.

5. Евразийский патент (Приложение К) описывает комбинацию АТО и D-VC для лечения злокачественных опухолей с мутациями KRAS, вызывая цитотоксический оксидативный стресс. D-VC эффективен для индукции стресса в клетках с мутантным KRAS, а в сочетании с триоксидом мышьяка (АТО) значительно усиливает его действие. Исследование показало, что комбинация АТО/D-VC более эффективна в подавлении роста опухолей. Эта комбинация вызывает сильный окислительный стресс и гибель клеток с мутацией KRAS *in vivo*. Модель с ксенотрансплантатом мышей с клеточными линиями KRAS AK192 (G12D) и HCT116 показала положительный ответ и эффективность на лечение (средний вес опухоли был ниже в 3,57 и 3,4 раза по сравнению с контрольной группой соответственно). Изобретение имеет перспективы применения в медицинской практике.

#### **Апробация диссертации**

Основные результаты исследования и положения диссертации доложены и обсуждены на:

– 13-ом Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, 27-29 апреля 2022г., онлайн.

- Международной конференции Центра наук о жизни «Modern perspectives for biomedical sciences», 20-21 октября 2022г., Астана, Казахстан.

- Международной научно-практической конференции «Онкологияға инновациялық технологияларды енгізудің тәжірибесі мен болашағы», 27-28 октября 2022г., Астана, Казахстан.

- Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Наука и молодежь: открытия и перспективы», 12-13 апреля 2023г., Астана, Казахстан.

- Международной научно-практической конференции «Замануи онкологияның инновациялары және жетістіктері, өзекті мәселелері», 23-24 ноября 2023г., Астана, Казахстан.

- 14-ом Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, посвященный 30-летию АДИОР СНГ и Евразии, 25-27 апреля 2024г., Душанбе, Таджикистан.

– Расширенном заседании кафедры онкологии НАО «Медицинский университет Астана», 26 июня 2024г.

#### **Публикации по теме диссертации**

По результатам диссертационного исследования были опубликованы 15 работ, из них 1 в периодическом издании, рекомендуемые Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, 2 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых в международных базах данных (Scopus), 10 публикаций в материалах международных и республиканских конференций (Казахстан, Россия, Таджикистан), 1 статья в российском

журнале Онкология и хирургия, 1 статья в Eurasian Journal of Applied Biotechnology.

Получено 2 свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемых авторским правом (Приложение А,Б), 3 акта внедрения в «Многопрофильный медицинский центр» акимата г. Астана (Приложение В,Г,Д), и 1 акт внедрения в учебный процесс по дисциплине «Онкология» и «Онкология в стационаре» НАО «Медицинский университет Астана» (Приложение Е).

#### **Личный вклад диссертанта**

Работа выполнена в соответствии с направлением развития науки в области «Науки о жизни и здоровье» утвержденным Высшей научно-технической комиссией при Правительстве Республики Казахстан.

Диссертант самостоятельно проводил сбор клинического материала, брал информированное согласие на участие в проекте, сбор и анализ историй болезни и динамическое наблюдение больных с колоректальным раком.

Диссертант самостоятельно проводил сбор послеоперационного материала, занимался транспортировкой материала, участвовал в разработке моделей ксенографтов, проводил инъекции исследуемых мышей, занимался вскрытием, забором крови и анализов мышей.

Диссертант самостоятельно анализировал и обобщал полученные результаты исследования, проводил статистическую обработку данных.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация написана на русском языке, изложена на 132 страницах печатного компьютерного текста, включающая титульный лист, содержание, нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, основную часть, заключение, выводы, практические рекомендации и список использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 47 рисунками и 29 таблицами. Список использованной литературы состоит из 90 источников.