

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК 616.345-006.6:577.1:575.224.22-089

На правах рукописи

**КУКАНОВА АСИЯ МАРАТОВНА**

**Подавление KRAS мутации колоректального рака при помощи  
воздействия оксидативного стресса у больных после хирургического  
лечения**

8D10102 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии PhD

Научный руководитель:  
д.м.н., профессор Макишев А.К.

Научный консультант:  
PhD, профессор Дос Сарбасов

Зарубежный консультант:  
PhD Мурат Сапарбаев

Республика Казахстан  
Астана, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b> .....	4
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b> .....	5
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b> .....	7
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>1 КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК: ЭПИДЕМИОЛОГИЯ В КАЗАХСТАНЕ И МИРЕ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ kras МУТАЦИИ, РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ОНКОГЕНЕЗЕ, СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	13
1.1 Эпидемиология колоректального рака в мире и в Казахстане.....	13
1.2 Молекулярные механизмы мутации kras.....	19
1.3 Роль мутации kras в онкогенезе колоректального рака.....	21
1.4 Роль оксидативного стресса в онкогенезе колоректального рака.....	22
1.5 Хирургические методы лечения колоректального рака.....	23
1.6 Химиотерапия и таргентная терапия колоректального рака.....	24
1.7 Иммунотерапия колоректального рака.....	25
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	27
2.1 Культура клеток и клеточные линии.....	27
2.2 Выделение и культивирование раковых клеток.....	27
2.3 Лабораторные животные.....	28
2.4 Лекарственные препараты.....	28
2.5 Метод определения уровня продукции митохондриальных АФК (мтАФК).....	28
2.6 Определение тиол-реактивные белки ЕТС, опосредующие образование цитотоксических АФК в раковых клетках с мутацией KRAS.....	29
2.7 Метод геномного исследования.....	29
2.8 Метод создания ксенографических моделей.....	30
2.9 Метод последовательного воздействия АТО / D-VC.....	30
2.10 Гистологический метод.....	31
2.11 Статистический анализ.....	31
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....	42
3.1 Клинико-эпидемиологические характеристика больных КРР.....	42
3.2 Определение цитотоксической генерации АФК при воздействии комбинации окисляющих препаратов АТО/D-VC на KRAS мутантные раковые клетки.....	80

3.3.1	Определение типов аденокарциномы KRAS мутантных клеток, чувствительных к комбинации окислительных препаратов АТО/D-VC на животных моделях.....	85
3.3.2	Определение типов клеток аденокарциномы с KRAS мутацией человека, чувствительных к комбинации препаратов АТО/D-VC...	87
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	96
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	98
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А</b> – Свидетельство авторского права .....	105
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Б</b> – Свидетельство авторского права .....	106
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ В</b> – Акты внедрения.....	107
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Г</b> – Акты внедрения.....	108
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Д</b> – Акты внедрения.....	109
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Е</b> – Акты внедрения.....	110
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ Ж</b> – Заключение Локального Биоэтического Комитета НАО «МУА» .....	111
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ З</b> - Форма информированного согласия на молекулярно-генетическое исследование.....	112
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ И</b> - Форма информированного согласия на участие в клиническом исследовании.....	114
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ К</b> - Евразийский патент на изобретение № 044080.....	115

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Злокачественное новообразование ободочной кишки: клинический протокол диагностики и лечения: утв. Экспертной комиссией Министерства Здравоохранения Республики Казахстан 01 июля 2022 года, №164.

Злокачественное новообразование прямой кишки: клинический протокол диагностики и лечения: утв. Экспертной комиссией Министерства Здравоохранения Республики Казахстан 01 июля 2022 года, №164.

Консенсусные рекомендации европейского общества медицинской онкологии (ESMO) по ведению больных коло ректальным раком. *Annals of Oncology* 2023;34(1):10-32 и (2017) 28 (suppl 4): iv22–iv40.

Постановление Правительства Республики Казахстан «Об утверждении Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2026 года» от 24 ноября 2022 года № 945.

Постановление Правительства Республики Казахстан «Об утверждении Комплексного плана по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике Казахстан на 2023 – 2027 годы» от 5 октября 2023 года № 874.

Этические принципы проведения исследований в медицине с участием человека: Хельсинкская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации (ВМА): утв. на 18-й Генеральной Ассамблее ВМА (06.1964 г., Хельсинки, Финляндия; крайние изменения внесены 10.2013 г. Форталеза, Бразилия на 64-й Генеральной Ассамблее ВМА.

ГОСТ 7.1–2003 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.12–93 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.54–88. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования.

Положение о докторантуре ПЛ-МУА-120-23 №16 от 26 июня 2023 г.

Рабочая инструкция «Требования к содержанию и оформлению phd докторской диссертации» РИ-МУА-48-20 от 31 января 2020г.

Приказ «Об утверждении Правил государственной регистрации диссертаций, защищенных на соискание ученой степени доктора философии (PhD), доктора по профилю» Министра образования и науки Республики Казахстан от 19 мая 2011 года № 203. Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 16 июня 2011 года № 7014.

Государственный стандарт Республики Казахстан «Надлежащая клиническая практика» (Good Clinical Practice, GCP): СТ РК 1616-2006



## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

**Адьювантная химиотерапия** – лекарственная терапия, направленная на уничтожение отдаленных микрометастазов после радикального хирургического лечения с целью увеличения безрецидивной и общей выживаемости.

**Выживаемая частота** – доля выживших в группе, например, в изучаемой группе больных в течение периода времени.

**Гемиколэктомия** – резекция правой или левой половины ободочной кишки.

**Каплана-Мейера оценка** – непараметрический метод составления таблиц смертности или выживаемости.

**Колоректальный рак** – собирательное понятие, объединяющее злокачественные новообразования ободочной и прямой кишок.

**Мета-Анализ** - статистический синтез данных из разных, но подобных, т.е. сопоставимых исследований, итог которого – количественная оценка обобщенных результатов.

**Рецидив рака** – возобновление клинических проявлений заболевания после их временного исчезновения.

**Фактор риска** – признак или экспозиция, повышающие вероятность заболевания или иного конкретного исхода.

**CAPIRI** – это режим химиотерапии, используемый для лечения колоректального рака. Он состоит из комбинации двух основных препаратов: Capecitabine (CAP) – пероральный предшественник 5-фторурацила (5-FU), который ингибирует синтез ДНК и подавляет рост опухолевых клеток.

**CAPOX (XELOX)** – это схема химиотерапии, используемая при колоректальном раке и некоторых других видах опухолей. Она включает два основных препарата: Capecitabine (CAP) – пероральный фторпиримидин, предшественник 5-фторурацила (5-FU), который ингибирует синтез ДНК и препятствует делению опухолевых клеток.

Oxaliplatin (OX) – платиновый препарат, нарушающий структуру ДНК и вызывающий апоптоз раковых клеток.

Irinotecan (IRI) – ингибитор топоизомеразы I, который предотвращает репликацию ДНК и вызывает гибель раковых клеток.

**FOLFOX** — это общепринятый в онкологии акроним для одного из режимов химиотерапии, применяемых при лечении колоректального рака. Режим FOLFOX состоит из: Фолиниевой кислоты в виде фолината кальция (лейковорина) — (FOL)inic acid, calcium salt; Фторурацила — (F)luorouracil; Оксалиплатина — (OX)aliplatin.

**FOLFIRI** — это общепринятый в онкологии акроним для одного из режимов химиотерапии, применяемых в качестве второй линии лекарственной терапии колоректального рака и рака желудка. Режим FOLFIRI состоит из: Фолиниевой кислоты в виде фолината кальция (лейковорина) — (FOL)inic acid, calcium salt; Фторурацила — (F)luorouracil — антиметаболита, антагониста пиримидинов; Иринотекана — (IRI)notecan — ингибитора топоизомеразы.

**GTPase** — это большое семейство ферментов-гидролаз, которые связывают нуклеотид гуанозинтрифосфат (GTP) и гидролизуют его до гуанозиндифосфата (GDP)

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Абс	–	Абсолютное количество
АФК	–	активные формы кислорода показатель окислительного стресса
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ДИ	–	Доверительный интервал
ЖКТ	–	Желудочно-кишечный тракт
ЗН	–	Злокачественное новообразование
КазНИИОиР	–	Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии
КДУ	–	Консультативно диагностические услуги
КРР	–	Колоректальный рак
ПМСП	–	Первичная медико-санитарная помощь
РК	–	Республика Казахстан
СОЭ	–	Скорость оседания эритроцитов
СО	–	Систематический обзор
Соавт.	–	соавторы
Утв.	–	Утверждено
ФКС	–	Фиброколоноскопия
АТО	–	триоксид мышьяка
BRAF	–	Серин/треониновая протеинкиназа B-raf; англ. Serine/threonine-protein kinase B-raf
DMEM	–	Dulbecco's Modified Eagle's medium (модифицированная среда Дульбекко)
FBS	–	Fetal bovine serum (Фетальная бычья сыворотка)
DHA	–	Докозагексаеновая кислота, англ. docosahexaenoic acid
D-VC	–	изомер D витамина С
ESMO	–	Европейское общество медицинской онкологии
EGFR	–	Эпидермальный фактор роста
GAPDH	–	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT1	–	глюкозный транспортёр тип 1
KRAS	–	Белок крысиной саркомы Кирстена
DHA	–	дегидроаскорбиновой кислоты
HR	–	Отношение рисков (hazard ratio)
M	–	Среднее
Me	–	Медиана
NRAS	–	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
PBS	–	фосфатно-солевой буфер
Q2; Q4	–	25-й и 75-й квартили
ROS	–	активные формы кислорода показатель окислительного стресса
RR	–	Относительный риск
SD	–	Среднеквадратическое отклонение



SE	–	Стандартная ошибка (standard error)
TNM	–	Tumor/ Nodus/ Metastasis
WT	–	«Дикий тип»

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы:**

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%) [1,2]. 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 [3].

Стандартные методы лечения рака прямой кишки включают хирургическое вмешательство и одно- или многокомпонентную химиотерапию. В последние годы для лечения распространенных форм рака используются таргетные препараты, воздействующие на целевые молекулы в опухолевых клетках. В некоторых случаях применение таргетной терапии увеличило выживаемость пациентов с метастатическим раком толстой кишки. Схемы FOLFIRI/FOLFOX или CAPIRI/CAPOX остаются основой химиотерапии колоректального рака. Такие целевые препараты, как ингибиторы рецепторов эпидермального фактора роста и рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста, включаются в комбинированные схемы лечения на основе протоколов химиотерапии и кажутся многообещающими с точки зрения эффективности и безопасности [4-10].

Определение статуса мутации генов KRAS и NRAS имеет важное значение при лечении пациентов с колоректальным раком. Пациенты, несущие определенные мутации в генах KRAS и NRAS, устойчивы к терапии EGFR и имеют более низкую медианную выживаемость, чем пациенты с генотипом WT (дикий тип), что предполагает отрицательный прогноз при наличии мутаций. Наличие мутантного аллеля в одном из этих генов указывает на неблагоприятный прогноз для пациента и нечувствительность к анти-EGFR терапии. В настоящее время официально зарегистрированных препаратов, ингибирующих Ras GTPase, нет [11]. Экспериментальные исследования показали, что культивируемые клетки человеческого рака, несущие мутации KRAS или BRAF, избирательно погибают при воздействии высоких концентраций витамина С. Этот эффект обусловлен повышенным усвоением окисленной формы витамина С, дегидроаскорбата (DHA), через транспортер глюкозы GLUT1. Повышенное усвоение DHA вызывает окислительный стресс, поскольку внутриклеточный DHA восстанавливается до витамина С, тем самым истощая запасы глутатиона. В результате активные формы кислорода накапливаются и инактивируют глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Ингибирование GAPDH в высокогликолитических мутантных клетках KRAS или BRAF приводило к энергетическому кризису и гибели клеток, чего не наблюдалось в клетках KRAS и BRAF дикого типа [12]. Данные этих исследований позволяют обосновать дальнейшее изучение влияния высоких доз

ДНА 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 (Т3, Т4а, Т4b, N1, N2, N3, M0, M1) 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, что 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.

**Практическая значимость:**

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

### **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.

### **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 «Заманауи 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, индексированных 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).

### **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 46 рисунками и 29 таблицами. Список использованной литературы состоит из 90 источников.

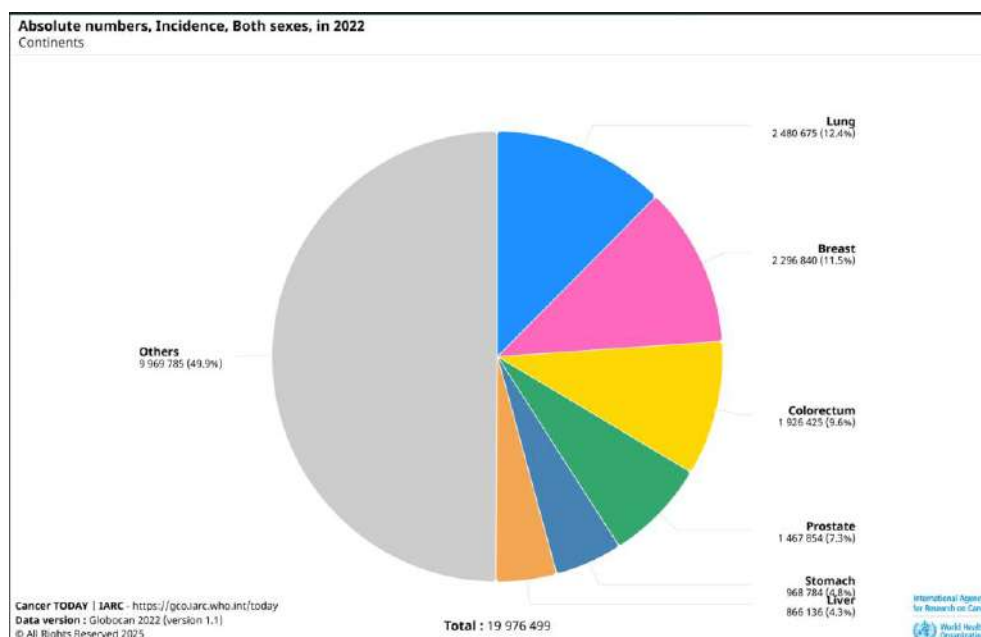
# **1 КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК: ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, СЕМЕЙСТВО ПРОТООНКОГЕНОВ RAS, ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

## **1.1 Эпидемиология и патогенез колоректального рака**

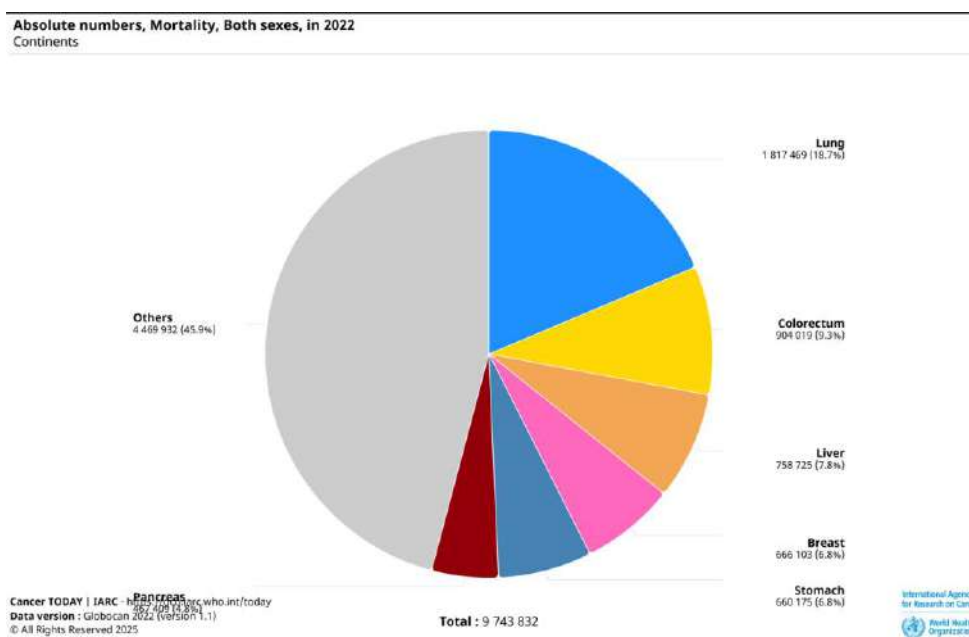
Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), онкологические болезни остаются одной из главных причин смертности от неинфекционных заболеваний в мире, ежегодно унося жизни более десяти миллионов человек. В 2022 году было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев рака (включая немеланомный рак кожи - НРК) и 9,7 миллиона смертей от рака (включая НРК). По оценкам, примерно у каждого пятого мужчины или женщины в течение жизни развивается рак, при этом примерно каждый девятый мужчина и каждая двенадцатая женщина умирают от него [13]. В 2022 году рак лёгких был наиболее часто диагностируемым видом рака: на его долю пришлось почти 2,5 миллиона новых случаев, или каждый восьмой случай рака в мире (12,4% от всех случаев рака в мире). За ним следуют рак молочной железы у женщин (11,6%), рак толстой кишки (9,6%), рак простаты (7,3%) и рак желудка (4,9%). Рак лёгких также был основной причиной смерти от рака: по оценкам, от него умерло 1,8 миллиона человек (18,7%), за ним следовали рак толстой кишки (9,3%), рак печени (7,8%), рак молочной железы у женщин (6,9%) и рак желудка (6,8%). [13]. Несмотря на значительные успехи в проведении высокотехнологичных медицинских исследований, направленных на разработку новых методов диагностики и лечения рака, проблема снижения смертности от онкологических заболеваний пока не решена [14].

Колоректальный рак — одна из самых распространенных злокачественных опухолей. Важно отметить, что общий термин «колоректальный рак» часто относится к раку толстой и прямой кишки. Толстая и прямая кишка составляют толстый кишечник, который является частью пищеварительной системы, также известной как пищеварительная система. Рак прямой кишки часто имеет множество различных причин и требует различных методов диагностики, лечения и излечения [15]. Уровень смертности от КРР также выше у мужчин (33,9 на 100 000 мужчин по сравнению с 21,8 на 100 000 женщин) [16]. Также наблюдается глобальная тенденция к тому, что у мужчин заболеваемость (746 298 против 614 304 [20,6 против 14,3 ASR]) и смертность (373 639 против 320 294 [10 против 6,9 ASR]) от КРР [17] выше, чем у женщин. Согласно рисунку 1, ежегодно во всем мире диагностируется около 1,9 миллиона новых случаев колоректального рака и более 904 000 человек умирают от этой болезни. Это делает колоректальный рак третьим по распространенности видом рака и второй по значимости причиной смерти от рака [18]. Между странами и регионами наблюдаются значительные различия в показателях заболеваемости и смертности. По данным Всемирной организации здравоохранения, колоректальный рак является третьим по распространенности видом рака у мужчин и вторым по распространенности видом рака у женщин [17]. В

Казахстане аналогичная ситуация наблюдалась в гендерной структуре заболеваемости раком, что показано на рисунке 2 [19].



А



Б

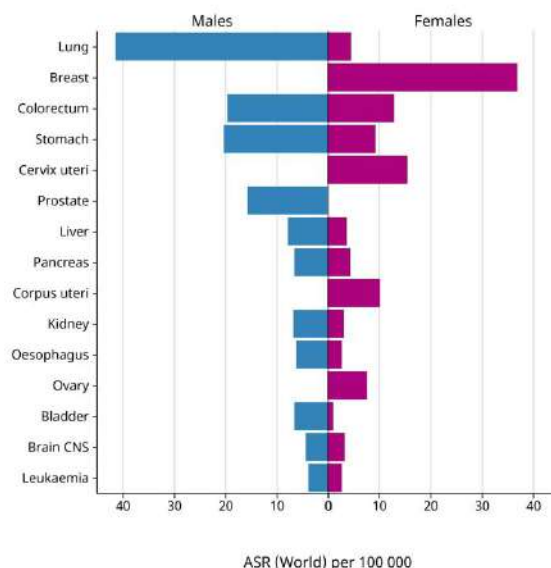
Рисунок 1 – Число новых случаев (А) и смертей (Б) от колоректального рака в 2022 году во всем мире, оба пола, все возрасты

Примечание – Составлено по источнику [18]

Географически этот вид рака встречается в индустриально развитых странах с высоким и средним индексом человеческого прогресса [20]. Заболеваемость колоректальным раком примерно в три раза выше в странах с

развитой экономикой, чем в развивающихся регионах; однако, поскольку средние показатели смертности выше в странах с низким индексом глобального развития, разница в показателях смертности менее выражена [21].

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Males and Females, in 2022  
Kazakhstan  
(Top 15 cancer sites)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>  
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)  
© All Rights Reserved 2025

International Agency  
for Research on Cancer  
World Health  
Organization

Рисунок 2 – Число новых случаев колоректального рака в 2020 году в Казахстане, у мужчин и женщин, все возрасты

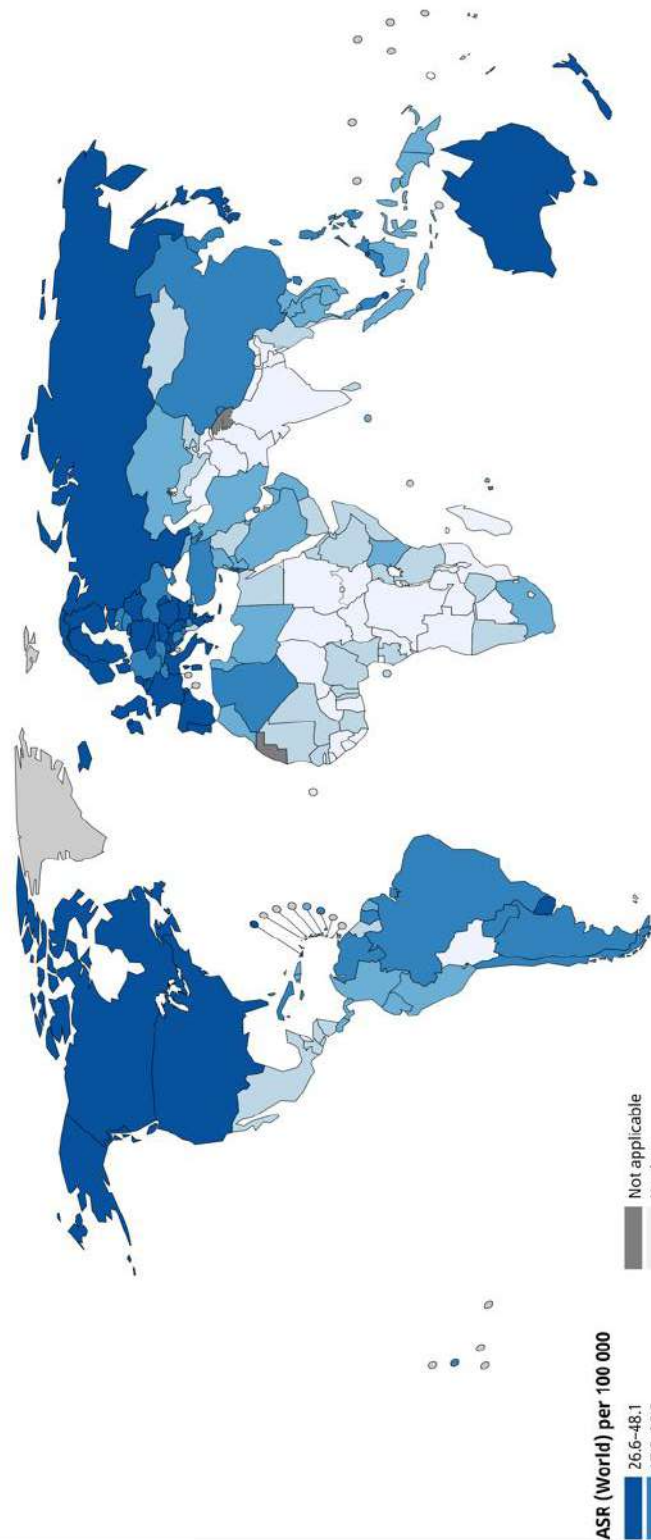
Примечание – Составлено по источнику [18]

Колоректальный рак встречается чаще, чем рак анального канала: в развитых странах соотношение рака толстой кишки к раку анального канала составляет 2:1 и более (соотношение выше у женщин), тогда как в развивающихся странах эти соотношения в целом схожи [22]. Самые высокие показатели заболеваемости раком толстой кишки, как показано на рисунке 3, наблюдаются в нескольких регионах Европы (например, Венгрия, Словения, Словакия, Нидерланды и Норвегия), Австралии/Новой Зеландии, Северной Америки и Восточной Азии (Япония и Южная Корея, Сингапур (у женщин), при этом Венгрия и Норвегия занимают первые места у мужчин и женщин соответственно [23]. Самый высокий рост заболеваемости раком толстой кишки наблюдается в Азии, а также в странах Восточной Европы [24].

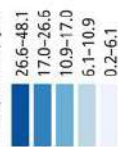


**Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022**

Colorectum



ASR (World) per 100 000



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization, International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

**Cancer TODAY | IARC**  
https://gco.iarc.who.int/today  
Data version: Glibocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024  
© All Rights Reserved 2025

Рисунок 3 – Предполагаемые стандартизированные по возрасту показатели заболеваемости (в мире) в 2022 году, ободочная кишка, оба пола, все возрасты

Примечание – Составлено по источнику[18]

Согласно рисунку 4, примерно 49,2% всех новых случаев рака толстой кишки и 51,4% смертей произошли в Азии, а заболеваемость в этом регионе составила от 1,9 до 29,2 на 100 000 человек [13].

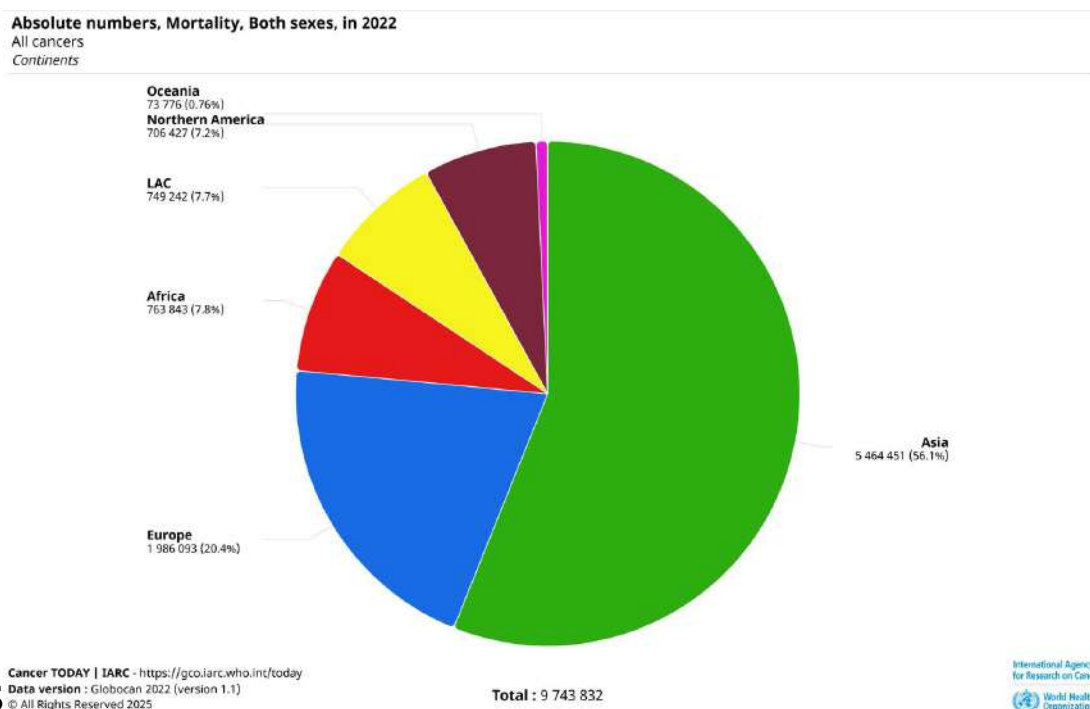
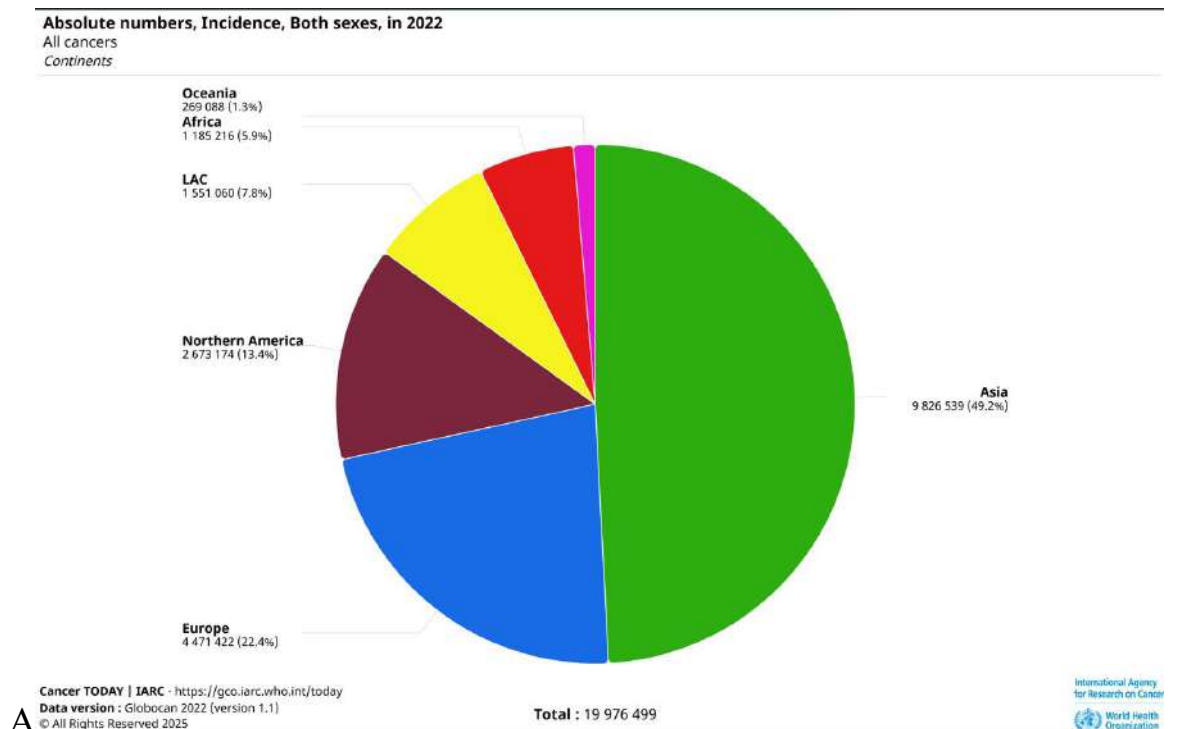


Рисунок 4 – Распределение новых случаев (А) и смертей (Б) от колоректального рака в мире

Примечание – Составлено по источнику [18]

Согласно исследованиям Кайдаровой и соавторов количество выявленных случаев КРР увеличилось с 199 (минимум) в 2011 году до 514 (максимум) в 2014 году, а в прошлом году было выявлено 309 случаев. Кроме того, уровень выявляемости увеличился с 0,02% до 0,05%, что свидетельствует об увеличении эффективности тестирования. За последние четыре года число случаев рака на ранних стадиях увеличилось до 88,3% в 2018 году [25].

Сравнивая темпы роста заболеваемости колоректальным раком с внедрением скрининга в регионах Казахстана, были выявлены регионы с высоким, средним и низким уровнем заболеваемости. К регионам с высоким уровнем заболеваемости относятся северный, восточный и центральный регионы (Павлодарская, Северо-Казахстанская, Костанайская, Акмолинская области, Карагандинская, Восточно-Казахстанская, Нур-Султан, Северо-Казахстанская области). Запад и Алматы (южный регион). В Западном Казахстане (Актюбинская, Мангистауская, Атырауская области) зафиксирован средний уровень заболеваемости, в южных регионах зафиксированы низкие показатели. Хотя в Казахстане наблюдается снижение смертности от колоректального рака [19], наша республика остается в зоне высокой смертности.

С 2011 года в стране непрерывно реализуются национальные программы реформирования здравоохранения, в которых повышение качества онкологической помощи является одним из ключевых показателей. В целом за период 2004-2020 гг. На данный момент действует Постановление Правительства Республики Казахстан от 5 октября 2023 года № 874 «Об утверждении Комплексного плана по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике Казахстан на 2023 – 2027 годы». Для Республики Казахстан характерно отсутствие устойчивых тенденций в динамике заболеваемости раком органов пищеварения по основным регионам. Если до 2014 года рак желудка был самым распространенным онкологическим заболеванием по уровню заболеваемости, то с 2014 года на первое место вышел рак толстой кишки. В то же время наблюдалось снижение заболеваемости раком таких локализаций, как рак пищевода и желудка, а также рост заболеваемости раком прямой кишки [26]. В отличие от заболеваемости, смертность от рака органов пищеварения имеет тенденцию к большей стабильности, с небольшим снижением. В последние годы рак желудка остается основной причиной смерти, в то время как рак толстой кишки имеет очень схожий показатель [26].

Возраст является одним из наиболее важных факторов, приводящих к раку прямой кишки. Во всем мире примерно 70% больных раком толстой кишки старше 65 лет [27]. Аналогично, в Казахстане наибольшая доля больных раком прямой кишки (обоих полов) зафиксирована в возрастной группе 60-69 лет. Пик возрастной заболеваемости раком прямой кишки приходится на возрастную группу 75–79 лет у представителей обоих полов [28]. Заболеваемость злокачественными опухолями толстой кишки увеличивается в возрастной группе 60–69 лет и достигает пика в возрастной группе 70 лет и старше [26].

В 2022 году в целом по республике «грубый» показатель заболеваемости ЗН (без рака кожи) населения обоих полов возрос к уровню прошлого года на 5,6% и составил 179,9 на 100 тыс. нас. (2021 год – 170,3). Увеличение выявляемости ЗН обусловлено ростом доступности специализированной медицинской помощи в регионах по мере значительного улучшения ситуации с COVID-19 (возобновилась плановая работа ПМСП, выросли объем скрининговых осмотров, возможности по проведению КДУ пациентам с подозрением на ЗН, соблюдаются маршрут и сроки обследования). Но в регионах страны ситуация различная, со значительным размахом уровней заболеваемости [19]. В 2022 году число больных, выявленных при скрининговых профосмотрах, возросло на 22,3%, с 1823 до 2230 чел., в итоге выявляемость на скринингах возросла с 5,2 до 5,9% [19].

Выше среднереспубликанского уровня – 9,95 на 100 тыс. нас. заболеваемость раком ободочной кишки в 10 регионах: Костанайской – 20,7 (2021 год – 15,9), Павлодарской – 18,8 (15,3), Северо-Казахстанской – 18,0 (12,7), Восточно-Казахстанской – 16,9 (13,4), Карагандинской – 15,4 (15,0), Акмолинской – 14,6 (10,2), Западно-Казахстанской – 11,0 (10,1), Абайской – 10,0 (9,0) областях и гг. Алматы – 12,8 (12,1) и Астана – 10,5 (9,0). Как и в 2021 году, значительно реже рак ободочной кишки выявлялся в Туркестанской – 3,1 на 100 тыс. нас. (2,7), Кызылординской – 4,1 (4,6), Жамбылской – 5,5 (5,8), Алматинской – 6,3 (4,7), Жетысуской – 6,4, Мангистауской – 6,8 (4,9) областях и г. Шымкент – 5,0 (4,0) [19].

Рост заболеваемости раком толстой кишки в Казахстане может быть связан с реализацией программы скрининга населения, которая началась в 2011 году вместе с реализацией программ реформирования здравоохранения. Данное обследование проводится в 2 этапа и включает иммунохимические исследования кала на скрытую кровь — гемокультуру и колоноскопию, а при выявлении патологических изменений проводится третий этап — гистологическое исследование биопсийного материала, полученный из кишечника.

Скрининг населения проводится каждые 2 года и охватывает целевые группы населения, в том числе людей в возрасте 50–70 лет [29].

Продолжающиеся демографические изменения приведут к ежегодному увеличению числа смертей от рака толстой кишки в большинстве стран, и, по данным Международного агентства по изучению рака, ожидается, что во всем мире от этого заболевания умрет около 1,02 миллиона человек. 2040 г., включая Казахстан, эта цифра составит около 1,74 тыс. человек [1]. Таким образом, динамичный рост заболеваемости колоректальным раком с устойчивым лидирующим положением в общей структуре онкологической патологии свидетельствует о важности данной проблемы для Республики Казахстан и необходимости совершенствования методов лечения.

## **1.2 Молекулярный механизм мутации KRAS**

KRAS, член семейства протоонкогенов RAS, связан с несколькими злокачественными новообразованиями высокой степени злокачественности. Ген KRAS был идентифицирован как наиболее часто мутирующий ген при раке

человека, вызывающий 30% всех случаев карциномы человека [30-34]. Исследования показали, что мутантные версии KRAS присутствуют в 90% случаев рака поджелудочной железы [35-37] и до 40% случаев колоректального рака [32]. RAS взаимодействует с белками, участвующими во многих клеточных процессах, включая рост клеток, дифференцировку, митоз и метаболизм. Эти взаимодействия приводят к активации эффекторных белков, таких как Raf-киназа, PI3K и Akt, которые играют важную роль в опухолеобразовании [38,39].

Подавление сигнала KRAS считается перспективной терапевтической стратегией. Однако существенного прогресса в разработке специфических ингибиторов KRAS не достигнуто. Мутации гена KRAS играют важную роль в патогенезе различных злокачественных новообразований, и их изучение стало активной темой исследований в последние годы. В статье Roggi и соавт. [40] подчеркивается, что, несмотря на многолетние усилия по разработке ингибиторов KRAS, этот онкоген остается труднодостижимой целью для фармакологического вмешательства. Авторы подчеркивают, что механизмы геномной нестабильности, такие как микросателлитная нестабильность и хромосомная нестабильность, играют важную роль в развитии колоректального рака (КРР), подчеркивая сложность осложнений терапии, связанной с KRAS. В 2021 году Indini [41] отметил, что KRAS является основным фактором прогрессирования солидных опухолей, и, хотя исторически он считался «неизлечимым», новые молекулы, нацеленные на KRAS, показывают многообещающие результаты. Это открывает новые терапевтические возможности, подчеркивая необходимость дальнейших исследований в этой области. Reita и др. [42] приводит более подробный анализ частоты мутаций KRAS при раке легких, а также молекулярных механизмов, лежащих в основе первичной и вторичной резистентности к терапевтическим агентам, нацеленным на KRAS. Авторы дают подробный обзор роли KRAS как молекулярного переключателя, позволяя лучше понять его функцию в нормальных и опухолевых клетках.

В том же году Hofmann и др. [43] обсудили необходимость разработки подходов, нацеленных на все варианты онкогенных мутаций KRAS, подчеркнув сложность и разнообразие мутаций, и их влияние на терапию. Это подчеркивает важность создания концепций, охватывающих все мутации KRAS.

Ferreira и др. [44] исследовали влияние мутаций KRAS на регуляцию апоптоза и аутофагии. Они отмечают, что мутации KRAS могут привести к появлению клеток, устойчивых к апоптозу, что является существенным препятствием для противораковой терапии. Это открывает новые горизонты для разработки стратегий преодоления этого сопротивления.

Parikh и др. [45] суммируют современные стратегии воздействия на мутации KRAS, подчеркивая важность секвенирования генома и быстрой разработки ранних ингибиторов, таких как соторитиниб. Это показывает, что понимание нарушений, вызывающих рак, меняет лечение различных типов рака. Santarpia и др. [46] сосредоточились на данных доклинических и клинических исследований, включающих терапию, нацеленную на KRAS, у пациентов,

имеющих мутацию KRAS G12C. Это подчеркивает достижения в области прецизионной онкологии и необходимость дальнейших исследований.

Randelović и др. [47] представили новый подход к разработке противораковых препаратов путем связывания GAP с мутантными формами KRAS, показав многообещающие результаты в исследованиях *in vitro*. Это подчеркивает важность инновационных подходов к борьбе с мутациями KRAS.

Наконец, Zhou и др. [48] изучает влияние мутаций KRAS на микроокружение опухоли при колоректальном раке, подчеркивая связь между мутациями KRAS и плохим прогнозом у пациентов. В этом исследовании подчеркивается важность понимания роли KRAS в прогрессировании опухоли и его потенциального влияния на стратегии лечения. Таким образом, литература по мутациям KRAS не только демонстрирует сложность и разнообразие мутаций, но и необходимость разработки новых методов лечения для преодоления лекарственной устойчивости и улучшения результатов лечения пациентов. рак

### **1.3 Роль мутации KRAS в онкогенезе колоректального рака**

В 2012 году в своей статье Neumann подчеркнул, что мутации KRAS связаны с устойчивостью опухолей к ингибиторам EGFR. Он отметил, что такая активация происходит независимо от экспрессии EGFR и что анализ статуса мутации KRAS у пациентов с метастатическим колоректальным раком (мКРР) можно проводить на архивных образцах тканей [49]. Это исследование стало основой для дальнейших исследований по молекулярной диагностике и прогнозированию лечения.

В 2017 году Dimaras расширил понимание колоректального рака как гетерогенного заболевания, подчеркнув влияние генетических и экологических факторов на развитие заболевания. В своей работе он подчеркивает важность молекулярного анализа, включая мутации RAS, для понимания метаболических изменений в раковых клетках [50]. Это исследование подчеркивает необходимость анализа мутационного статуса для разработки эффективных терапевтических стратегий.

В том же году Fedyanin и его коллеги изучали соответствие мутационного статуса KRAS, NRAS, BRAF и PIK3CA между первичными и метастатическими опухолями [51]. Они обнаружили значительные различия в мутационном статусе, что подчеркивает важность молекулярных характеристик опухолей для выбора лечения. Это исследование добавляет еще один уровень сложности к пониманию гетерогенности опухолей и их реакции на лечение.

В 2018 году Tysarowski и Nasierowska-Guttmejer подтвердили, что мутации K-RAS в кодонах 12 и 13 являются прогностическими факторами колоректального рака [52]. Они также изучили влияние мутаций KRAS на эффективность лечения цетуксимабом, подчеркнув важность молекулярной диагностики в прогнозировании ответа на лечение.

Кроме того, в 2021 году De Falco и его коллеги изучали редкие двойные мутации KRAS [53], подчеркивая сложность генетического профиля колоректального рака и необходимость целевых подходов к лечению,

персонализированное лечение. Это исследование показывает, что даже в пределах одного гена мутации могут иметь разные клинические последствия.

Наконец, в 2024 году Zhou и др. исследовали влияние мутаций KRAS на микроокружение опухоли [48] и обнаружили, что мутации KRAS значительно ухудшают прогноз у пациентов с метастатическим колоректальным раком. В том же году Bedau и его коллеги представили случай, в котором мутация KRAS была связана со слиянием ANK3: RET [54]. Таким образом, литература о мутациях KRAS при колоректальном раке подчеркивает его важную роль в патогенезе, прогнозе и вариантах лечения, что побуждает к дальнейшим исследованиям в этой области.

#### **1.4 Роль окислительного стресса в онкогенезе колоректального рака**

Окислительный стресс является важным фактором, влияющим на канцерогенез, особенно в контексте колоректального рака. В литературе, начиная с Acharya [55], подчеркивается, что активные формы кислорода (АФК) могут как способствовать, так и подавлять рост рака, что делает их палкой о двух концах в терапии. Было показано, что митохондрии являются основным источником активных форм кислорода (АФК), а их взаимодействие с клеточными защитными системами, такими как ферменты детоксикации, играет важную роль в предотвращении мутаций и рака.

Кроме того, Anaïs Castaldo и др. [56] подчеркнули, что окислительный стресс напрямую участвует в канцерогенезе толстой кишки, при котором ROS стабилизируют индуцируемый гипоксией фактор HIF-1alpha. Это взаимодействие подчеркивает важность митохондриального комплекса III в канцерогенезе, открывая новые направления для разработки противораковых стратегий.

Leone и др. [57] расширили наше понимание окислительного стресса, описав механизмы, посредством которых ROS влияют на пролиферацию клеток и апоптоз. Они отмечают, что высокие концентрации активных форм кислорода могут привести к повреждению ДНК и, таким образом, вызвать прогрессирование рака. Это открывает возможность целенаправленного лечения для контроля уровня активных форм кислорода.

Работа Падюковой и др. [58] изучали генетические полиморфизмы, связанные с окислительным стрессом и канцерогенезом, выявляя важные механизмы, посредством которых врожденный иммунный ответ может влиять на развитие колоректального рака. Это подчеркивает сложность взаимодействия генетических факторов и окислительного стресса в контексте рака.

Lin и др. [59] рассматривали микроРНК и их связь с ROS как потенциальные биомаркеры и терапевтические мишени. Они отмечают, что высокие уровни активных форм кислорода в клетках колоректального рака способствуют мутациям и нарушают сигнальные пути клеток, что делает их необходимыми для понимания прогрессирования заболевания.

Москаленко и др. [60] подчеркнули роль адипоцитов в микроокружении опухоли и их связь с окислительным стрессом, предположив, что ожирение

может способствовать гипоксии и увеличению продукции свободных радикалов, что также влияет на канцерогенный процесс.

Fatima Zahra и партнеры [61] предложили двойное видение роли антиоксидантов в контексте окислительного стресса и рака. Они подчеркивают, что окислительное повреждение ДНК и других клеточных компонентов является ключевым механизмом развития рака, что открывает возможность разработки новых методов лечения.

Javed Iqbal и др. [62] исследовали взаимосвязь между окислительным стрессом, клеточной коммуникацией и сигнальными путями при раке, подчеркивая важность ROS во многих аспектах канцерогенеза. письма.

Наконец, Li и др. [63] обобщили современное понимание роли окислительного стресса в развитии опухолей, указав, что как дефицит, так и избыток АФК могут влиять на судьбу опухолевых клеток, открывая перспективы для разработки глобальных терапевтических стратегий, направленных на модуляцию уровней АФК. РОС.

Окислительный стресс является основным фактором, способствующим развитию колоректального рака, особенно в условиях наличия мутантных клеток KRAS.

### **1.5 Хирургические методы лечения колоректального рака**

В последние годы хирургическое лечение колоректального рака стало предметом активных исследований, направленных на улучшение результатов и снижение осложнений.

В 2012 году статья Нестерова и др. [64] подчеркнули, что роботизированная простатэктомия показала онкологические результаты, сравнимые с открытой операцией, а также превосходила традиционные методы по нескольким параметрам, включая время восстановления и контроль мочеиспускания. Это открывает новые горизонты для применения роботизированных технологий в хирургии рака прямой кишки. Следующий шаг в развитии хирургического лечения рака прямой кишки был сделан в 2013 г., когда Bianchi et al. [65] отметили, что минимально инвазивная хирургия рака прямой кишки, хотя и ограниченная несколькими центрами, показала лучшие краткосрочные клинические результаты и онкологическую безопасность по сравнению с открытой хирургией. Однако высокая стоимость роботизированной хирургии остается существенным препятствием для ее широкого использования.

В 2015 году Черноглазова и соавт. [66] представили данные о том, что предоперационная химиотерапия улучшает резектабельность метастазов колоректального рака в печени. Их исследование показало, что предоперационная химиотерапия может значительно улучшить результаты лечения, особенно при двудольчатых метастазах. Это подчеркивает важность комбинированной терапии при лечении рака прямой кишки.

Также в 2015 году Невольских и др. [67] сосредоточились на современных тенденциях в комбинированной терапии рака прямой кишки, включая предоперационную химиолучевую терапию, которая облегчает проведение



сфинктерсохраняющей операции. Это говорит о том, что для достижения лучших результатов необходимо комбинировать различные методы лечения.

Куликовский и партнеры [68] В своей статье они также рассмотрели хирургическое лечение метастазов рака прямой кишки в печень, подчеркнув резекцию печени и радиочастотную абляцию как основные методы. В своей работе они подчеркивают, что полное хирургическое удаление метастазов является единственным подходом, дающим шанс на излечение.

Слободин и др. [69] рассмотрели лапароскопическую хирургию рака прямой кишки в условиях спаек, подчеркнув важность предоперационного ультразвукового исследования для выбора подходящей точки доступа. Это подтверждает необходимость адаптации хирургических методов к сложным анатомическим условиям.

В 2020 году работа Руиса и др. [70] поднимет вопрос о преимуществах роботизированной хирургии, позволяющей осуществлять трехмерную визуализацию и повышающей точность хирургических операций, что может быть особенно полезно при операциях в области таза. Наконец, в 2024 году

Коссенас и др. [71] представили анализ сравнительной эффективности роботизированной и лапароскопической правосторонней гемиколэктомии, показав неоднозначные результаты, подчеркнув необходимость дальнейших исследований для оптимизации хирургических подходов и улучшения качества жизни пациентов.

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что хирургическое лечение колоректального рака продолжает развиваться, внедряя новые технологии и методы, открывая перспективы улучшения результатов лечения и качества жизни пациента.

### **1.6 Химиотерапия и таргетная терапия колоректального рака**

В последние годы проблема химиотерапии и таргетной терапии колоректального рака отразила актуальность проблемы и необходимость поиска эффективных методов лечения.

В 2015 году вышла статья Нестерова и др. [72] обсудили эффективность предоперационной химиотерапии при метастазах колоректального рака в печень. Авторы подчеркивают, что резекция печени в сочетании с химиотерапией позволяет излечить пациентов с резектабельными метастазами. В исследовании с участием 60 пациентов было установлено, что предоперационная химиотерапия достигла объективной эффективности у 55% пациентов и стабилизации заболевания у 38,3%. Полученные результаты подтверждают важность предоперационной химиотерапии как этапа комбинированного лечения колоректального рака, особенно метастазов в двухдольную печень.

В 2016 году Пьетро Бьянки и др. [73] в своей работе рассмотрели потенциал химиотерапии при метастатическом анальном раке. Исследование показало, что у 21% пациентов наблюдались объективные эффекты, а у 58% — стабильное течение заболевания. Важно отметить, что применение пембролизумаба в сочетании с другими препаратами показало многообещающие

результаты, однако были выявлены и случаи токсичности 3 степени. Эти данные подчеркивают необходимость поиска оптимальных комбинаций методов лечения для достижения лучших клинических результатов.

В том же году Черноглазова и др. [74] обсуждают новый препарат регорафениб, который представляет собой значительный прогресс в лечении метастатического рака прямой кишки. Авторы отмечают, что препарат может улучшить результаты лечения и увеличить выживаемость пациентов, что делает его важным инструментом в арсенале онколога.

Наконец, в 2020 году Невольских и др. [75] и коллеги подчеркнули в своем обзоре необходимость персонализации лечения рака с учетом гетерогенности опухоли и адаптивности раковых клеток. Авторы отмечают, что традиционная химиотерапия остается основой лечения колоректального рака, а таргетная терапия применяется только при наличии метастазов и определенных мутаций. В исследовании также рассматриваются современные методы тестирования чувствительности опухолей к препаратам, открывающие новые возможности для повышения эффективности терапии.

Таким образом, анализ представленных статей позволяет выделить основные аспекты и тенденции в лечении колоректального рака, подчеркивая важность комплексного и персонифицированного подхода к терапии для повышения эффективности лечения.

### **1.7 Иммунотерапия колоректального рака**

Иммунотерапия колоректального рака является быстрорастущей областью исследований и все чаще применяется в клинической практике. В этом обзоре литературы рассматриваются ключевые аспекты и достижения в этой области, от ранних исследований до последних исследований.

В статье Spranger и др. [76] подчеркивается важность скоординированного взаимодействия между врожденными и адаптивными иммунными реакциями для достижения терапевтической активности. Эффективные противоопухолевые Авторы выделяют ключевые механизмы, которые опухоли могут использовать для уклонения от иммунного ответа, и предлагают комбинированные стратегии лечения, направленные на увеличение числа специфических Т-клеток и блокирование этих механизмов.

Иммуносупрессия в микроокружении опухоли. Кроме того, в исследовании Kazanskiy и коллег [77] были изучены метаболические профили различных подтипов Т-клеток и их влияние на эффективность терапии. иммунный Авторы подчеркивают, что метаболические процессы могут существенно влиять на выживаемость и пролиферацию Т-клеток, тем самым ограничивая противоопухолевые реакции.

В статье Sumransub и др. [78] фокусируется на достижениях в области иммунотерапии, особенно в контексте колоректального рака. Авторы обсуждают новые биомаркеры для прогнозирования чувствительности к иммунотерапии, а также важность взаимодействия между микробиотой кишечника и эффективностью иммунотерапии.

Следующее исследование Wozniakova и др. [79] показывает иммунный контекст каждого случая колоректального рака. Ректальное исследование имеет важное значение для выбора подхода к лечению. Авторы подчеркивают важность таких биомаркеров, как PD-L1 и CD8+ TIL, в прогнозировании успеха лечения.

В статье Wang и др. [80] рассматриваются проблемы, с которыми сталкивается иммунотерапия, включая токсичность введения и низкую частоту ответа. Авторы подчеркивают необходимость разработки новых биомаркеров и стратегий, которые могут улучшить ответ на лечение. Наконец, в статье Mauri Cornista и коллег [81] обобщены современные достижения и проблемы в области иммунотерапии рака прямой кишки, подчеркнуто, что, хотя эффективность иммунотерапии доказана, многие пациенты до сих пор не видят результатов. реагировать на лечение.

В статье Li и др. [82] подчеркивается необходимость дальнейших исследований в области комбинированной иммунотерапии холододового рака толстой кишки, а также поиска новых биомаркеров для отбора точных данных о пациентах. может способствовать развитию персонализированной терапии.

Наконец исследование, проведенное группой учёных во главе с Yun, показало, что витамин С (в высокой дозировке) избирательно убивает клетки колоректального рака (CRC) с мутациями в генах KRAS и BRAF. Эти мутации делают клетки более зависимыми от гликолиза и повышают уровень транспортера глюкозы GLUT1, который также активно захватывает окисленную форму витамина С – дегидроаскорбат (DHA) [83]. После попадания в клетку DHA восстанавливается до витамина С за счёт внутриклеточных антиоксидантов (глутатиона и NADPH), что вызывает оксидативный стресс, накопление активных форм кислорода (ROS) и подавление ключевого фермента гликолиза GAPDH. Это приводит к энергетическому кризису и гибели опухолевых клеток с указанными мутациями, но не влияет на здоровые клетки [83].

Данные исследования показывают, что D-изомер витамина С в высоких дозах может быть потенциальным терапевтическим средством против колоректального рака с мутациями KRAS/BRAF. Основной механизм действия, которого направлен на избыточное накопление DHA в опухолевых клетках через GLUT1, что вызывает оксидативный стресс и ингибирование GAPDH. Исследования на мышах подтвердили, что высокодозное введение витамина С значительно замедляет рост опухолей с указанными мутациями. Но необходимы исследования для определения терапевтической дозы и разработки рекомендаций для дальнейшего использования DVC.

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2 Материалы и методы исследования**

#### **2.1 Культура клеток и клеточные линии**

KRAS мутантные клеточные линии АК 192 и НСТ 116 [84,85] культивировались в среде DMEM/F-12 (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла/питательная смесь F-12) (каталожный номер Caisson Labs DFL13) с добавлением 10% сыворотки плода теленка (FCS), 2 мМ L-глутамина и пенициллина (100 ЕД) /мл)-стрептомицин (100 мкг/мл).

Для достижения 80% конfluenceности 3 миллиона клеток высевали в 150-миллиметровые чашки для культивирования клеток в 20 мл среды для культивирования клеток с добавлением 2 г доксициклина за 2 дня до подготовки ксенотрансплантата.

#### **2.2 Выделение и культивирование раковых клеток**

В ГКП на ПХВ «Многопрофильном медицинском центре» города Астана был проведен сбор образцов колоректального рака. Клетки были выделены из образцов для дальнейшего изучения. Все процедуры проводятся в стерильных условиях.

Изоляция и пассирование клеток проводились в ламинарном шкафу для асептической работы. Раствор коллагеназы II готовили в день эксперимента.

Для образцов опухолевой ткани массой до 5 г готовили 20–50 мл коллагеназы (1 мг/мл). Коллагеназу II взвешивали (порошок хранили при температуре 4°C) и растворяли в 20–50 мл буфера HBSS, содержащего соли кальция и магния + 1% HEPES, затем нагревали до 37°C в течение 15 мин. Добавляли раствор ДНКазы в конечной концентрации 20 мкг/мл, раствор добавляли с помощью шприца 0,2 мкм.

Опухолевую ткань переносили в чашку Петри со средой HBSS и промывали для удаления содержимого кишечника. После промывания ткань переносили в другую чашку Петри, содержащую EBSS (EGTA+HEPES). С помощью скальпеля или острого лезвия бритвы измельчите часть кишечника в порошок (площадью около 1 мм<sup>3</sup>).

Содержимое стакана перенесли в коническую пробирку объемом 50 мл и довели объем раствора до 25 мл с помощью EBSS (EGTA+HEPES). Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугировали при 140xg в течение 5 мин. После центрифугирования прозрачную жидкость сливают. Добавьте 20 мл EBSS без солей кальция и магния (для удаления ЭГТА) к клеточной суспензии и центрифугируйте при 140xg в течение 5 минут. После центрифугирования прозрачную жидкость удаляют. Добавьте от 20 до 50 мл свежеприготовленного раствора коллагеназы в коническую пробирку, содержащую измельченную ткань.

Раствор инкубировали на водяной бане с температурой 37°C в течение 30 мин, перемешивая каждые 5 мин, несколько раз переворачивая пробирку. В конце инкубационного периода (последние 5 мин) взвешенным частицам давали осесть. Затем прозрачная жидкость фильтруется через фильтр с размером пор 70

микрон. Затем суспензию отдельных клеток дважды промывали в растворе HBSS + 2% FBS.

Прозрачную жидкость, содержащую коллагеназу, переносили в коническую пробирку с измельченной тканью для дальнейшего растворения. Осажденные клетки смешивали с полной питательной средой и хранили на льду до дальнейшего использования. Процедуру растворения тканей в растворе коллагеназы повторяли 2–3 раза.

После растворения ткани в растворе коллагеназы в пробирку с оставшейся тканью добавляют 10–25 мл раствора трипсина (0,25%) и инкубируют в течение 30 мин при температуре 37°C на водяной бане, после чего осторожно перемешивают раствор. каждые 3 минуты. -5 минут. После инкубации и осаждения клеток прозрачный супернатант фильтровали через сетчатый фильтр с размером ячеек 70–100 мкм в новую коническую пробирку объемом 50 мл. Промойте суспензию дважды по 5 минут в растворе HBSS + 2% FBS и удалите прозрачный супернатант. Оставшийся клеточный осадок растворяют в полной питательной среде и смешивают с другими клеточными компонентами. Подсчет клеток проводился с использованием автоматического счетчика клеток BIORAD и реагента трипанового синего.

### **2.3 Лабораторные животные**

Беспородных лабораторных мышей CD-1 использовали в экспериментах по биобезопасности АТО/D-VC. В экспериментах по изучению эффективности модели ксенотрансплантата АТО/D-VC и колоректального рака и рака поджелудочной железы использовали мышинные линии Nu и NOD Scid, полученные из Новосибирского института цитологии и генетики.

### **2.4 Лекарственные препараты**

В исследовании использовали аскорбиновую кислоту (VC, кат. № А7506), d-(-)-изоаскорбиновую кислоту (D-VC, кат. № 856061) и триоксид мышьяка (АТО, кат. № А1010). Чтобы приготовить 340 мМ исходный раствор VC, 30 г D-VC растворяли в 400 мл стерильного PBS после добавления 39 г бикарбоната натрия (NaHCO<sub>3</sub>, артикул S5761). Раствор непрерывно перемешивали еще 5 минут. Бикарбонат натрия использовали в качестве буфера для доведения кислотного рН (2,3) VC до физиологического уровня (рН 7,35) для инъекций экспериментальным животным. Конечный раствор D-VC довели до 500 мл добавлением PBS. Раствор D-VC фильтруют, аликвотируют и хранят в холодильнике при температуре -20°C, чтобы обеспечить максимальную чистоту и эффективность препарата. Исходный раствор АТО концентрацией 330 мМ готовили путем смешивания и растворения 13 г АТО в 1 N гидроксиде натрия (NaOH). Затем общий объем АТО был увеличен до 200 мл. Конечный раствор фильтровали и хранили в холодильнике при температуре -20°C.

### **2.5 Метод определения уровня продукции митохондриальных АФК (mtАФК)**

Производство mtROS оценивали методом проточной цитометрии с использованием зонда MitoSox, который обнаруживает продукцию супероксида митохондриями. Выработку митохондриального супероксида измеряли с

помощью зонда MitoSox методом проточной цитометрии. Мы провели тройное флуоресцентное окрашивание митохондрий и мтРОС. MitoTracker Green — это зеленый флуоресцентный митохондриальный краситель, который окрашивает митохондрии независимо от мембранного потенциала митохондрий. MitoSox окрашивает супероксид — тип активных форм кислорода, вырабатываемых митохондриями, а Hoechst 33342 используется для специфического окрашивания ядер живых или фиксированных клеток и тканей. Сигнал MitoSOX был значительно ниже в клетках, предварительно обработанных NAC, по сравнению с клетками, непосредственно обработанными комбинацией оксидантных препаратов АТО и D-VC. Используя метод тройного окрашивания, были получены ядра (Hoechst), митохондрии (MTG), мтАФК (MitoSox) с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки АК192 обрабатывали PBS (контроль GM), комбинацией 5 мкМ АТО и 1 мМ DVC, 5 мкМ АТО и 1 мМ DVC и 5 мМ NAC, и делали снимки через 24 и 48 часов (MTG-mitotracker green; mtROS - митохондриальные активные формы кислорода).

## **2.6 Определение тиол-реактивные белки ЕТС, опосредующие образование цитотоксических АФК в раковых клетках с мутацией KRAS**

Тест Элмана использовался для количественной оценки концентрации тиоловых групп в образце, формируя стандартную кривую цистеина. Реактивом Элмана является 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоат) (DTNB), и тиол реагирует с этим соединением, расщепляя дисульфидную связь с образованием 2-нитро-5-тиобензоата (TNB-), который ионизируется до TNB<sup>2-</sup>. — дианион в воде при нейтральном и щелочном рН. Этот ион TNB<sup>2-</sup> имеет желтый цвет, и его поглощение измеряется спектрофотометрически. Концентрацию тиола определяли количественно с помощью реакций DTNB и DTNB. Уровень общего и свободного тиола оценивали в клеточной линии АК 192 после обработки комбинацией окислителей АТО и DVC, а также каждым препаратом в отдельности. Клетки собирали путем обработки трипсином и осаждали, затем ресуспендировали в 30 мМ Трис-НСl, 3 мМ ЭДТА (рН 8,2) и добавляли 25 мкл 1,5 мМ DTNB, а затем 400 мкл метанола для денатурации белка. Суспензию центрифугировали при 3000 g в течение 5 минут, 250 мкл каждого супернатанта переносили в 96-луночный планшет и считывали при 400 нм. Для измерения свободных тиолов аликвоты инкубировали с 25 мкл 10% ТХУ и центрифугировали для удаления осажденных белков. Каждую аликвоту (50 мкл) переносили в 96-луночный планшет в присутствии 200 мкл 0,2 М Трис-НСl (рН 8,9) и 20 мкл DTNB и считывали при 400 нм.

## **2.7 Метод геномного исследования**

В рамках проекта были собраны следующие материалы: общая и свежая раковая ткань - 80 образцов колоректального рака, 4 образца, фиксированных формалином и залитых парафином (FFPE), 5 образцов крови, внутривенно *in vitro* с ЭДТА - 5 образцов, полученных от ГКП на ПХВ «Многопрофильного медицинского центра» города Астана. Каждый пациент предоставил письменное согласие на генетическое тестирование. ДНК из замороженных образцов тканей и FFPE-образцов выделяли с использованием двух наборов Gentra Puregene

Blood (QIAGEN) и системы ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Качественную и количественную оценку геномной ДНК проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 и флуориметра Qubit. Качество геномной ДНК также оценивалось методом горизонтальной миграции. ДНК из замороженных образцов тканей и FFPE-образцов выделяли с использованием двух наборов Gentra Puregene Blood (QIAGEN) и системы ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Качественную и количественную оценку геномной ДНК проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 и флуориметра Qubit; Качество геномной ДНК также оценивалось методом горизонтальной миграции. Полученный опухолевый материал сохраняется в биобанке по запросу для дальнейшего анализа. Создана электронная база данных образцов и присвоены идентификационные номера. Геномную ДНК выделяли из пластин FFPE согласно протоколу производителя, отвечающему качественным и количественным критериям. Концентрация 10-32 нг/мкл. Из всех образцов FFPE была выделена геномная ДНК и оценена качественно и количественно.

### **2.8 Метод создания ксенографических моделей**

Исследования на животных проводились в соответствии с рекомендациями Этического комитета National Laboratory Astana. Были проведены исследования по изучению роста ксенотрансплантата на линиях мышей Nu и NOD Scid, полученных из Новосибирского института цитологии и генетики. Клетки АК192 ( $2 \times 10^6$ ) и Матригель (каталожный номер 354248 Матригель, НС, Corning, протокол) [34] вводили подкожно под анестезией изофлураном. Рост опухоли контролировали каждые 2 дня с помощью мягкой линейки. Масса тела измерялась один раз в неделю в течение периода испытания. Препарат вводят через 10 дней, когда опухоль достигает диаметра  $>0,6$  см. Животным вводили комбинацию АТО/D-VC в дозах 6 мг/кг и 1,5 г/кг соответственно в течение 2 недель. В каждую группу ксенотрансплантатов также входили животные, которым в качестве отрицательного контроля вместо препарата вводили PBS. Мышей умертвили через 2 недели после инъекции. Ксенотрансплантаты исследовали гистологическим анализом по стандартной методике [34].

### **2.9 Метод последовательного воздействия АТО / D-VC**

В клеточной культуре: для клеток с 5 мкМ АТО в сочетании 1 мМ D-VC, 48–72 часа. Комбинированная инъекция АТО/D-VC мышам в течение двух недель. Оба препарата хранятся при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  (в морозильной камере) и разделены на порции, каждая ампула жидкости используется только один раз. А.

Исходный раствор АТО (65 мг/мл) разделяли на 41 мкл, перед инъекцией добавляли 1460 мкл PBS и вводили мышам. После разбавления в PBS конечная концентрация АТО составила 1,77 мкг/мкл. В. D-VC готов к инъекции. D-VC (60 мг/мл) разливается по 5 мл в пробирки объемом 15 мл. Первые два дня ушли на то, чтобы «привыкнуть» к инъекциям мышам. Мышей взвесили (обычно мыши весят около 25 г).

Вводимая доза рассчитывалась для мышей массой 25 г. Если вес мыши отличается, объем вводимого препарата будет пересчитан. День 1: Взвесьте мышь, предполагаемый вес мыши: 25 г. Лечение начинали с АТО в дозе 3,5 мг/кг - 50 мкл АТО/PBS (1,77 мкг/мкл). Через 2 часа ввести D-VC в дозе 1 г/кг – ввести 410 мкл препарата (готового к инъекции). День 2: Введите АТО в дозе 7 мг/кг - 100 мкл АТО/PBS (1,77 мкг/мкл). Через 2 часа ввести D-VC в дозе 1 г/кг – 410 мкл препарата (приготовленного для инъекции).

Следующие 15 инъекций: пропустить прием пищи, ввести АТО через 2 часа. Лечение проводилось АТО в дозе 7 мг/кг - 100 мкл АТО/PBS (1,77 мкг/мкл). Через 2 часа ввести D-VC в дозе 1,5 г/кг — ввести 650 мкл препарата (предварительно смешанного). Через 2 часа после инъекции D-VC мышам снова давали пищу. В это время мыши были голодны (общее время голодания составило 6 часов) (после 6 дней ежедневных инъекций мышам давали один день отдыха).

### **2.10 Гистологический метод**

Материал, используемый для гистологического анализа, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, а затем промывали под тонкой струей воды. Для обезвоживания материала его пропускают через ряд спиртовых растворов возрастающей концентрации (70°, 80°, 90°, 96°, 96°, 100°, 100°) в течение 30–40 минут. После пропускания через спирт материал вводится в ксилол (2 прохода, каждый по 15–20 минут). Для улучшения пропитки парафином материал погружали в смесь парафина с парафиновым воском в соотношении 8:2 на 1 час в термостате при температуре 58°C. Затем материал заливается парафином. восковую смесь, остудить и приступить к гистологическому срезу. Средняя толщина микрошлифа составила 2–5 мкм.

Срезы помещали на предметные стекла, покрытые белковым раствором, для лучшей фиксации материала. Перед окрашиванием препарат депарафинировали и пропускали сначала через два раствора ксилола, затем через спирты убывающей концентрации (100°, 100°, 96°, 96°, 90°, 80°, 70°) по 2 минуты в каждом растворе. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином [92]. Их окрашивали гематоксилином в течение 10 минут, а затем промывали водопроводной водой. Затем препарат окрашивали эозином в течение 10 мин, затем пропускали через спирты возрастающей концентрации и через две порции ксилола, каждая по 2 мин. Для долговременного приготовления материал смешивают с канадской смолой и фиксируют стеклянной пластиной. Гистологический анализ проводился на микроскопе Olympus CX41 с морфометрической программой.

### **2.11 Статистический анализ**

Для статистического анализа полученных данных использовалась прикладная программа SPSS STATISTICS версии 23. Нормальность распределения количественных признаков в исследуемой совокупности проверялась с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Результаты анализа показывают, что большинство признаков не подчиняются нормальному распределению, поэтому необходимо использовать



параметрическую и непараметрическую статистику. Для выполнения описательной статистики использовался параметрический анализ (для нормально распределенных количественных характеристик) для расчета среднего значения, стандартного отклонения (СД) и т. д., а также непараметрический метод (для количественных характеристик независимо от типа распределения и для качественных характеристики, порядковые и номинальные).

Для определения 95% доверительного интервала (ДИ) частоты качественных характеристик использовался метод Уилсона. Для оценки статистической значимости различий некоторых относительных показателей (частот) использовался критерий хи-квадрат Пирсона. Для изучения функции выживания использовался метод Каплана-Майера для цензурированных данных. Общая выживаемость оценивалась с помощью логарифмического рангового теста.

Для оценки выживаемости и оценки коэффициентов риска неблагоприятных исходов в группах использовались модели пропорциональных рисков Кокса. Для сравнения групп по бинарным признакам была построена таблица сопряженности с расчетом критерия Х<sup>2</sup>. Для сравнения двух зависимых групп по признаку использовали t-критерий Стьюдента для зависимых выборок и критерий Вилкоксона.

Тест Макнемара используется для анализа качественных данных с двумя возможными значениями в двух связанных группах. Тепловые карты использовались для определения распространенности электролитных нарушений в различных участках рака толстой кишки. В работе использовались следующие методы исследования:

1) метод истории документов и контент-анализ (анализ информации литературных источников, государственных данных и статистики, анализ нормативных правовых документов);

2) описание (дескриптивный анализ) включает создание таблиц частот, расчет статистических характеристик или графическое представление;

3) статистические методы (расчет относительных показателей, расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена, определение достоверности результатов, полученных непараметрическими методами (стандарт  $\chi^2$ ) и смещения переменной статистики (критерий Стьюдента)) [86-88] с использованием статистического инструмента EpiInfo. программа и онлайн-калькулятор [89].

В работе были вычислены среднеарифметические показатели ( $M$ ), средняя ошибка ( $m$ ). 95% ДИ был вычислен по формуле (1):

$$95\% \text{ ДИ} = M \pm 1,96 \times m \quad (1)$$

Для оценки связи между отдельными факторами использован так называемый метод анализа ОР на основе четырехпольной таблицы:

$$OP = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Достоверность различия между рядом относительных величин, связанных между собой признаком, проверка гипотезы о наличии (отсутствии) связи между явлениями (без измерения ее величины), если такая связь теоретически возможна и Оценка того, насколько близки два распределения друг к другу, производится нами путем расчета соответствующего индекса -  $\chi^2$  (хи-квадрат).

Критерий  $\chi^2$  определяется следующим образом:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

где  $O$  – наблюдаемое число в клетке таблицы сопряженности,  
 $E$  – ожидаемое число в той же клетке.

Соответствующий показатель показывает, является ли существенной разница между данными, полученными в ходе статистического исследования, и теоретически рассчитанными («ожидаемыми») данными, основанными на предположении об отсутствии связи между изучаемыми явлениями (на том, что мы называем гипотезой).

Его можно определить как критерий, устанавливающий соответствие между теоретическим и экспериментальным распределениями частот. Приведенная ранее формула для  $\chi^2$  в случае таблицы  $2 \times 2$  (т.е. с 1 степенью свободы) дает завышенные значения. Это связано с тем, что теоретическое распределение  $\chi^2$  является непрерывным, тогда как набор рассчитанных значений  $\chi^2$  является дискретным.

На практике это приведет к тому, что нулевая гипотеза будет слишком часто отвергаться. Чтобы компенсировать этот эффект, в формулу (2) вводят поправку Йейтса:

$$\chi^2 = \sum \frac{(|O-E| - \frac{1}{2})^2}{E} \quad (2)$$

Заметим, поправка Йейтса применяется только при  $v=1$ , то есть для таблиц  $2 \times 2$ .

Измерение связи производилось вычислением коэффициента корреляции по следующей формуле (3):

$$r_{xy} = \frac{\sum d_x d_y}{\sqrt{\sum d_x^2 \times \sum d_y^2}} \quad (3)$$

где  $x$  и  $y$  – коррелируемые ряды,

$d_x$  и  $d_y$  – отклонения каждого из чисел этих рядов от их средних.

Средняя ошибка коэффициента корреляции вычислена по формуле (4):

$$m_r = \frac{1-r^2}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

где  $r$  – коэффициент корреляции,

$n$  – число парных членов в корреляционном ряде.

Для оценки статистической значимости корреляции использована формула

(5):

$$t = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} \quad (5)$$

Чувствительность ( $Se$ ) – это пропорция правильных положительных результатов теста среди всех больных. Определяется по формуле (6):

$$Se = \frac{TP}{D_+} \times 100\% \quad (6)$$

где  $Se$  – чувствительность;

$TP$  – верно положительные случаи;

$D_+$  – число больных искомым заболеванием.

Априорная чувствительность указывает на долю пациентов, у которых будет положительный результат данного теста. Чем выше чувствительность теста, тем чаще можно обнаружить заболевание и, следовательно, тем он будет эффективнее. В то же время, если такой высокочувствительный тест дает отрицательный результат, вероятность наличия заболевания маловероятна. Поэтому их следует использовать для устранения болезней. Именно по этой причине высокочувствительные тесты часто называют идентификаторами. Высокочувствительные тесты следует использовать на ранних этапах диагностического процесса, когда необходимо сузить круг предполагаемых заболеваний. Следует также отметить, что этот тест настолько чувствителен, что может давать много «ложных тревог», требуя дополнительных финансовых затрат на дальнейшее тестирование.

Специфичность ( $Sp$ ) — доля истинно отрицательных результатов теста среди здоровых пациентов.

Данный показатель определяется по формуле (7):

$$Sp = \frac{TN}{D_-} \times 100\% \quad (7)$$

где  $Sp$  – специфичность;

$TN$  – истинно отрицательные случаи;

$D_-$  – здоровые пациенты.

После определения специфичности можно заранее предсказать долю здоровых людей, у которых результат этого теста будет отрицательным. Чем

выше специфичность метода, тем надежнее диагностика и, следовательно, тем она эффективнее. Тесты с высокой специфичностью называются дифференциально-диагностическими тестами. Тест эффективен на втором этапе диагностики, когда диапазон подозрений на заболевание узкий и наличие заболевания необходимо доказать с высокой степенью достоверности. Одним из ограничений этого высокоспецифичного теста является то, что при его использовании часто не выявляются многие заболевания. Из вышесказанного можно сделать очень важный практический вывод: в медицинской диагностике с самого начала необходим тест с высокой специфичностью и высокой чувствительностью.

Однако на практике это невозможно, поскольку повышение чувствительности теста неизбежно будет сопровождаться потерей специфичности и наоборот, повышение специфичности теста будет сопровождаться снижением чувствительности. Вывод очевиден: для создания оптимальной диагностической системы необходимо найти компромисс между показателями чувствительности и специфичности, в котором будет максимально отражена финансовая стоимость теста. благоприятствует балансу между риском «ложных тревог» и упущения. Точность ( $A_c$ ) – это пропорция правильных результатов теста среди всех обследованных пациентов. Она определяется по формуле (8):

$$A_c = \frac{TP+TN}{D_++D_-} \times 100\% \quad (8)$$

где  $A_c$  – точность;

$TP$  – истинно положительные решения;

$TN$  – истинно отрицательные решения;

$D_+$  – все здоровые пациенты;

$D_-$  – все больные пациенты.

Таким образом, точность отражает общее количество правильных ответов, полученных в данном тесте.

Для правильного понимания диагностической эффективности методов исследования важную роль играет критерий апостериорной вероятности — прогностическая ценность положительных и отрицательных результатов. Это критерии, которые указывают на вероятность заболевания (или отсутствия заболевания) на основе известных результатов тестов. Легко видеть, что априорный индекс важнее априорного индекса.

Положительная прогностическая ценность ( $+PV$ ) — это доля истинно положительных случаев среди всех положительных результатов теста. Данный показатель определяется по формуле (9):

$$+PV = \frac{TP}{TP+FN} \times 100\% \quad (9)$$

где  $+PV$  – прогностичность положительного результата;

$TP$  – истинно положительные случаи;

$FN$  – ложно отрицательные случаи.

Прогностичность положительного результата, таким образом, напрямую показывает, насколько велика вероятность болезни при положительных результатах исследования.

Прогностичность отрицательного результата ( $-VP$ ) – это пропорция верно отрицательных случаев среди всех отрицательных решений. Этот критерий определяется по формуле (10):

$$-PV = \frac{TP}{TP+FP} \times 100\% \quad (10)$$

где  $-PV$  – прогностичность отрицательного результата;

$TN$  – истинно отрицательные случаи;

$FP$  – ложно положительные случаи.

Данный критерий, таким образом, показывает, насколько велика вероятность того, что пациент здоров, если результаты теста отрицательные.

Просмотр и обработка полученных материалов осуществлены при помощи компьютера (пакет программ Microsoft 365: Excel, Word, и программы EpiInfo 7).

В последнее время большое внимание уделяется методологическим вопросам, связанным с выживаемостью онкологических больных. Наиболее точным методом расчета показателей выживаемости (годовых, годовых, накопительных) считается динамический актуарный или страховой метод. Этот метод основан на возможности учитывать не только количество больных, выживших в данный период, но и продолжительность их жизни. Основным преимуществом динамического метода является возможность использования всей доступной исследователю информации, т.е. в расчет выживаемости включаются данные о пациентах, наблюдаемых в течение всего периода наблюдения, за которыми наблюдение в течение периода наблюдения было неполным и за больными были потеряны для дальнейшего наблюдения. Кроме того, этот метод позволяет учитывать начало периода наблюдения: дату начала лечения, дату установления диагноза или другую дату. Кроме того, одним из преимуществ актуарного метода является то, что он не только позволяет использовать максимальный объем информации, но и дает возможность получить три типа основных показателей: наблюдаемых, скорректированных и относительных.

Были рассчитаны годовые показатели выживаемости (в течение рассматриваемого периода и кумулятивные за весь период). В нашем исследовании для расчета выживаемости также использовался метод временных точек или метод Каплана-Майера. Математическое выражение моментного метода:

$$\hat{S}(t) = \prod \left( 1 - \frac{d_t}{n_t} \right)$$

где  $d_t$  – число умерших в момент  $t$ ;

$n_t$  – число наблюдавших к моменту  $t$ ;

$\Pi$  (большая греческая буква “пи”) – символ произведения.

Метод Каплана-Майера аналогичен актуарному методу, за исключением того, что вместо кумулятивных показателей выживаемости в конце каждого года наблюдения можно рассчитывать показатели выживаемости пациентов через короткие интервалы времени, как точность регистрации даты смерти. позволять. Еще одно отличие заключается в том, что пациенты, за которыми не удалось установить связь, считались выжившими в течение всего периода времени, в течение которого они были потеряны для наблюдения.

Показатели выживаемости пациентов изучались в зависимости от пола, возраста и стадии заболевания. Кроме того, изучается выживаемость больных раком толстой кишки в зависимости от локализации, морфологической структуры и метода лечения. Для оценки статистической значимости показателей выживаемости использовались стандартные ошибки, на основании которых определялись 95% доверительные интервалы. Стандартная ошибка показателя выживаемости рассчитывается по формуле Гринвуда:

$$s.e.(P) = P \times \sqrt{\sum \frac{q_i}{r_i - d_i}}$$

или

$$s.e.(P) = P \times \sqrt{\sum \frac{q_i}{r_i (r_i - d_i)}}$$

где  $P$  – показатель выживаемости;

$q_i$  – доля умерших в определенное время;

$r_i$  – фактическое число подверженных риску умереть;

$d_i$  – число умерших в течении определенного времени

95% доверительный интервал определяется как:

$$P - 1,96 \times s.e.(P) < P < P + 1,96 \times s.e.(P)$$

Для сравнения выживаемости групп больных в отдельной точке наблюдения использовался **Z-тест**, дающий числовую оценку вероятности случайного возникновения различия.

Статистическое значение **Z** рассчитывается по формуле (11):

$$Z = \frac{|P_1 - P_2|}{\sqrt{(s.e.(P_1))^2 + (s.e.(P_2))^2}} \quad (11)$$

где  $P_1$  – показатель выживаемости для группы 1;

$P_2$  – показатель выживаемости для группы 2;

$|P_1 - P_2|$  - абсолютное значение разности;

$s.e. (P_1)$  – стандартная ошибка  $P_1$

$s.e. (P_2)$  – стандартная ошибка  $P_2$

Статистическое значение  $Z$  является нормальным отклонением, поэтому если  $Z > 1,96$ , вероятность случайного возникновения такого различия составляет  $< 5\%$ , а если  $Z > 2,56$ , такая вероятность  $< 1\%$  и т.д.

На современном этапе развития онкологии одним из важнейших аспектов борьбы с раком является изучение отдаленных результатов лечения больных злокачественными опухолями. Поэтому изучение показателей выживаемости больных злокачественными опухолями в настоящее время стало одним из важных направлений онкологической статистики. Помимо традиционных статистических показателей, таких как заболеваемость, смертность и распространенность, важным критерием оценки эффективности борьбы с раком является показатель выживаемости пациентов. Показатели выживаемости можно использовать для оценки эффективности лечения, качества медицинской помощи людям, а также для составления определенных прогнозов. В этой связи проведение одновременного анализа всех этих взаимозависимых показателей позволит в полной мере оценить состояние борьбы с онкологическими заболеваниями.

Научно-исследовательская работа была проведена на базе «Многопрофильного медицинского центра» акимата г. Астана. Структура исследовательской работы соответствует современным этическим нормам и требованиям. Протокол исследования одобрен этическим комитетом (Приложение В). Исследование проводилось в 2 этапа: ретроспективный анализ ( $n=150$ ) и проспективное одноцентровое исследование ( $n=125$ ).

*1 этап – ретроспективное исследование.*

Первый этап исследования проводился с целью выявления факторов, которые могли потенциально влиять на общую одногодичную, трехлетнюю и пятилетнюю, а также на трехлетнюю безрецидивную выживаемость. Сплошная выборка была сформирована из 150 больных с диагнозом злокачественное новообразование ободочной кишки I, II, III стадии, которым была произведена хирургическая операция в условиях ГКП на ПХВ «Онкологического центра» Акимата г. Астана в период с 2012 по 2017 годы. В исследование не вошли амбулаторные карты больных с диагнозом злокачественное новообразование ободочной кишки IV стадии, рак прямой кишки. Анализировались такие факторы, как возраст, пол, локализация опухоли по Международной классификации болезней 10-го пересмотра, стадия TNM, гистологический тип опухоли, дифференцировка опухолевой клетки, адъювантная химиотерапия,

сопутствующая патология, хирургические осложнения в раннем послеоперационном периоде, функциональные осложнения после хирургического лечения рака ободочной кишки, электролитные нарушения и нутритивную недостаточность, возникшие в течение 1 года после операций. Информация о стадии злокачественного новообразования по классификации TNM была основана на результатах гистологического исследования. Клиническая характеристика и долгосрочные осложнения получены из медицинских карт больных. Общая выживаемость рассчитывалась с момента оперативного вмешательства до периода смерти по любым причинам, либо до конца наблюдения (цензурированные). Безрецидивная выживаемость рассчитывалась с момента оперативного вмешательства до периода развития рецидива, либо до конца наблюдения или смерти по иной причине. Дизайн I этапа исследования представлен на рисунке 14.

Согласно данным таблицы 5 средний возраст больных после хирургического лечения рака ободочной кишки составил 61 год (range 19–82), отмечалось преобладание больных старше 60-69 лет (66,7%), мужчин 73 (48,7%), женщин 77 (51,3%%). III стадия рака встречалась с наибольшей частотой (64,7%). Локализация рака в восходящей и нисходящей части ободочной кишки встречалась с одинаковой частотой. Правосторонняя и левосторонняя гемиколэктомия имела схожие показатели распространённости, в то время как с меньшей частотой встречались виды операции как резекция поперечно-ободочной кишки и резекция кишечника с формированием стомы.



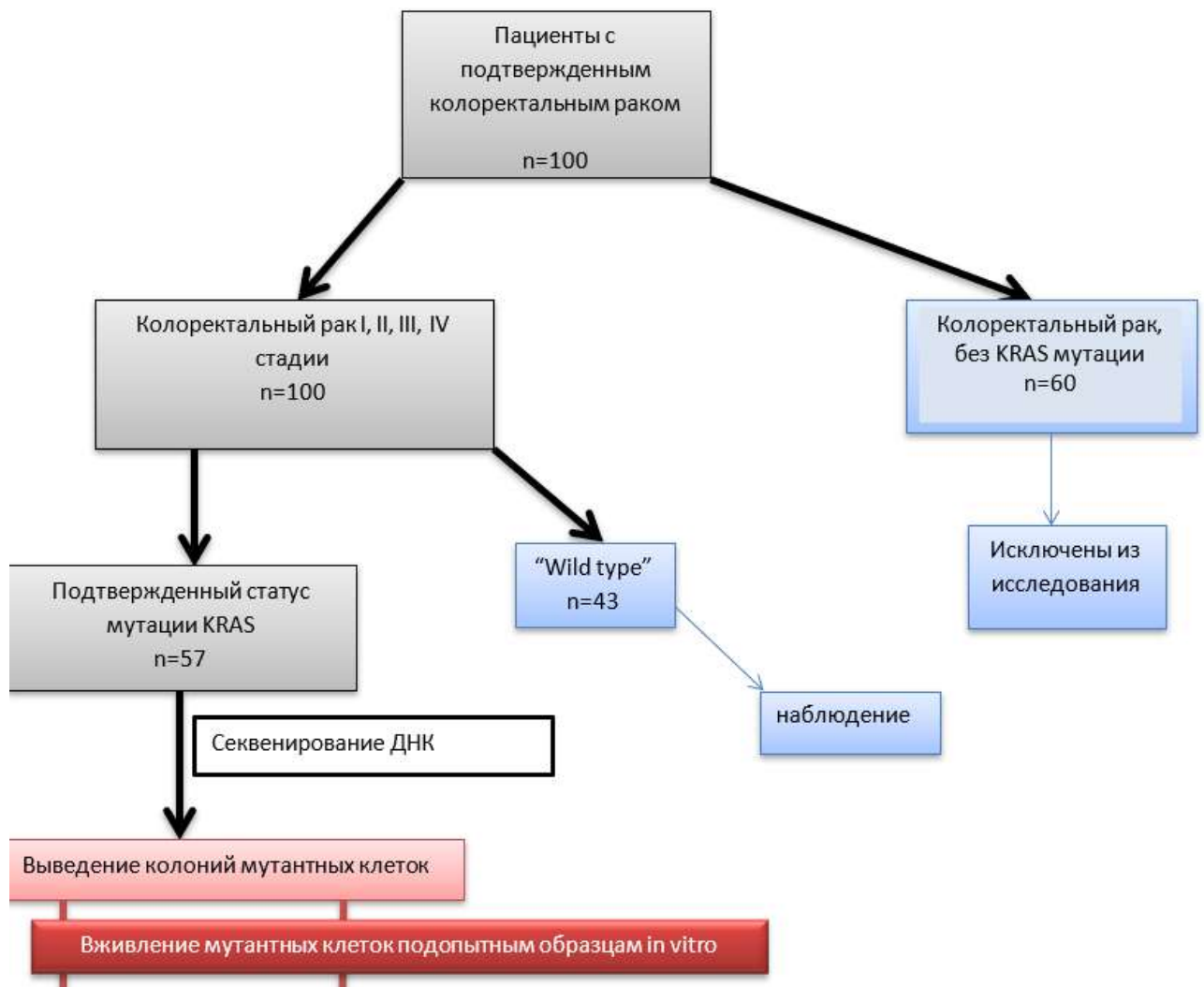


Рисунок 5 – Дизайн I этапа исследования

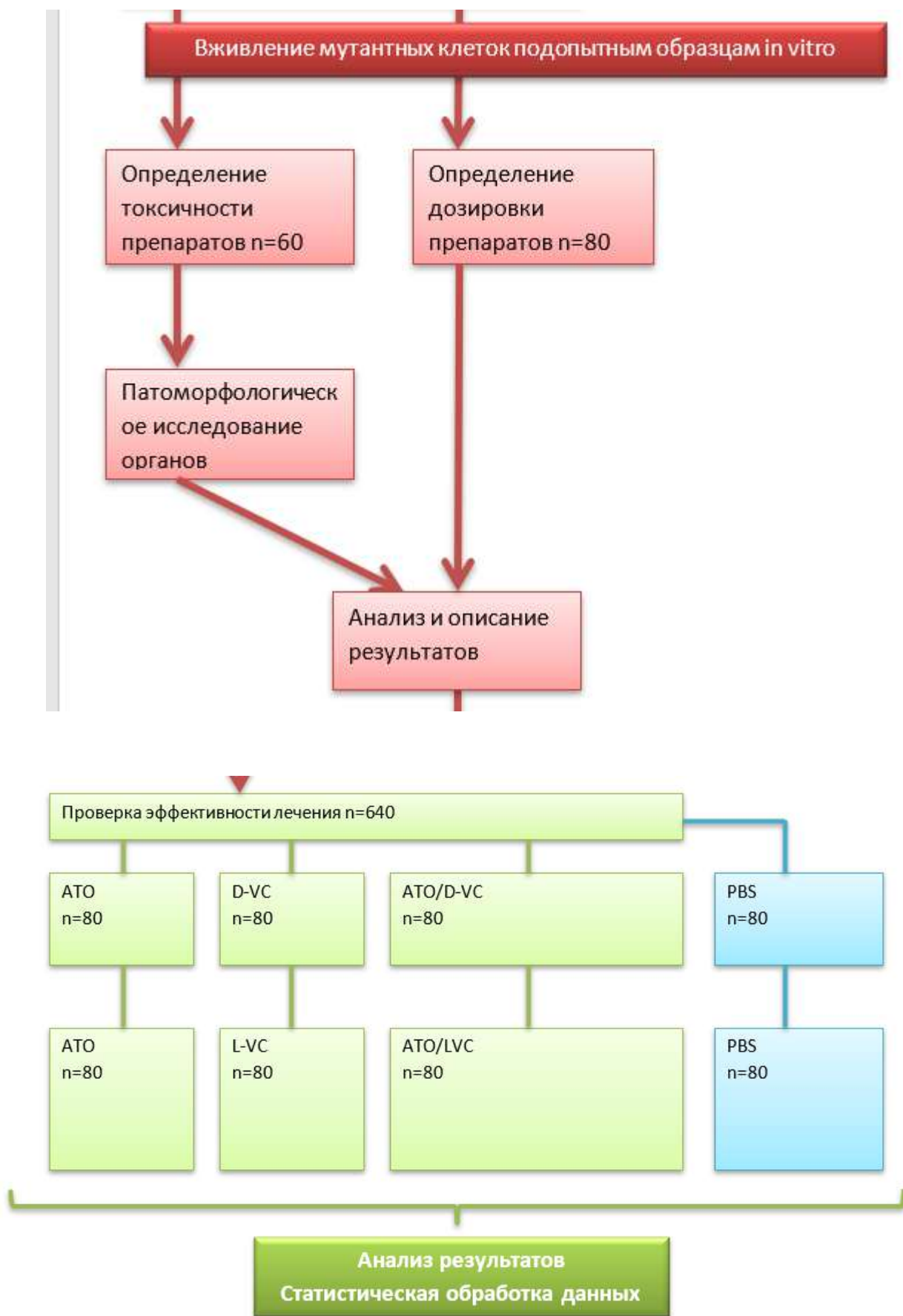


Рисунок 6 – Дизайн II этапа исследования

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Клинико-эпидемиологические характеристика больных КРР

В исследовании приняли участие 60 пациентов с раком прямой кишки. Средний возраст больных раком прямой кишки составил  $68 \pm 11$  лет, среди них было 32 женщины и 28 мужчин. Средняя продолжительность пребывания в больнице составляет 14 дней. Подробная информация о пациентах с КРР представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Описательная характеристика количественных показателей больных с КРР

Показатели	$M \pm SD / Me$	95% ДИ / $Q_1 - Q_3$	n	min	max
Возраст, $M \pm SD$	$68 \pm 11$	65 – 71	60	44	85
Длительность госпитализации, Me	14	9 – 22	60	4	33
Безрецидивность (дни), Me	254	177 – 773	60	10	917
Продолжительность жизни, Me	298	204 – 790	60	10	1117

Таблица 2 – Описательная статистика категориальных показателей больных КРР

Показатели	Категории	Абс.	%	95% ДИ
Пол	Ж	32	53,3	40,0 – 66,3
	М	28	46,7	33,7 – 60,0
Локализация	С-г печеночного изгиба толстой кишки	10	16,7	8,3 – 28,5
	С-г прямой кишки	18	30,0	18,8 – 43,2
	С-г селезеночного угла толстого кишечника	3	5,0	1,0 – 13,9
	С-г сигмовидной кишки	17	28,3	17,5 – 41,4

	С-г восходящего отдела ободочной кишки	11	18,3	9,5 – 30,4
	С-г ректосигмоидного соединения	1	1,7	0,0 – 8,9
Стадия	I	6	10,0	3,8 – 20,5
	II	24	40,0	27,6 – 53,5
	III	20	33,3	21,7 – 46,7
	IV	10	16,7	8,3 – 28,5
Локализация метастазов	0	50	83,3	71,5 – 91,7
	Легкое	2	3,3	0,4 – 11,5
	Печень	8	13,3	5,9 – 24,6
Операция	Брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки	4	6,7	1,8 – 16,2
	Лапароскопическая правосторонняя гемиколэктомия	1	1,7	0,0 – 8,9
	Лапароскопическая резекция	5	8,3	2,8 – 18,4
	Левосторонняя гемиколэктомия	2	3,3	0,4 – 11,5
	Операция Гартмана	6	10,0	3,8 – 20,5
	Передняя резекция	15	25,0	14,7 – 37,9
	Правосторонняя гемиколэктомия	23	38,3	26,1 – 51,8

	Трансанальная эндоректальная низводящая проктопластика	2	3,3	0,4 – 11,5
	Трансверзостома	2	3,3	0,4 – 11,5
Послеоперационные осложнения	Абсцесс передней брюшной стенки	2	3,3	0,4 – 11,5
	Дыхательная недостаточность	2	3,3	0,4 – 11,5
	Несосотяетельность илеотрансверзоанастомоза, перитонит	2	3,3	0,4 – 11,5
	Несостоятельность анастамоза	2	3,3	0,4 – 11,5
	нет	46	76,7	64,0 – 86,6
	Перитонит	2	3,3	0,4 – 11,5
	Рубцовое сужение анастомоза	2	3,3	0,4 – 11,5
	Тонкокишечный свищ	2	3,3	0,4 – 11,5
Гистологическая дифференцировка	Высокодифференцированная аденокарцинома	6	10,0	3,8 – 20,5
	Низкодифференцированная аденокарцинома	6	10,0	3,8 – 20,5
	Низкодифференцированная нейроэндокринная карцинома	2	3,3	0,4 – 11,5
	Умереннодифференцированная аденокарцинома	46	76,7	64,0 – 86,6
WT	KRAS WT мутация не обнаружена	51	85,0	73,4 – 92,9
	KRAS WT мутация обнаружена	9	15,0	7,1 – 26,6

Курс химиотерапии	0	28	46,7	33,7 – 60,0
	FOLFIRI	2	3,3	0,4 – 11,5
	FOLFOX	10	16,7	8,3 – 28,5
	FOLFOX+FOLFIRI	4	6,7	1,8 – 16,2
	FOLFOXIRI	16	26,7	16,1 – 39,7

Клинико-патологическая характеристика колоректального рака при различном статусе KRAS. Среди 60 пациентов с раком толстой кишки у 51 были мутации KRAS, а у остальных 9 — KRAS дикого типа (KRAS WT). Классификация участников исследования по статусу KRAS не выявила существенной разницы в расположении первичной опухоли ( $p = 0,413$ ). Однако между PSTC и LSTC наблюдалась значительная разница по полу ( $p = 0,014$ ). Так, у женщин опухоли чаще всего локализуются в прямой кишке (13) и восходящей ободочной кишке (11), а у мужчин — в сигмовидной кишке (11) и печеночном изгибе ободочной кишки (8). По статусу KRAS опухоли чаще всего локализовались в печеночном изгибе толстой кишки (30,6%), в восходящей ободочной кишке (25%) и в сигмовидной кишке (19,4%) (рисунок 7). Так, у больных с опухолями печеночного изгиба толстой кишки медиана возраста составила 60 лет ( $Q_1$ - $Q_3$ , 57-63), а у больных с опухолями восходящей ободочной кишки - 74 года ( $Q_1$ - $Q_3$ , 70-77) (Таблица 3).

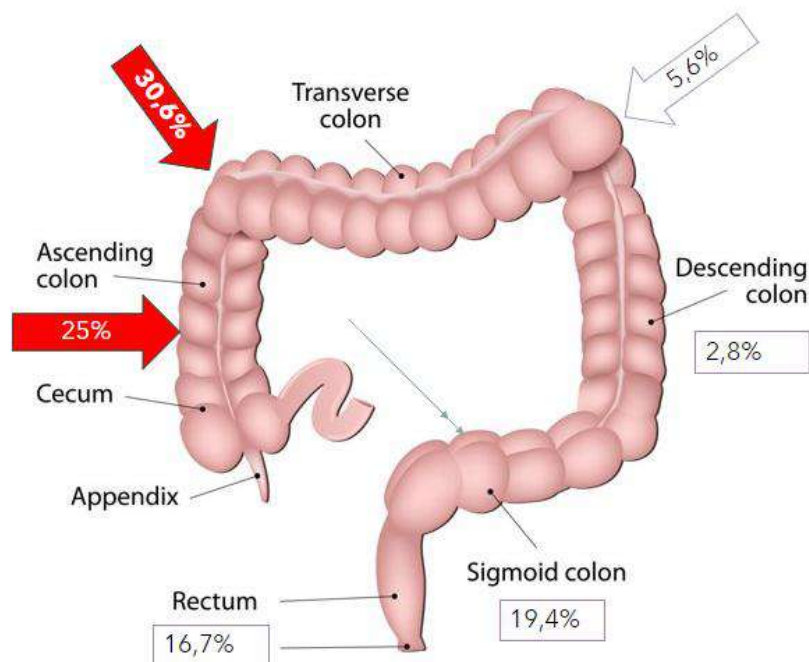


Рисунок 7 – Локализация опухоли с *KRAS* мутацией в ободочной и прямой кишке.

Нами была выявлена связь между возрастом и локализацией опухоли при колоректальном раке. Как видно из Таблицы 3 средний возраст пациентов с с-г сигмовидной кишки и восходящего отдела ободочной кишки составил 74 года ( $Q_1 - Q_3$ , 70-77), в возрасте 60 лет ( $Q_1 - Q_3$ , 57-63) опухоль локализовалась в печеночном изгибе толстой кишки. Также для рака прямой кишки средний возраст составил 68 лет, в то время как для опухоли селезеночного угла толстой кишки средний возраст 49 лет.

Таблица 3 – Ассоциативная связь между показателями возраста и локализации опухоли при КРР.

Локализация	Возраст			p
	Me	$Q_1 - Q_3$	n	
С-г печеночного изгиба толстой кишки	60	57 – 63	10	0,014* p <sub>C-г</sub> восходящего отдела ободочной кишки – С-г печеночного изгиба толстой кишки = 0,021
С-г прямой кишки	68	62 – 76	18	
С-г селезеночного угла толстого кишечника	49	49 – 62	3	
С-г сигмовидной кишки	74	67 – 76	17	

С-г восходящего отдела ободочной кишки	74	70 – 77	11	
С-г ректосигмоидного соединения	63	63 – 63	1	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Также был проведен анализ пациентов по месту рождения. Учитывая, что набор пациентов велся в ГКП на ПХВ «Многопрофильном медицинском центре» акимата города Астана, основной контингент пациентов проживал в Астане и Акмолинской области, поэтому как видно из Таблицы 4 статистически значимых показателей распределения по областям не выявлено.

Таблица 4 - Описательная статистика категориальных переменных в зависимости от типа KRAS мутации

Показатели	Категории	Тип KRAS мутации		p
		KRAS WT	KRAS G12D	
Регион, абс. (%)	Абайская	0 (0,0%)	1 (1,8%)	0,105
	Акмолинская	6 (14,0%)	12 (21,1%)	
	Актюбинская	2 (4,7%)	0 (0,0%)	
	Астана	23 (53,5%)	31 (54,4%)	
	Атырауская	0 (0,0%)	3 (5,3%)	
	ВКО	2 (4,7%)	0 (0,0%)	
	ЗКО	0 (0,0%)	2 (3,5%)	
	Карагандинская	1 (2,3%)	5 (8,8%)	
	Костанайская	2 (4,7%)	2 (3,5%)	
	Кызылординская	2 (4,7%)	1 (1,8%)	
	Павлодарская	1 (2,3%)	0 (0,0%)	
	СКО	2 (4,7%)	0 (0,0%)	



	Улытауская	1 (2,3%)	0 (0,0%)
	Шымкент	1 (2,3%)	0 (0,0%)

Нами был проведен анализ лейкоцитарных индексов в зависимости от локализации первичной опухоли (Таблица 5).

Таблица 5 – Анализ лейкоцитарных индексов в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатели	Категории	Локализация первичной опухоли			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Индекс Гаркави	Правосторонний рак толстой кишки	0,24	0,13 – 0,38	32	0,003* P <sub>Левосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки = 0,004</sub> P <sub>Прямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки = 0,022</sub>
	Левосторонний рак толстой кишки	0,43	0,30 – 0,55	39	
	Прямая кишка	0,43	0,27 – 0,48	29	
Индекс иммунореактивности	Правосторонний рак толстой кишки	2,28	1,91 – 3,19	32	0,010* P <sub>Левосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки = 0,009</sub>
	Левосторонний рак толстой кишки	3,97	2,58 – 5,83	39	
	Прямая кишка	2,72	2,09 – 3,75	29	
Индекс лейкоцитов и СОЭ	Правосторонний рак толстой кишки	0,23	0,17 – 0,54	32	0,288

	Левосторонний рак толстой кишки	0,40	0,20 – 0,68	39	
	Прямая кишка	0,34	0,15 – 2,02	29	
Индекс агрунолоцитов и СОЭ	Правосторонний рак толстой кишки	0,72	0,44 – 1,80	32	0,002* P Левосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки = 0,006
	Левосторонний рак толстой кишки	1,53	0,85 – 2,79	39	
	Прямая кишка	1,19	0,89 – 5,33	29	P Прямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки = 0,005
Показатель интоксикации	Правосторонний рак толстой кишки	1,64	0,84 – 2,70	32	<0,001* P Левосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки <0,001
	Левосторонний рак толстой кишки	0,30	0,14 – 0,82	39	
	Прямая кишка	0,34	0,13 – 0,85	29	P Прямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки <0,001

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Согласно таблице, при анализе индекса Гаркави, индекса иммунного ответа, индекса агрулоцитов и СОЭ, индекса токсичности в зависимости от локализации первичной опухоли выявлена значимая разница ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,010$ ,  $p = 0,002$ ,  $p < 0,001$  соответственно) (используемый метод: тест Краскела–Уоллиса). При оценке лейкоцитарного индекса и СОЭ в зависимости от первичной локализации опухоли статистически значимой разницы выявить не удалось ( $p = 0,288$ ) (использованный метод: тест Краскела–Уоллиса). Согласно

нашим данным показатель Индекса Гаркави, Индекса иммунореактивности, Индекса агранулоцитов и СОЭ и Индекса интоксикации повышены при левостороннем колоректальном раке. Как мы знаем, существует несколько клинических форм КРР и при левосторонней локализации опухоли характерна псевдовоспалительная форма. Наши данные также подтверждают это.

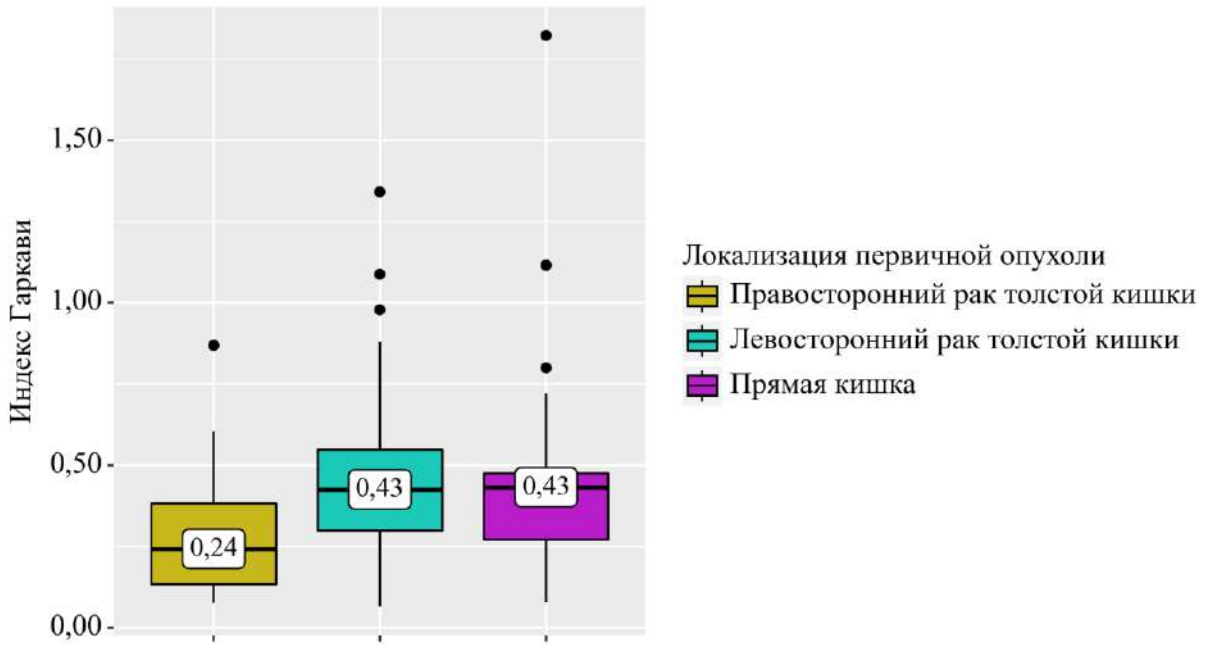


Рисунок 8 – Анализ Индекса Гаркави в зависимости от локализации первичной опухоли

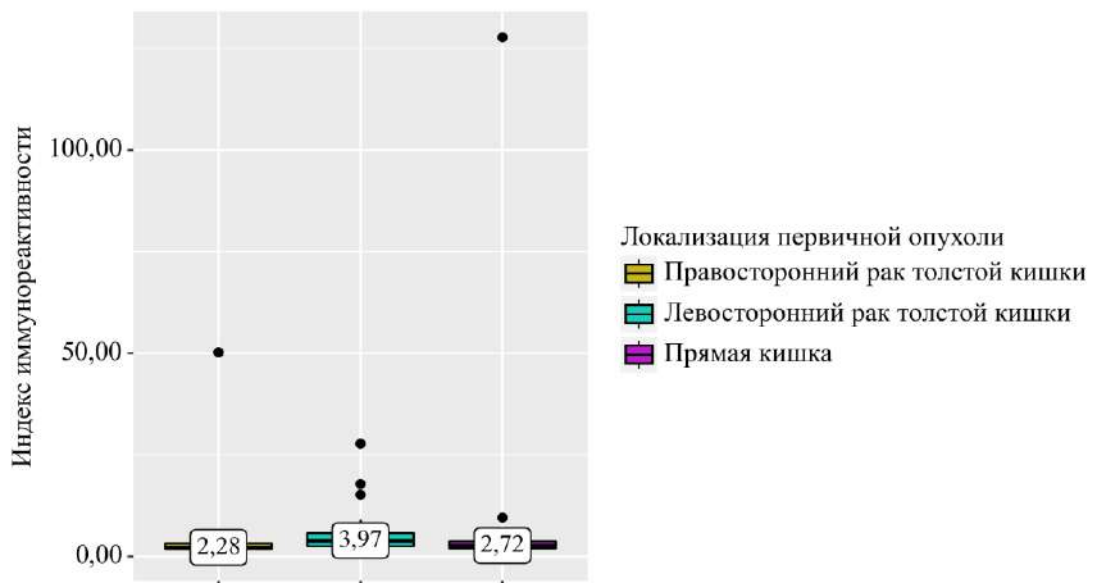


Рисунок 9 – Анализ индекса иммунореактивности в зависимости от локализации первичной опухоли

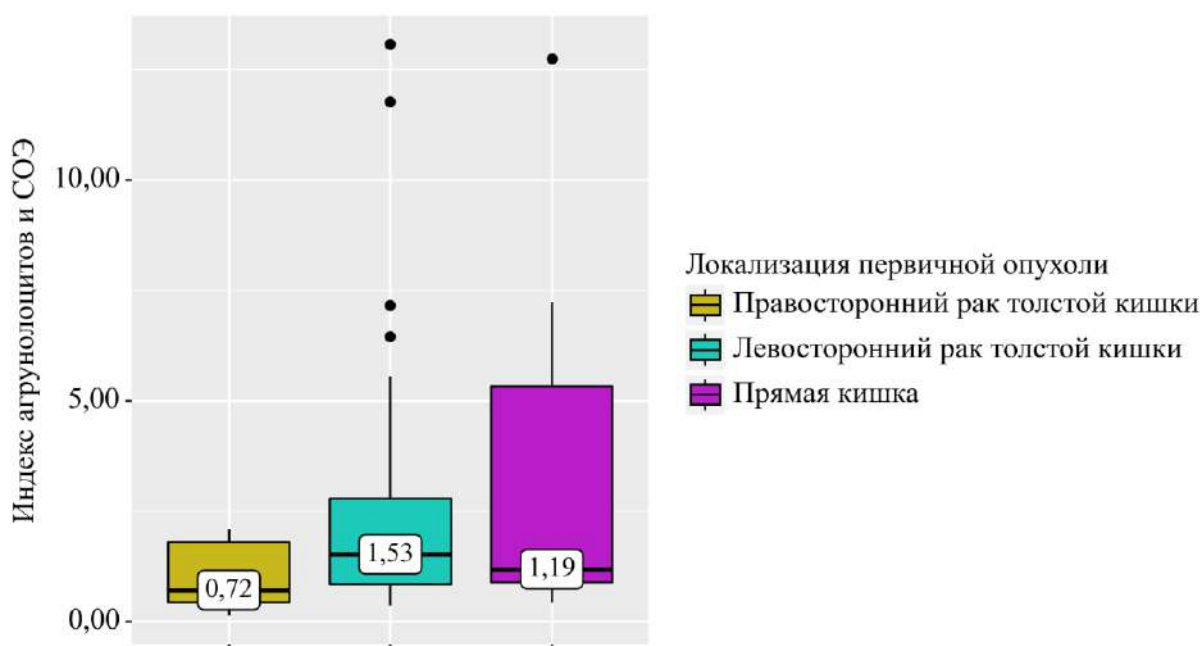


Рисунок 10 – Анализ индекса агрунолоцитов и СОЭ в зависимости от локализации первичной опухоли

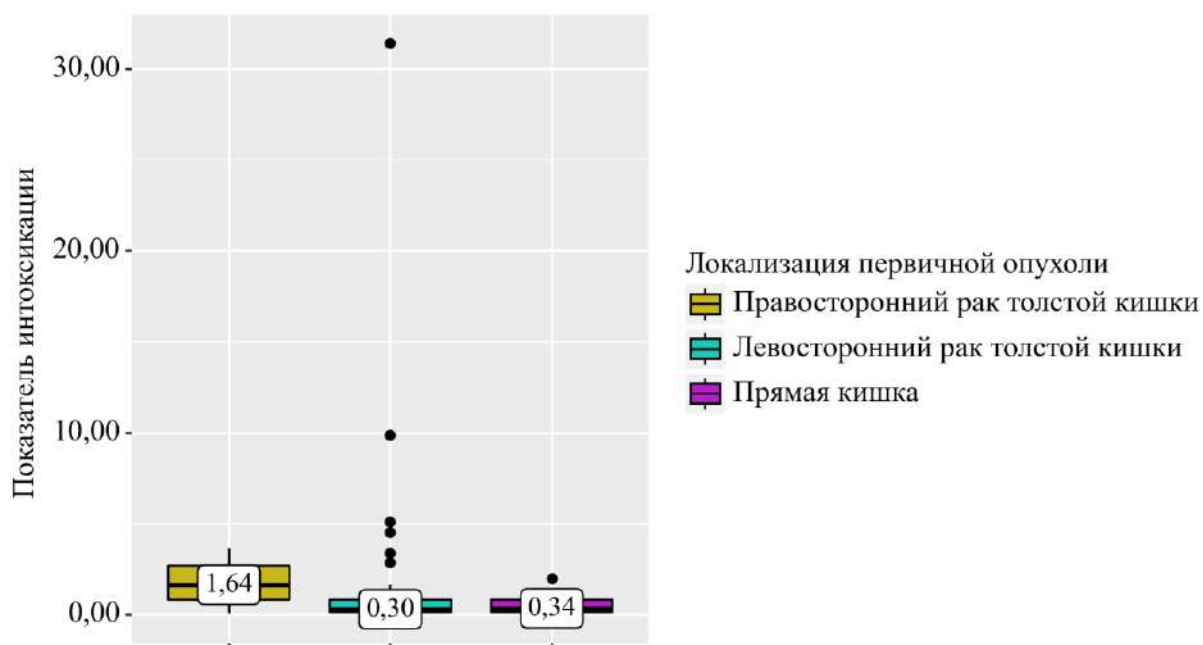


Рисунок 11 – Анализ показателя интоксикации в зависимости от локализации первичной опухоли

Мы также выполнили анализ зависимости общего анализа крови, глюкозы и фибриногена до операции в зависимости от локализации первичной опухоли (Таблица 6).

Таблица 6 – Анализ ОАК, Глюкозы и Фибриногена до операции в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатели	Категории	Локализация первичной опухоли			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Лейкоциты до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	9,15	8,42 – 12,89	32	0,012* РЛевосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки = 0,015 РПрямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки = 0,049
	Левосторонний рак толстой кишки	6,69	5,67 – 9,01	39	
	Прямая кишка	7,99	4,95 – 10,10	29	
Лимфоциты до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	19,35	10,90 – 25,15	32	0,023* РЛевосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки = 0,019
	Левосторонний рак толстой кишки	24,80	19,30 – 32,10	39	
	Прямая кишка	21,90	12,30 – 29,00	29	
Нейтрофилы до операции (%) (%)	Правосторонний рак толстой кишки	79,90	64,20 – 84,53	32	<0,001* РЛевосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки <0,001 РПрямая кишка – Правосторонний рак толстой
	Левосторонний рак толстой кишки	61,40	56,25 – 67,55	39	
	Прямая кишка	62,70	59,80 – 70,00	29	

					кишки = 0,007
Нейтрофилы до операции (abs) (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	6,70	5,68 – 11,80	32	<0,001* PЛевосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки <0,001 PПрямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки <0,001
	Левосторонний рак толстой кишки	3,54	2,33 – 4,68	39	
	Прямая кишка	3,84	3,55 – 5,43	29	
Моноциты до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	8,39	6,00 – 10,35	32	0,148
	Левосторонний рак толстой кишки	7,00	5,50 – 8,40	39	
	Прямая кишка	7,80	6,80 – 9,90	29	
Эозинофилы до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	1,15	0,01 – 2,70	32	0,362
	Левосторонний рак толстой кишки	1,30	0,36 – 3,25	39	
	Прямая кишка	1,20	0,37 – 3,60	29	
Базофилы до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	0,10	0,10 – 0,43	32	0,138
	Левосторонний рак толстой кишки	0,30	0,20 – 0,60	39	
	Прямая кишка	0,30	0,10 – 0,90	29	

СОЭ до операции (мм/ч)	Правосторонний рак толстой кишки	34,00	17,00 – 54,00	32	0,007* РЛевосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки = 0,016 РПрямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки = 0,015
	Левосторонний рак толстой кишки	20,00	12,00 – 32,50	39	
	Прямая кишка	21,00	5,00 – 36,00	29	
Эритроциты до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	4,56	3,81 – 4,69	32	0,439
	Левосторонний рак толстой кишки	4,33	4,10 – 4,63	39	
	Прямая кишка	4,22	3,38 – 4,67	29	
Гемоглобин до операции (г/л)	Правосторонний рак толстой кишки	118,00	98,75 – 131,25	32	0,394
	Левосторонний рак толстой кишки	116,00	97,50 – 130,00	39	
	Прямая кишка	106,00	82,00 – 131,00	29	
Гематокрит до операции (%)	Правосторонний рак толстой кишки	35,75	29,70 – 39,50	32	0,583
	Левосторонний рак толстой кишки	35,10	30,55 – 40,10	39	
	Прямая кишка	34,20	25,40 – 39,40	29	

Тромбоциты до операции (/л)	Правосторонний рак толстой кишки	331,50	164,00 – 425,00	32	0,940
	Левосторонний рак толстой кишки	265,00	226,00 – 358,00	39	
	Прямая кишка	277,00	249,00 – 390,00	29	
Глюкоза до операции (ммоль/л)	Правосторонний рак толстой кишки	5,68	4,81 – 6,22	32	0,659
	Левосторонний рак толстой кишки	5,38	5,10 – 6,32	39	
	Прямая кишка	5,51	4,83 – 6,86	29	
Фибриноген до операции (г/л)	Правосторонний рак толстой кишки	4,02	3,51 – 4,71	32	0,653
	Левосторонний рак толстой кишки	3,67	2,89 – 4,94	39	
	Прямая кишка	4,27	2,88 – 5,10	29	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

В результате анализа лейкоцитов до операции, лимфоцитов до операции, нейтрофилов до операции (%-ный показатель), нейтрофилов до операции (абсолютный показатель), СОЭ до операции в зависимости от локализации первичной опухоли, были установлены статистически значимые различия ( $p = 0,012$ ,  $p = 0,023$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,007$  соответственно) (используемые методы: Критерий Краскела–Уоллиса). При анализе моноцитов до операции, эозинофилов до операции, базофилов до операции, эритроциты до операции, гемоглобина до операции, гематокрита до операции, тромбоцитов до операции, глюкозы до операции, фибриногена до операции в зависимости от локализации первичной опухоли, нам не удалось установить статистически значимых различий ( $p = 0,148$ ,  $p = 0,362$ ,  $p = 0,138$ ,  $p = 0,439$ ,  $p = 0,394$ ,  $p = 0,583$ ,  $p = 0,940$ ,



$p = 0,659$ ,  $p = 0,653$  соответственно) (используемые методы: Критерий Краскела–Уоллиса) (Рисунок 12-16).

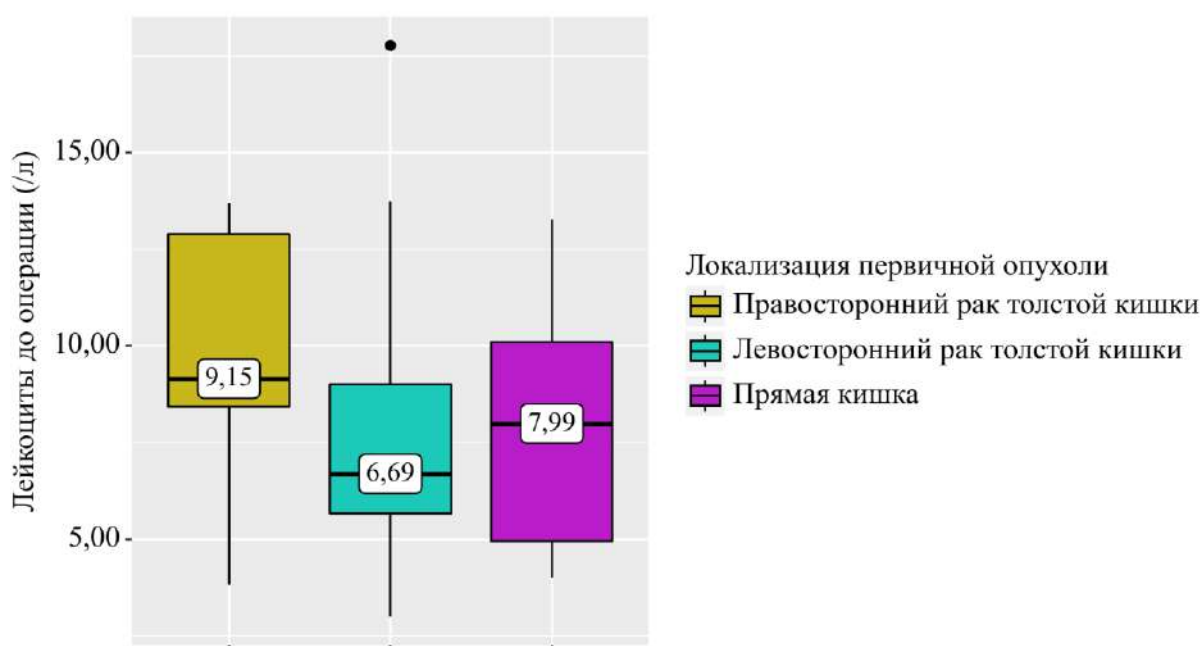


Рисунок 12 – Анализ лейкоцитов до операции в зависимости от локализации первичной опухоли

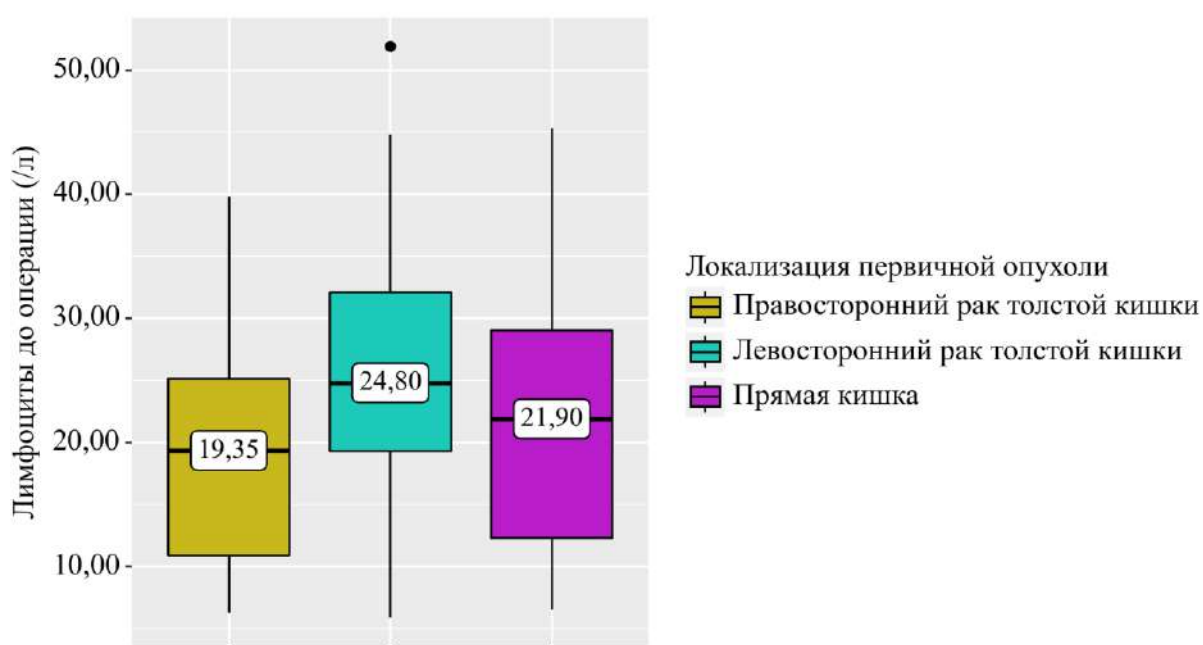


Рисунок 13 – Анализ лимфоцитов до операции в зависимости от локализации первичной опухоли

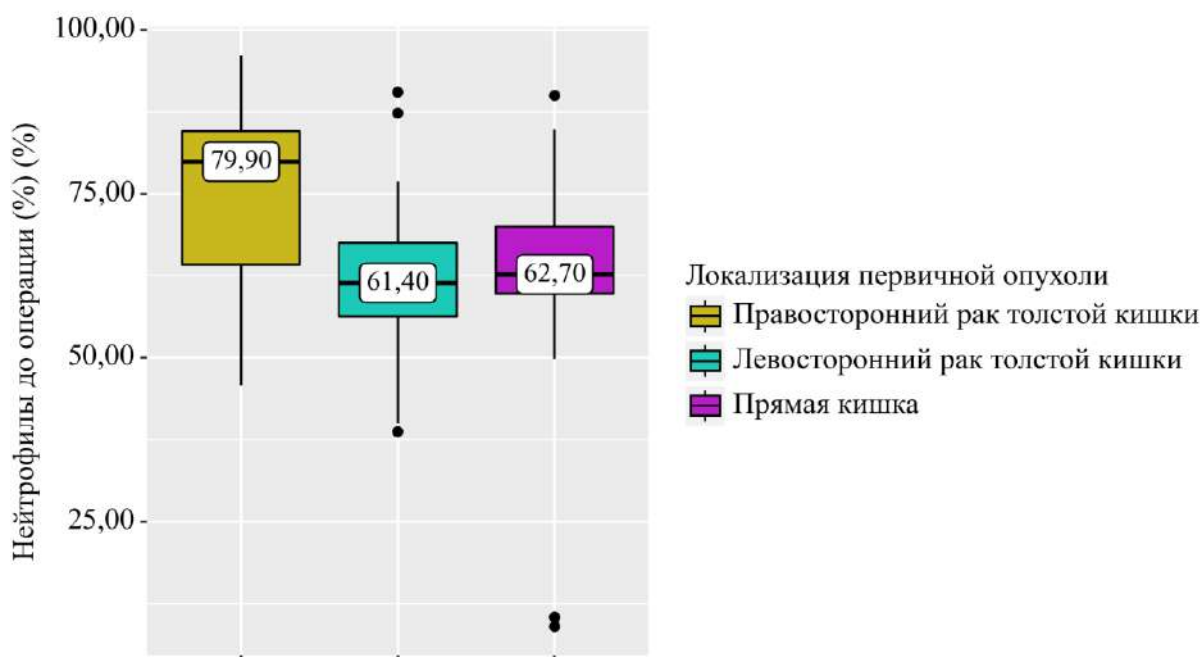


Рисунок 14 – Анализ нейтрофилов до операции (%) в зависимости от локализации первичной опухоли

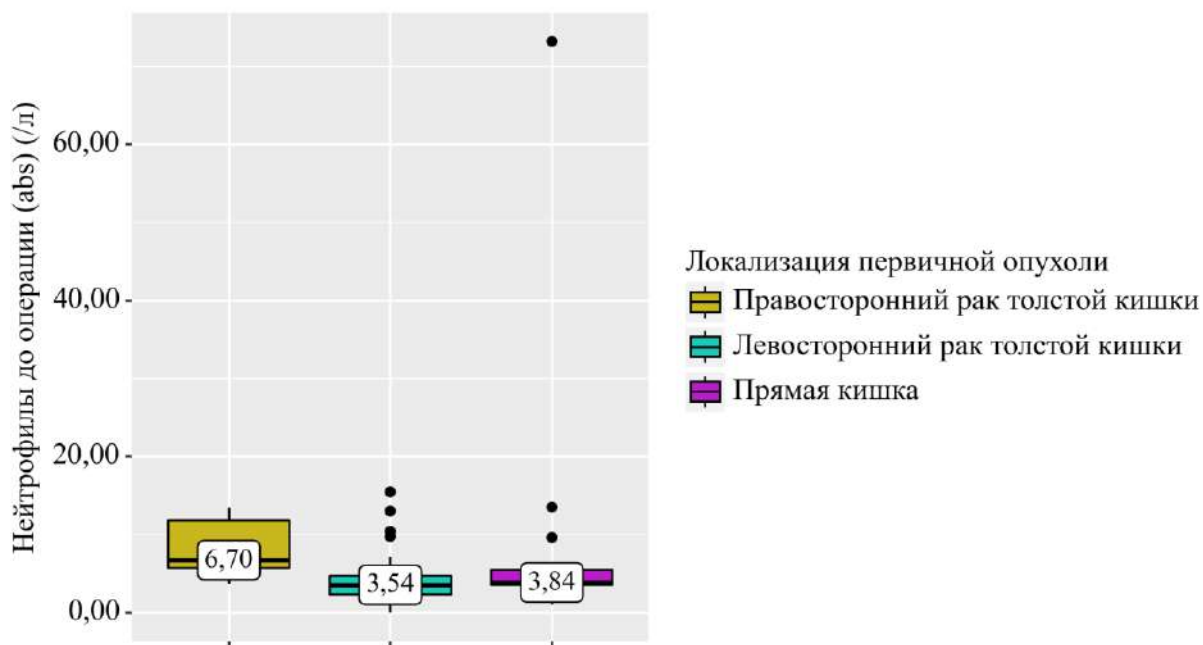


Рисунок 15 – Анализ нейтрофилов до операции (abs) в зависимости от локализации первичной опухоли

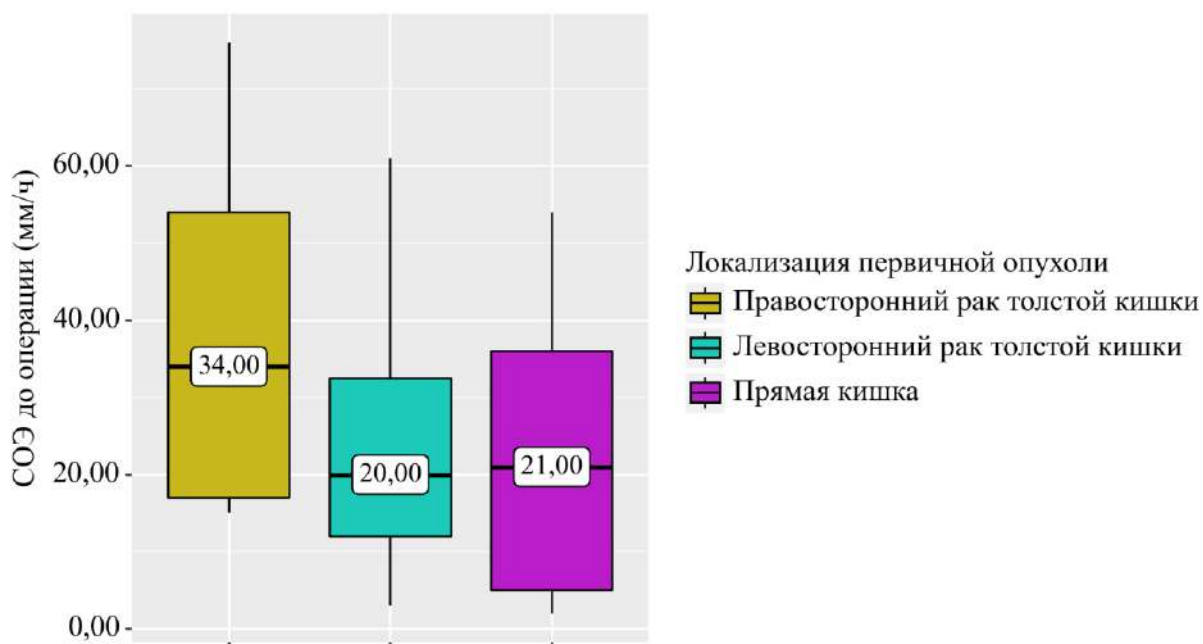


Рисунок 16 – Анализ СОЭ до операции в зависимости от локализации первичной опухоли

Таблица 7 – Анализ веса в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Вес (кг)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	60,00	56,50 – 63,00	32	$<0,001^*$ $P_{\text{Правосторонний рак толстой кишки – Левосторонний рак толстой кишки}} <0,001$ $P_{\text{Прямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки}} = 0,008$
	Левосторонний рак толстой кишки	77,00	65,50 – 84,00	39	
	Прямая кишка	70,00	61,00 – 78,00	29	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Согласно полученным данным при сопоставлении веса в зависимости от локализации первичной опухоли, были установлены существенные различия ( $p < 0,001$ ) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса) (Таблица 7) (Рисунок 17).

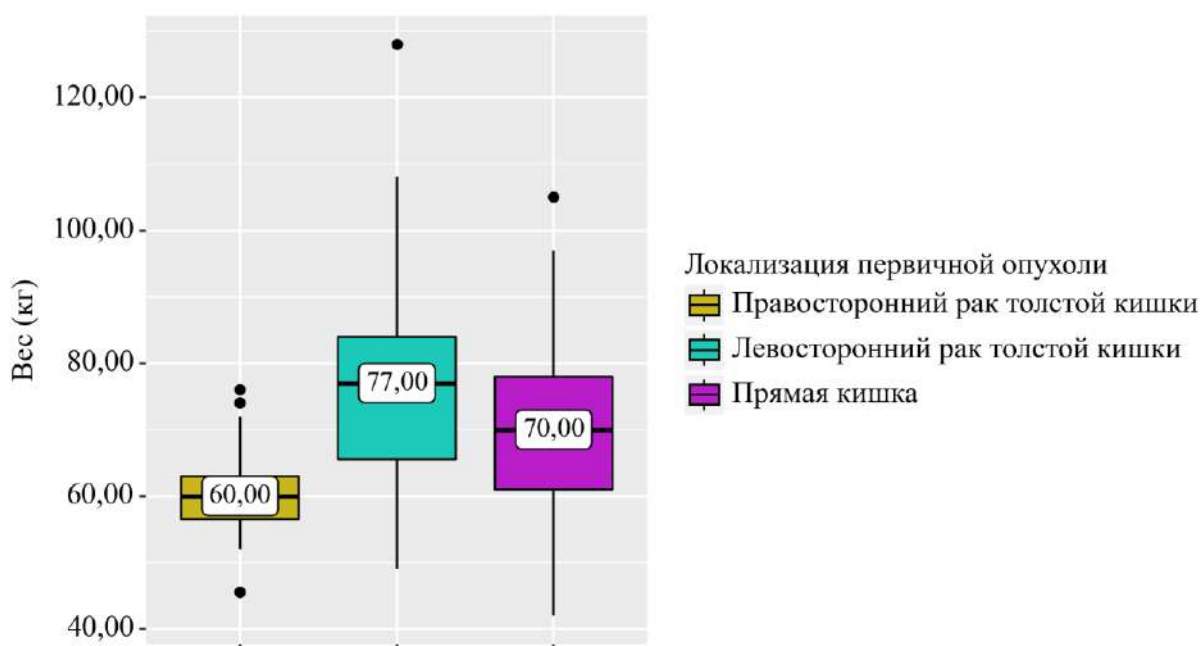


Рисунок 17 – Анализ веса в зависимости от локализации первичной опухоли

Был проведен анализ ИМТ в зависимости от Локализации первичной опухоли (Таблица 8). При левостороннем КРР и раке прямой кишки отмечается повышенный ИМТ – 26, при правостороннем 22.

Таблица 8 – Анализ ИМТ в зависимости от Локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	22,00	20,00 – 23,39	32	<0,001* p <sub>Левосторонний рак толстой кишки – Правосторонний рак толстой кишки</sub> <0,001 p <sub>Прямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки</sub> = 0,003
	Левосторонний рак толстой кишки	26,75	22,41 – 31,54	39	
	Прямая кишка	26,00	22,00 – 29,00	29	

\* – различия показателей статистически значимы (p <0,05)

В результате анализа ИМТ в зависимости от Локализации первичной опухоли, были установлены статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса) (Рисунок 18).

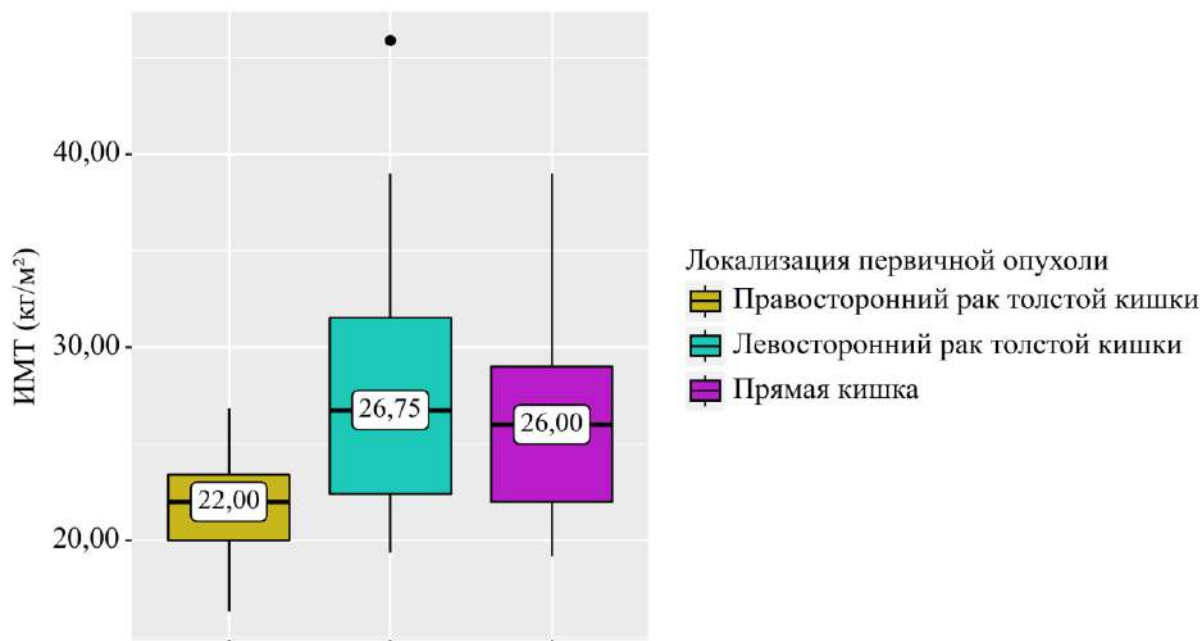


Рисунок 18 – Анализ ИМТ в зависимости от локализации первичной опухоли

При анализе пола в зависимости от локализации первичной опухоли нами не было выявлено статистически значимых изменений (Таблица 9).

Таблица 9 – Анализ пола в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Локализация первичной опухоли			p
		Правосторонний рак толстой кишки	Левосторонний рак толстой кишки	Прямая кишка	
Пол	Ж	9 (28,1)	16 (41,0)	11 (37,9)	0,513
	М	23 (71,9)	23 (59,0)	18 (62,1)	

При сопоставлении пола в зависимости от Локализации первичной опухоли, не удалось выявить статистически значимых различий ( $p = 0,513$ ) (используемый метод: *Хи-квадрат Пирсона*).

Однако при анализе возраста в зависимости от локализации первичной опухоли нами определено, что правосторонний рак характерен для пациентов в возрасте 73,5, а левосторонний рак для 65 лет (Таблица 10).

Таблица 10 – Анализ возраста в зависимости от Локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Возраст			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	73,50	62,00 – 77,00	32	0,039*
	Левосторонний рак толстой кишки	65,00	58,50 – 70,50	39	
	Прямая кишка	67,00	60,00 – 74,00	29	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

В результате сопоставления возраста в зависимости от локализации первичной опухоли, нами были выявлены статистически значимые различия ( $p = 0,039$ ) (используемый метод: *Критерий Краскела–Уоллиса*) (Рисунок 19).

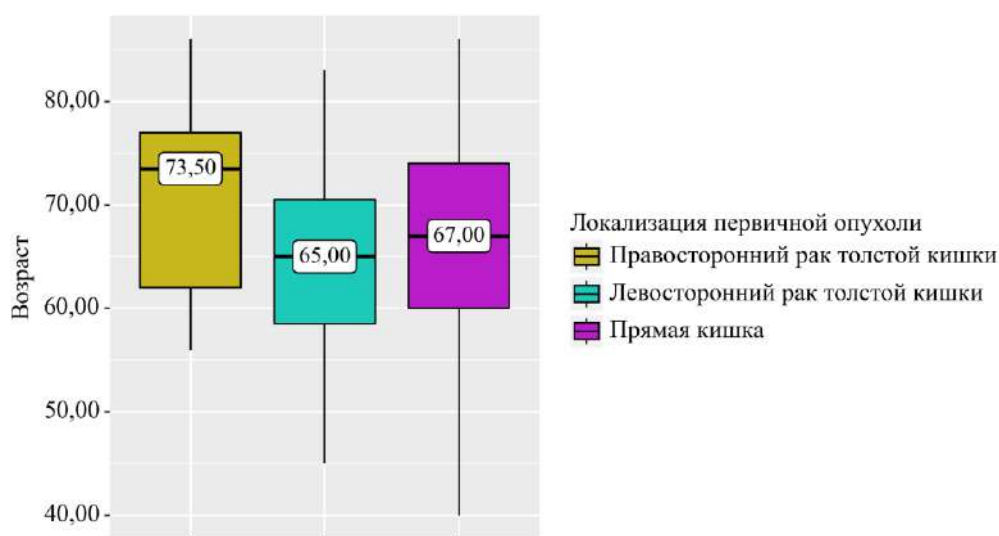


Рисунок 19 – Анализ возраста в зависимости от локализации первичной опухоли

Нами был проведен анализ безрецидивности в зависимости от локализации первичной опухоли (Таблица 11).

Таблица 11 – Анализ безрецидивности в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Безрецидивность (день)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	394,00	319,25 – 641,50	32	0,001* РПрямая кишка – Правосторонний рак толстой кишки <0,001
	Левосторонний рак толстой кишки	496,00	384,00 – 1033,00	39	
	Прямая кишка	807,00	513,00 – 1098,00	29	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Согласно представленной таблице при оценке безрецидивности в зависимости от Локализации первичной опухоли, нами были установлены статистически значимые различия ( $p = 0,001$ ) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса) (Рисунок 20).

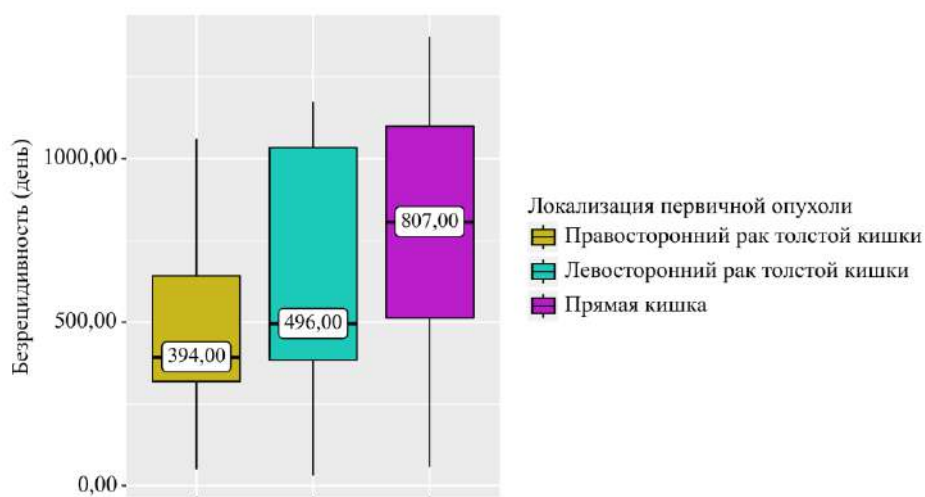


Рисунок 20 – Анализ безрецидивности в зависимости от локализации первичной опухоли

Был выполнен анализ стадии в зависимости от локализации первичной опухоли (Таблица 12).

Таблица 12 – Анализ стадии в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Локализация первичной опухоли			р
		Правосторонний рак толстой кишки	Левосторонний рак толстой кишки	Прямая кишка	
Стадия	I	0 (0,0)	1 (2,6)	5 (17,2)	0,054
	II	19 (59,4)	18 (46,2)	10 (34,5)	
	III	9 (28,1)	10 (25,6)	8 (27,6)	
	IV	4 (12,5)	10 (25,6)	6 (20,7)	

При сравнении стадии в зависимости от Локализации первичной опухоли, нам не удалось выявить значимых различий ( $p = 0,054$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона).

Анализ отдаленных метастазов в зависимости от локализации первичной опухоли не показал статистически значимых различий (Таблица 13).

Таблица 13 – Анализ отдаленных метастазов в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Локализация первичной опухоли			р
		Правосторонний рак толстой кишки	Левосторонний рак толстой кишки	Прямая кишка	
Отдаленные метастазы	кости	0 (0,0)	1 (2,6)	2 (6,9)	0,560
	легкое	0 (0,0)	2 (5,1)	2 (6,9)	
	нет	25 (78,1)	27 (69,2)	19 (65,5)	
	печень	7 (21,9)	9 (23,1)	6 (20,7)	



При сравнении отдаленных метастазов в зависимости от локализации первичной опухоли, нам не удалось выявить значимых различий ( $p = 0,560$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона).

Таблица 14 – Анализ степени дифференцировки опухоли в зависимости от Локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Локализация первичной опухоли			p
		Правосторонний рак толстой кишки	Левосторонний рак толстой кишки	Прямая кишка	
Степень дифференцировки опухоли	высокодифференцированная	2 (6,2)	3 (7,7)	6 (20,7)	0,162
	низкодифференцированная	6 (18,8)	6 (15,4)	1 (3,4)	
	умереннодифференцированная	24 (75,0)	30 (76,9)	22 (75,9)	

При сравнении степени дифференцировки опухоли в зависимости от Локализации первичной опухоли, не удалось выявить статистически значимых различий ( $p = 0,162$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Таблица 14).

Таблица 15 – Анализ длительности госпитализации в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Длительность госпитализации (день)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	21,00	14,00 – 33,00	32	0,047*
	Левосторонний рак толстой кишки	15,00	12,00 – 19,50	39	

	Прямая кишка	14,00	11,00 – 22,00	29	
--	--------------	-------	------------------	----	--

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Согласно полученным данным при сопоставлении длительности госпитализации в зависимости от локализации первичной опухоли, нами были установлены статистически значимые различия ( $p = 0,047$ ) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). При правостороннем КРР выше длительность госпитализации и в среднем составил 21 день, тогда как при раке прямой кишки и левостороннем КРР составляет соответственно 14 и 15 дней (Рисунок 21).

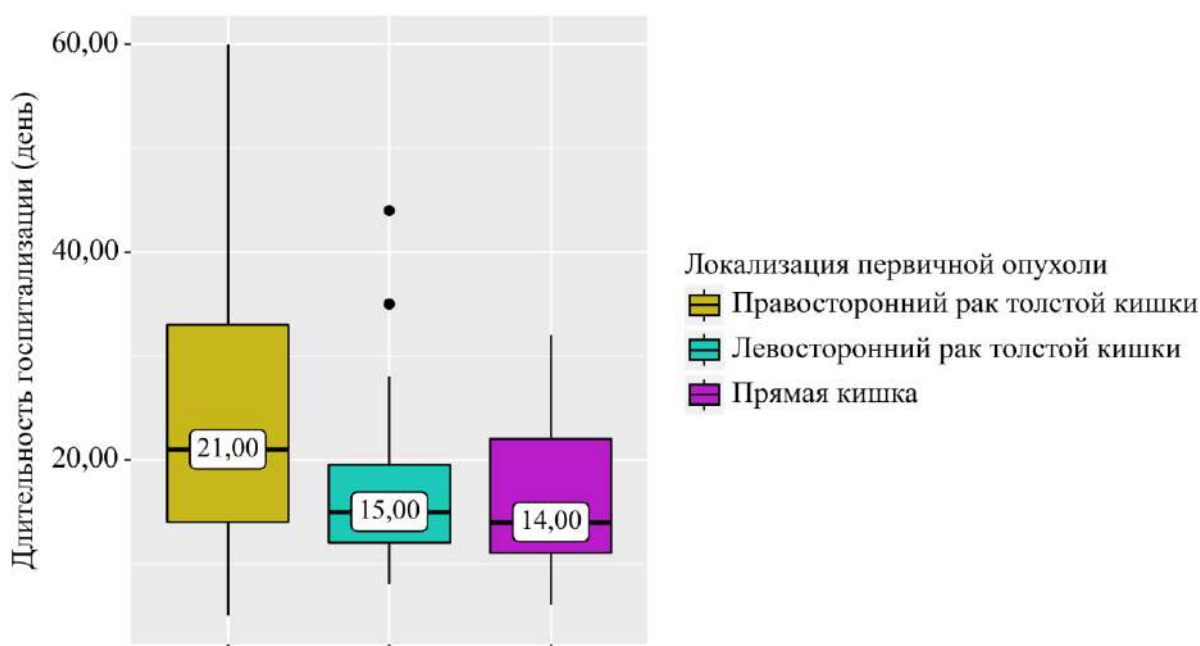


Рисунок 21 – Анализ длительности госпитализации в зависимости от локализации первичной опухоли

Таблица 16 – Анализ выживаемости в зависимости от Локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Выживаемость (день)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	433,50	337,00 – 701,50	32	0,031* РПрямая кишка –

	Левосторонний рак толстой кишки	583,00	347,00 – 1033,00	39	Правосторонний рак толстой кишки = 0,026
	Прямая кишка	807,00	512,00 – 1013,00	29	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

В результате оценки выживаемости в зависимости от Локализации первичной опухоли, были выявлены существенные различия ( $p = 0,031$ ) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса) (Таблица 16).

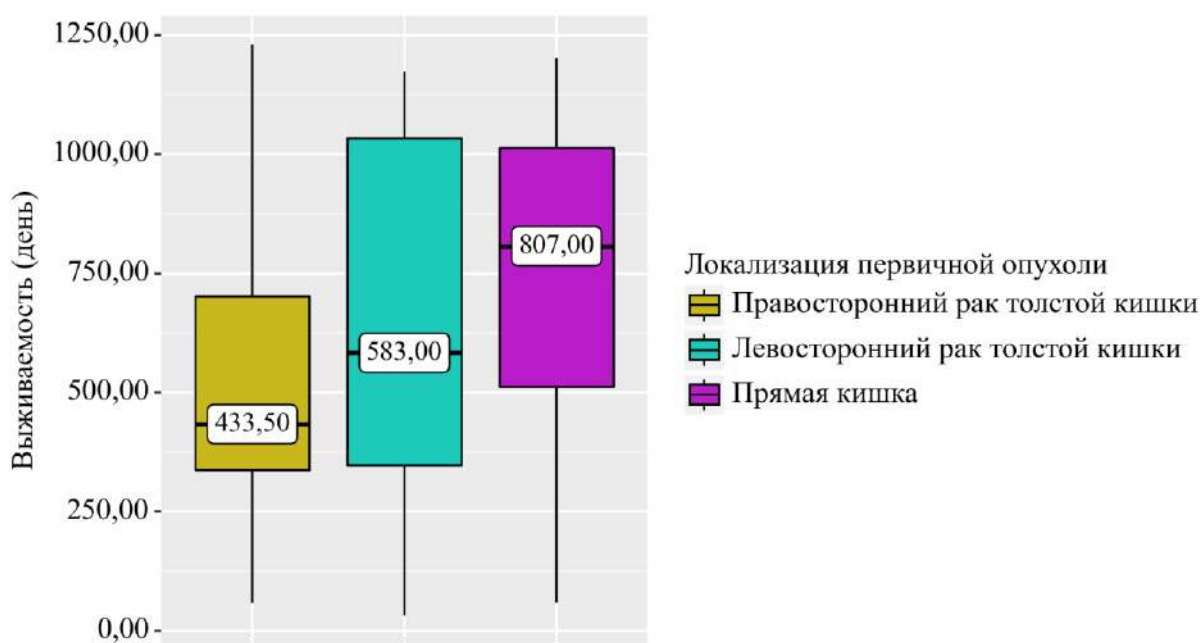


Рисунок 22 – Анализ выживаемости в зависимости от локализации первичной опухоли

Был выполнен анализ Послеоперационных осложнений в зависимости от Локализации первичной опухоли (Таблица 17).

Таблица 17 – Анализ Послеоперационных осложнений в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Локализация первичной опухоли			p
		Правосторонний рак	Левосторонний рак	Прямая	

		толстой кишки	толстой кишки	кишка	
Послеоперационные осложнения	Кишечная непроходимость	3 (9,4)	1 (2,6)	0 (0,0)	0,484
	Нагноение послеоперационной раны	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	
	Несостоятельность анастомоза	3 (9,4)	2 (5,1)	2 (6,9)	
	нет	26 (81,2)	34 (87,2)	27 (93,1)	
	Рубцовое сужение анастомоза	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	

При сравнении послеоперационных осложнений в зависимости от локализации первичной опухоли, нам не удалось установить статистически значимых различий ( $p = 0,484$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона).

Таблица 18 – Анализ типа KRAS мутации в зависимости от локализации первичной опухоли

Показатель	Категории	Локализация первичной опухоли			p
		Правосторонний рак толстой кишки	Левосторонний рак толстой кишки	Прямая кишка	
Тип KRAS мутации	KRAS WT	8 (25,0)	19 (48,7)	16 (55,2)	0,039* pПравосторонний рак толстой кишки – Прямая кишка = 0,048
	KRAS G12D	24 (75,0)	20 (51,3)	13 (44,8)	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Согласно представленной таблице 18 при сопоставлении типа KRAS мутации в зависимости от локализации первичной опухоли, нами были установлены статистически значимые различия ( $p = 0,039$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Мутация KRAS G12D характерна для

правостороннего КРР, в то время как «дикий тип» мутации KRAS характерен для левостороннего КРР (Рисунок 23).

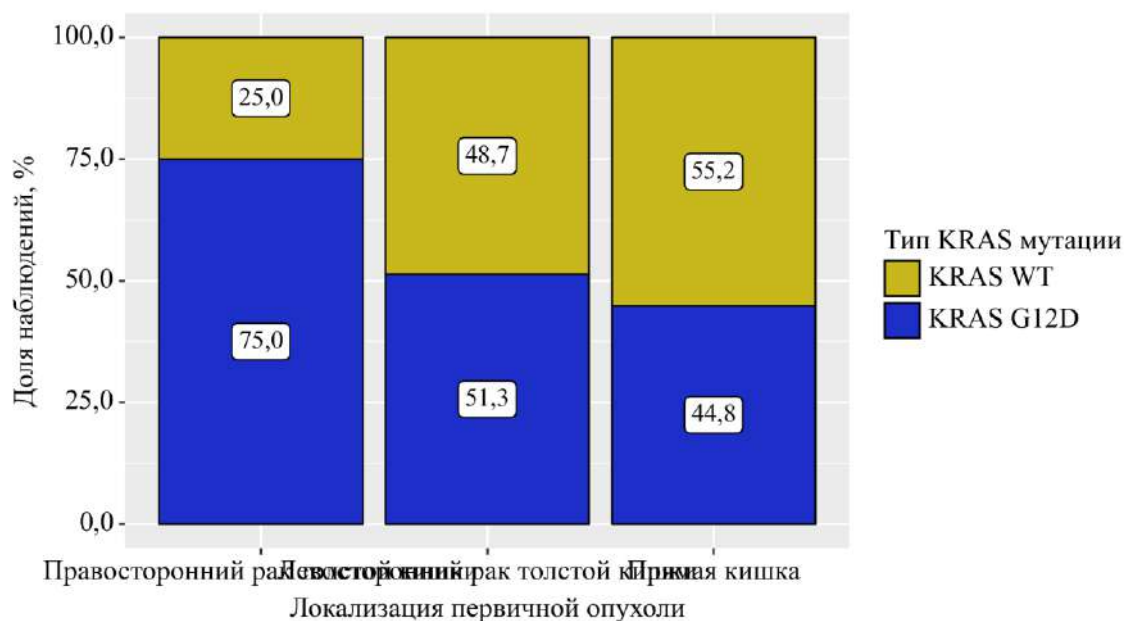


Рисунок 23 – Анализ типа KRAS мутации в зависимости от Локализации первичной опухоли

Таблица 19 – Анализ безрецидивности в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Безрецидивность (день)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Тип KRAS мутации	KRAS WT	627,00	456,00 – 1039,50	43	0,018*
	KRAS G12D	467,00	301,00 – 842,00	57	

\* – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

При анализе безрецидивности в зависимости от типа KRAS мутации, были выявлены статистически значимые различия (p = 0,018) (используемый метод: U-критерий Манна-Уитни) (Таблица 19). При мутации KRAS G12D безрецидивность 467 дней, в то время как при «диком типе» KRAS безрецидивность выше и составляет 627 дней (Рисунок 24).

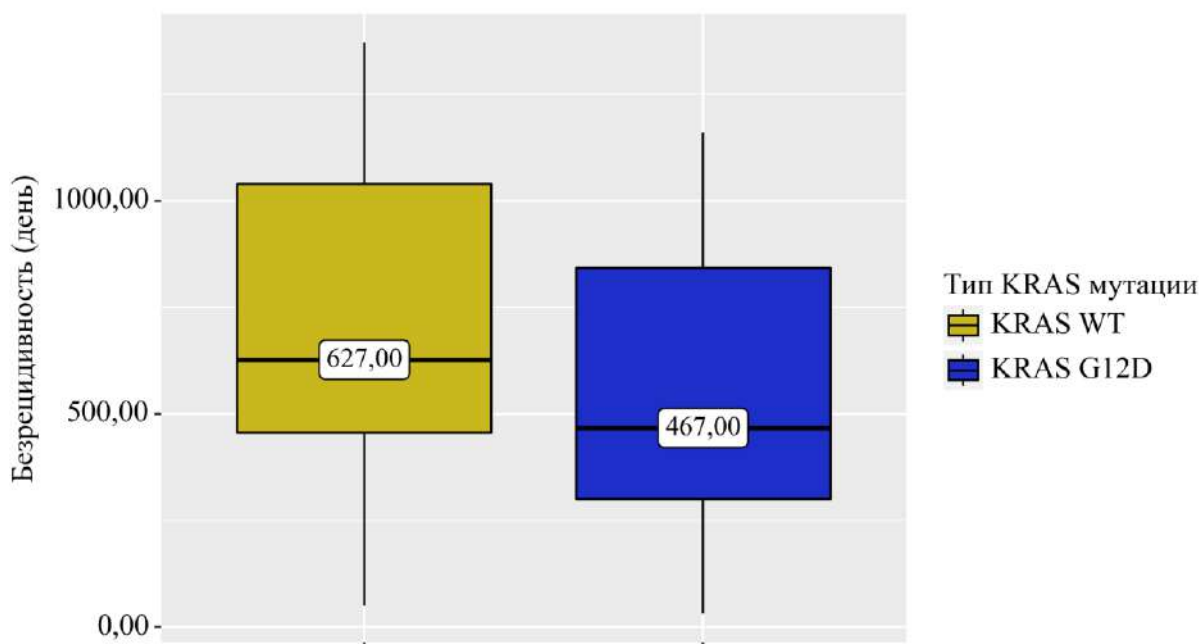


Рисунок 24 – Анализ безрецидивности в зависимости от типа KRAS мутации

Таблица 20 – Анализ стадии в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Тип KRAS мутации		p
		KRAS WT	KRAS G12D	
Стадия	I	6 (14,0)	0 (0,0)	0,009*
	II	18 (41,9)	29 (50,9)	
	III	8 (18,6)	19 (33,3)	
	IV	11 (25,6)	9 (15,8)	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Исходя из полученных данных при сравнении стадии в зависимости от типа KRAS мутации, были выявлены статистически значимые различия ( $p = 0,009$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Таблица 20). При мутации KRAS G12D не было выявлено пациентов с I стадией онкологического заболевания, в основном выявлялся рак II (50,9%) и III (3,3%) стадии, что характеризуется местным распространением онкологического процесса. При KRAS «дикого типа» были пациенты со всеми стадиями ЗНО (Рисунок 25).

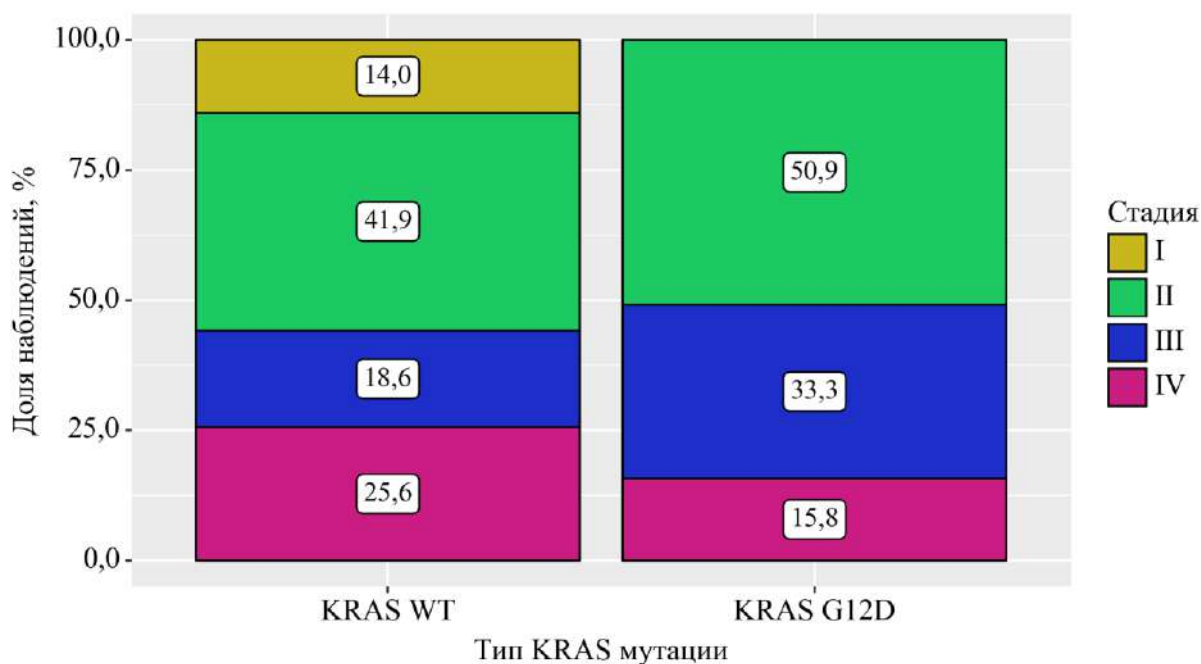


Рисунок 25 – Анализ стадии в зависимости от типа KRAS мутации

Был проведен анализ локализации опухоли в зависимости от типа KRAS мутации.

Таблица 21 – Анализ локализации опухоли в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Тип KRAS мутации		p
		KRAS WT	KRAS G12D	
Локализация опухоли	восходящий отдел толстой кишки	4 (9,3)	12 (21,1)	0,154
	нисходящий отдел толстой кишки	2 (4,7)	3 (5,3)	
	печеночный изгиб толстой кишки	0 (0,0)	6 (10,5)	
	поперечно-ободочная кишка	4 (9,3)	6 (10,5)	
	прямая кишка	16 (37,2)	13 (22,8)	

	селезеночный угол толстой кишки	3 (7,0)	2 (3,5)	
	сиGMовидная кишка	14 (32,6)	15 (26,3)	

При сопоставлении локализации опухоли в зависимости от типа KRAS мутации, не удалось установить статистически значимых различий ( $p = 0,154$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Таблица 21).

Был выполнен анализ локализации первичной опухоли в зависимости от типа KRAS мутации.

Таблица 22 – Анализ локализации первичной опухоли в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Тип KRAS мутации		p
		KRAS WT	KRAS G12D	
Локализация первичной опухоли	Правосторонний рак толстой кишки	8 (18,6)	24 (42,1)	0,039*
	Левосторонний рак толстой кишки	19 (44,2)	20 (35,1)	
	Прямая кишка	16 (37,2)	13 (22,8)	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

При сопоставлении локализации первичной опухоли в зависимости от типа KRAS мутации, были выявлены существенные различия ( $p = 0,039$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Таблица 22) (Рисунок 26).



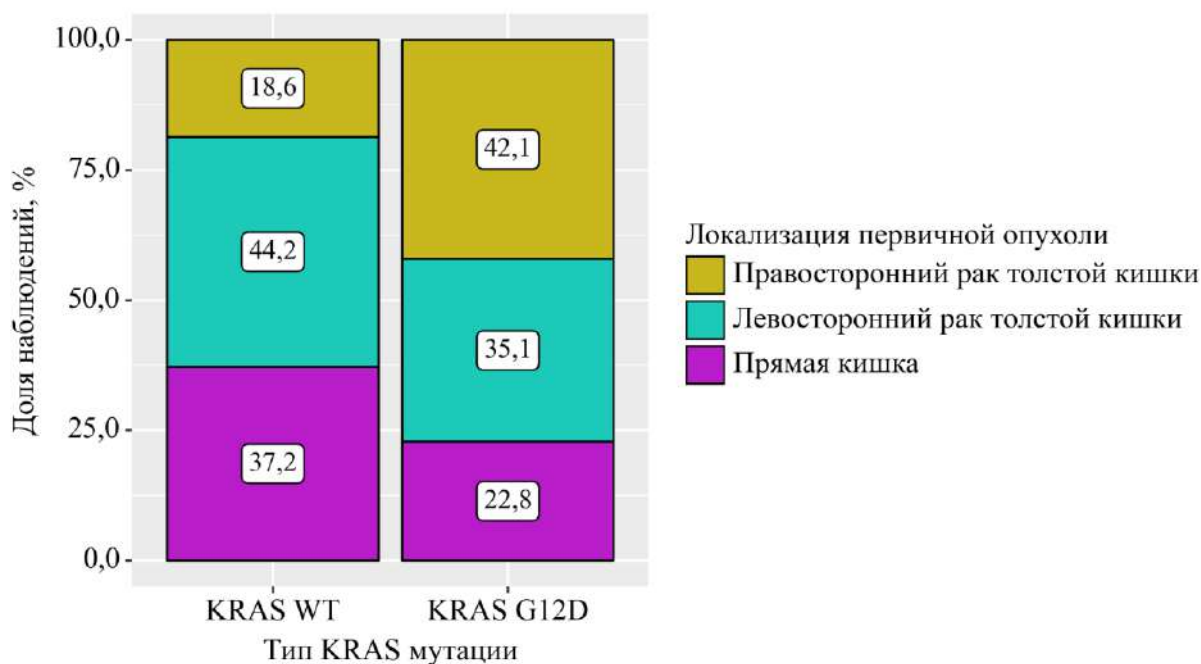


Рисунок 26 – Анализ локализации первичной опухоли в зависимости от типа KRAS мутации

Таблица 23 – Анализ степени дифференцировки опухоли в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Тип KRAS мутации		p
		KRAS WT	KRAS G12D	
Степень дифференцировки опухоли	высокодифференцированная	8 (18,6)	3 (5,3)	< 0,001*
	низкодифференцированная	0 (0,0)	13 (22,8)	
	умереннодифференцированная	35 (81,4)	41 (71,9)	

\* – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

Согласно полученным данным при анализе степени дифференцировки опухоли в зависимости от типа KRAS мутации, нами были выявлены статистически значимые различия (p < 0,001) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Таблица 23) (Рисунок 27).

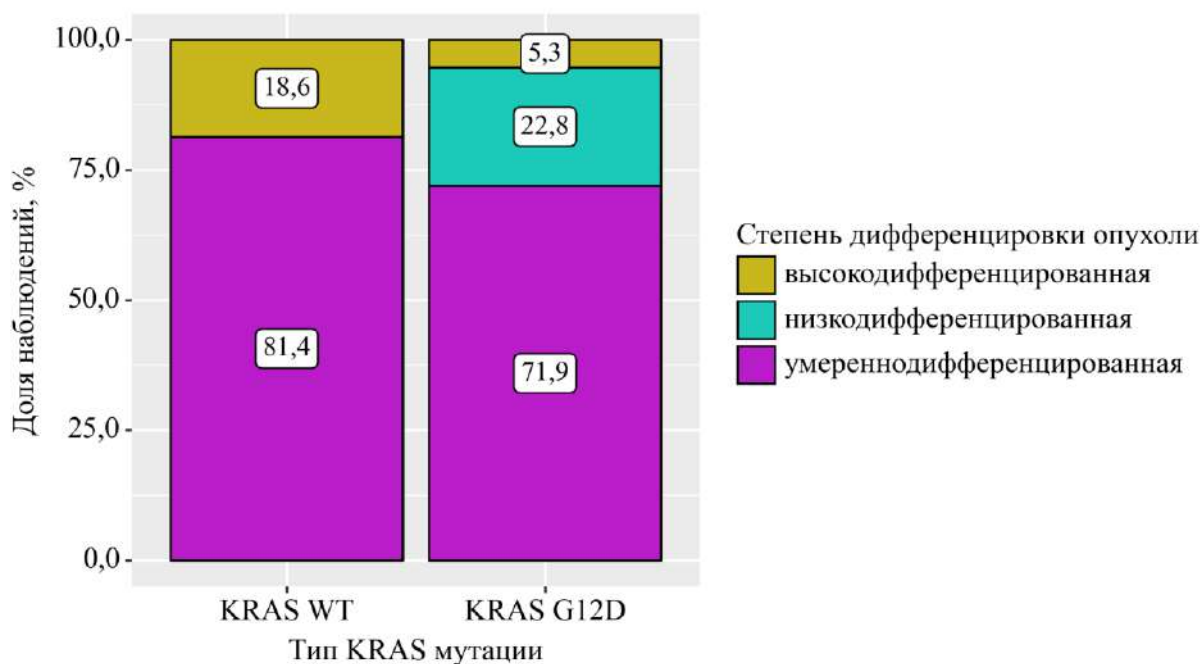


Рисунок 27 – Анализ степени дифференцировки опухоли в зависимости от типа KRAS мутации

Таблица 24 – Анализ длительности госпитализации в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Длительность госпитализации (день)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Тип KRAS мутации	KRAS WT	14,00	10,50 – 19,50	43	0,007*
	KRAS G12D	16,00	14,00 – 32,00	57	

\* – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

В результате сравнения длительности госпитализации в зависимости от типа KRAS мутации, нами были установлены статистически значимые различия (p = 0,007) (используемый метод: U-критерий Манна–Уитни) (Таблица 24). При анализе было выявлено, что госпитализация при KRAS G12D дольше на 2 дня и составляет 16 дней (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>, 14-32) (Рисунок 28).

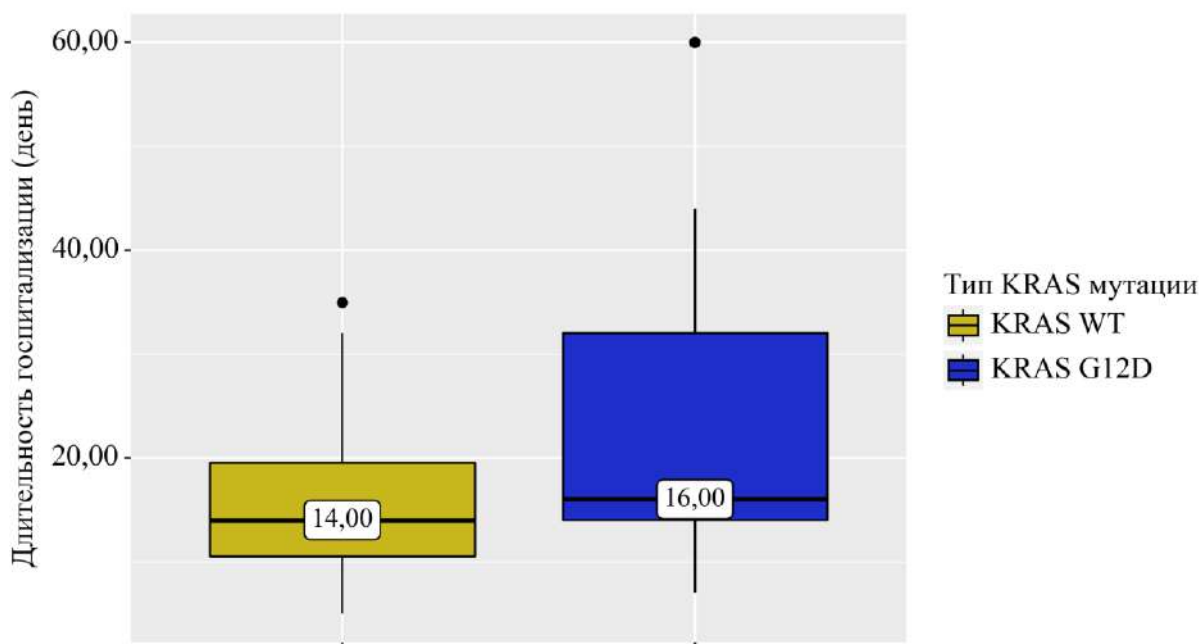


Рисунок 28 – Анализ длительности госпитализации в зависимости от типа KRAS мутации

Таблица 25 – Анализ выживаемости в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Выживаемость (день)			p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	n	
Тип KRAS мутации	KRAS WT	1004,00	749,00 – 1069,00	43	< 0,001*
	KRAS G12D	411,00	324,00 – 583,00	57	

\* – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

При сравнении выживаемости в зависимости от типа KRAS мутации, были выявлены статистически значимые различия (p < 0,001) (*используемый метод: U-критерий Манна-Уитни*) (Таблица 25). Наш анализ показал, что выживаемость при KRAS G12D ниже и медиана составляет 411 дней, в то время как при KRAS «дикого типа» в 2,5 раза выше, медиана 1004 дня (Рисунок 29).

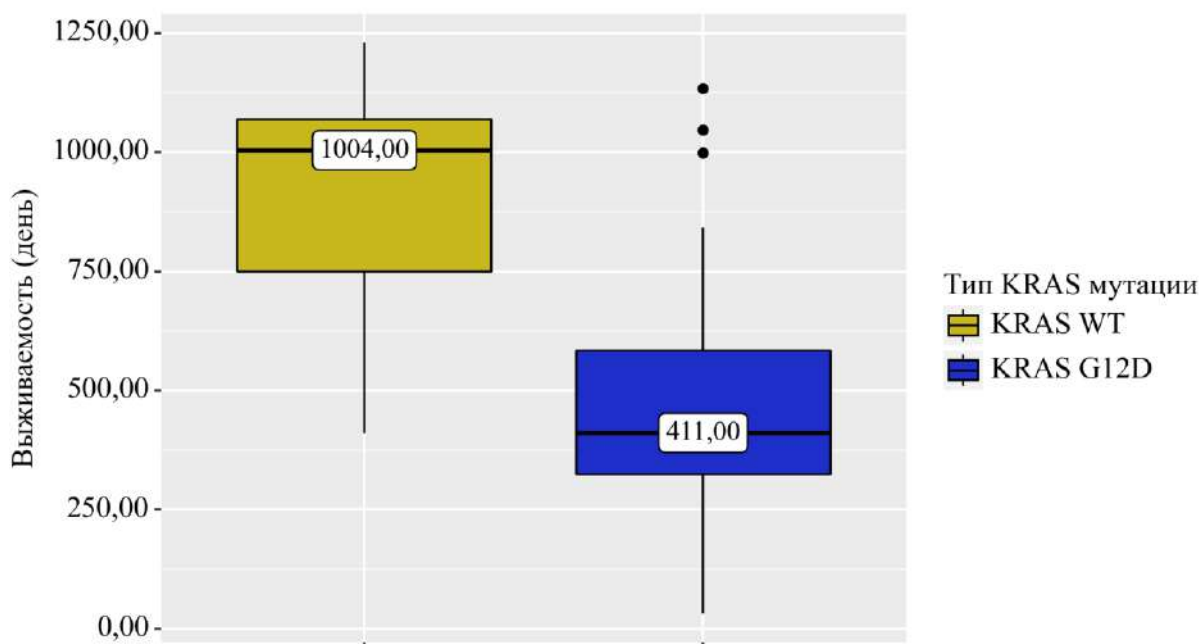


Рисунок 29 – Анализ выживаемости в зависимости от типа KRAS мутации

Таблица 26 – Анализ послеоперационных осложнений в зависимости от типа KRAS мутации

Показатель	Категории	Тип KRAS мутации		p
		KRAS WT	KRAS G12D	
Послеоперационные осложнения	Кишечная непроходимость	0 (0,0)	4 (7,0)	0,023*
	Нагноение послеоперационной раны	1 (2,3)	0 (0,0)	
	Несостоятельность анастомоза	0 (0,0)	7 (12,3)	
	нет	42 (97,7)	45 (78,9)	
	Рубцовое сужение анастомоза	0 (0,0)	1 (1,8)	

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

При анализе Послеоперационных осложнений в зависимости от типа KRAS мутации, были выявлены статистически значимые различия ( $p = 0,023$ ) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Таблица 26). Нами было выявлено только одно осложнение при KRAS «дикого типа» - это нагноение

послеоперационной раны. В то время как при KRAS G12D отмечалась кишечная непроходимость, несостоятельность анастомоза и рубцовое сужение анастомоза (Рисунок 30).

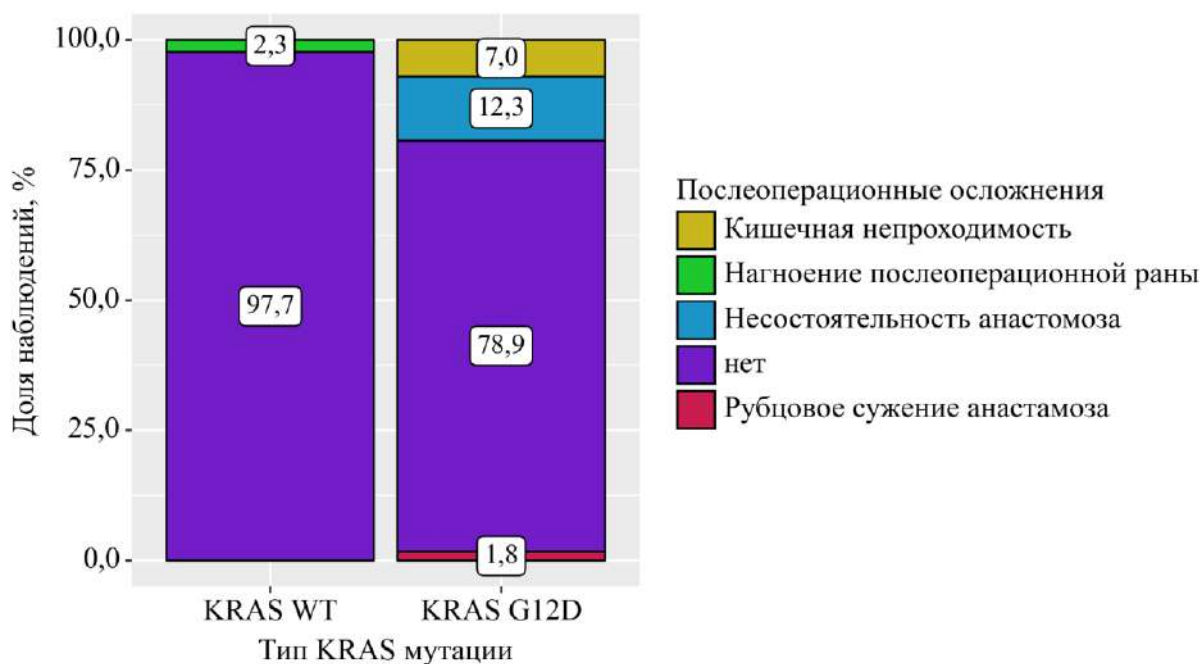


Рисунок 30 – Анализ Послеоперационных осложнений в зависимости от типа KRAS мутации

Таблица 27 – Анализ безрецидивности в зависимости от локализации первичной опухоли, типа KRAS мутации

	B	Стд. ошибка	t	p
Intercept	455,844	60,196	7,573	< 0,001*
первичной опухоли: Локализация Левосторонний рак толстой кишки	166,028	81,220	2,044	0,044*
Локализация первичной опухоли: Прямая кишка	315,122	87,304	3,609	< 0,001*

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Наблюдаемая зависимость безрецидивности от локализации первичной опухоли описывается уравнением линейной регрессии (Таблица 27):

$$\text{Безрецидивность} = 455,844 + 166,028X_{\text{Левосторонний рак толстой кишки}} + 315,122X_{\text{Прямая кишка}}$$

где  $Y$  – величина безрецидивности,  $X_{\text{Левосторонний рак толстой кишки}}$  – Локализация первичной опухоли (0 – Правосторонний рак толстой кишки, 1 – Левосторонний рак толстой кишки),  $X_{\text{Прямая кишка}}$  – Локализация первичной опухоли (0 – Правосторонний рак толстой кишки, 1 – Прямая кишка)

При изменении категории Локализации первичной опухоли на Левосторонний рак толстой кишки. следует ожидать увеличение безрецидивности на 166,028 день, при изменении категории Локализации первичной опухоли на Прямая кишка. следует ожидать увеличение безрецидивности на 315,122 день.

Полученная регрессионная модель характеризуется коэффициентом корреляции  $r_{xy} = 0,345$ , что соответствует умеренной тесноте связи по шкале Чеддока. Модель была статистически значимой ( $p = 0,002$ ). Полученная модель объясняет 11,9% наблюдаемой дисперсии безрецидивности.

Оценка зависимости длительности госпитализации от количественных факторов была выполнена с помощью метода линейной регрессии. Число наблюдений составило 100.

Таблица 28 – Анализ длительности госпитализации в зависимости от типа KRAS мутации, Локализации первичной опухоли

	B	Стд. ошибка	t	p
Intercept	20,908	2,529	8,266	< 0,001*
Тип KRAS мутации: KRAS G12D	4,790	2,237	2,141	0,035*
Локализация первичной опухоли: Левосторонний рак толстой кишки	-6,364	2,609	-2,440	0,017*
Локализация первичной опухоли: Прямая кишка	-5,882	2,827	-2,081	0,040*

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Наблюдаемая зависимость длительности госпитализации от типа KRAS мутации, локализации первичной опухоли описывается уравнением линейной регрессии (Таблица 28):

$$Y_{\text{Длительность госпитализации}} = 20,908 + 4,790X_{\text{KRAS G12D}} - 6,364X_{\text{Левосторонний рак толстой кишки}} - 5,882X_{\text{Прямая кишка}}$$

где  $Y$  – величина длительности госпитализации,  $X_{\text{KRAS G12D}}$  – Тип KRAS мутации (0 – KRAS WT, 1 – KRAS G12D),  $X_{\text{Левосторонний рак толстой кишки}}$  – Локализация первичной опухоли (0 – Правосторонний рак толстой кишки, 1 – Левосторонний рак толстой кишки),  $X_{\text{Прямая кишка}}$  – Локализация первичной опухоли (0 – Правосторонний рак толстой кишки, 1 – Прямая кишка)

При изменении категории типа KRAS мутации на KRAS G12D. следует ожидать увеличение длительности госпитализации на 4,790 день, при изменении категории Локализации первичной опухоли на Левосторонний рак толстой кишки следует ожидать уменьшение длительности госпитализации на 6,364 день, при изменении категории Локализации первичной опухоли на Прямая кишка. следует ожидать уменьшение длительности госпитализации на 5,882 день.

Полученная регрессионная модель характеризуется коэффициентом корреляции  $r_{xy} = 0,368$ , что соответствует умеренной тесноте связи по шкале Чеддока. Модель была статистически значимой ( $p = 0,003$ ). Полученная модель объясняет 13,6% наблюдаемой дисперсии длительности госпитализации.

Оценка зависимости выживаемости от количественных факторов была выполнена с помощью метода линейной регрессии. Число наблюдений составило 100.

Таблица 29 – Анализ выживаемости в зависимости от типа KRAS мутации, Локализации первичной опухоли

	B	Стд. ошибка	t	p
Intercept	915,302	36,550	25,042	< 0,001*
Тип KRAS мутации: KRAS G12D	-466,583	48,412	-9,638	< 0,001*

\* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Наблюдаемая зависимость выживаемости от типа KRAS мутации описывается уравнением линейной регрессии (Таблица 29):

$$Y_{\text{Выживаемость}} = 915,302 - 466,583X_{\text{KRAS G12D}}$$

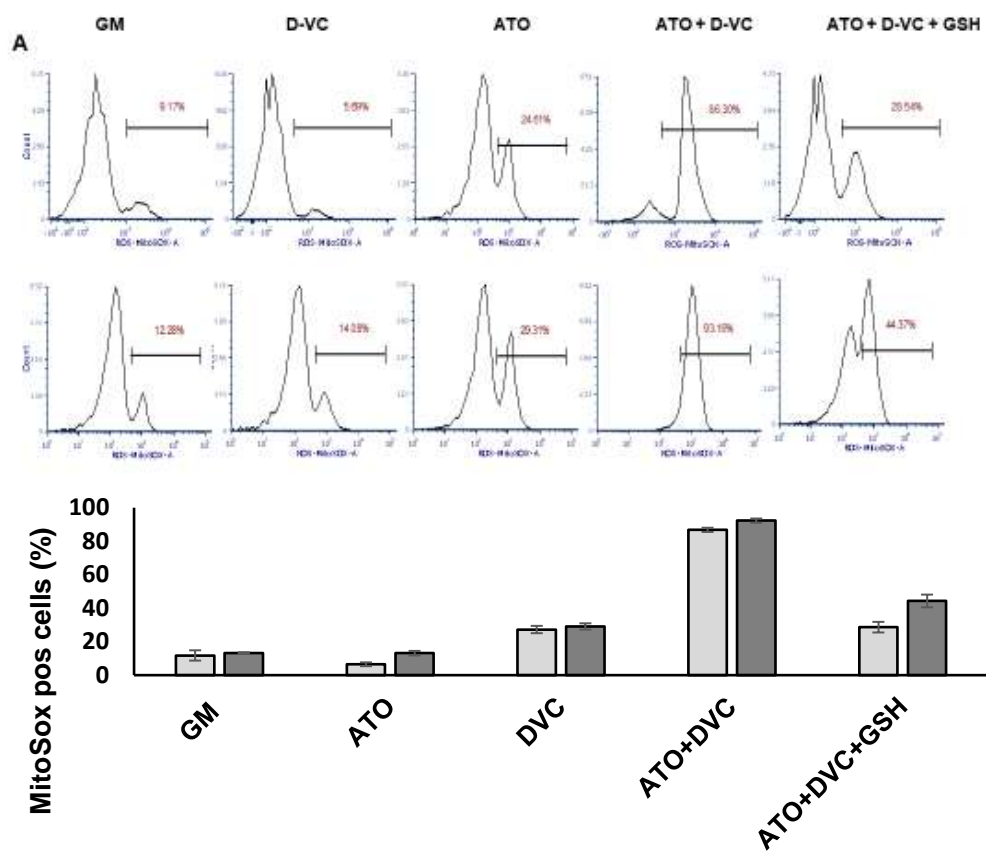
где  $Y$  – величина выживаемости,  $X_{\text{KRAS G12D}}$  – Тип KRAS мутации (0 – KRAS WT, 1 – KRAS G12D)

При изменении категории типа KRAS мутации на KRAS G12D. следует ожидать уменьшение выживаемости на 466,583 день.

Полученная регрессионная модель характеризуется коэффициентом корреляции  $r_{xy} = 0,698$ , что соответствует заметной тесноте связи по шкале Чеддока. Модель была статистически значимой ( $p < 0,001$ ). Полученная модель объясняет 48,7% наблюдаемой дисперсии выживаемости.

### 3.2 Определение цитотоксической генерации АФК при воздействии комбинации окисляющих препаратов АТО/D-VC на KRAS мутантные раковые клетки

Продукцию mtROS оценивали методом проточной цитометрии в ответ на обработку АТО&D-VC с использованием зонда MitoSox, который обнаруживает продукцию митохондриального супероксида. По сравнению с контрольной группой (GM) лечение АТО&D-VC вызвало 7,3- и 7-кратное увеличение мТРОС через 24 и 48 часов соответственно. Предварительная инкубация клеток с 5 мМ GSH в течение 1 ч перед обработкой АТО&D-VC значительно снизила продукцию мТРОС в 3 и 2 раза через 24 и 48 ч (рисунок 31).



Б



Рисунок 31. Продукция супероксида митохондриями, измеренная зондом MitoSox методом проточной цитометрии. А) пример гистограмм % положительных клеток MitoSox в каждом состоянии. Б) прямоугольное представление % клеток MitoSox pos, показывающее Men и SD для каждого состояния

Мы применили тройное флуоресцентное окрашивание митохондрий и мТАФК. MitoTracker Green — это зеленый флуоресцентный митохондриальный краситель, который окрашивает митохондрии независимо от мембранного потенциала митохондрий. MitoSox окрашивает супероксид — тип активных форм кислорода, вырабатываемых митохондриями, а Hoechst 33342 используется для специфического окрашивания ядер живых или фиксированных клеток и тканей. Сигнал MitoSOX был значительно ниже в клетках, предварительно обработанных NAC, по сравнению с клетками, непосредственно обработанными комбинацией оксидантных препаратов ATO и D-VC (рисунок 32).

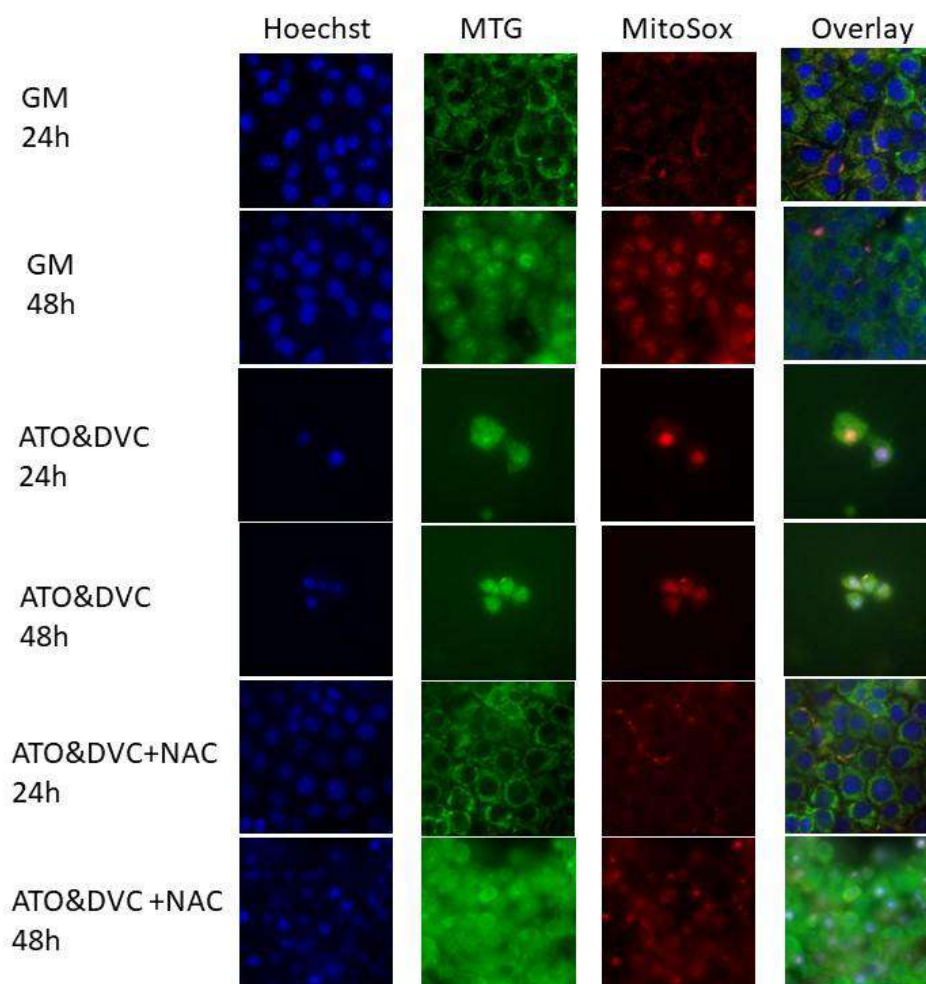


Рисунок 32 - Изображения тройного окрашивания ядра (Hoechst), митохондрий (MTG), mtROS (MitoSox), полученные с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки AK192, обработанные PBS (контроль GM), комбинацией 1 mM DVC и 5 мкМ ATO, 1 mM DVC и 5 мкМ ATO и 5 mM NAC, и изображения получали через 24 и 48 часов. MTG-митотрекер зеленый; mtROS-митохондриальные активные формы кислорода)

Одним из возможных механизмов действия АТО является блокирование тиоловых групп. Известно, что тиолы являются одним из основных защитных механизмов организма от окислительного стресса. Было показано, что тиолы играют важную роль в ферментативных реакциях, апоптозе, детоксикации и антиоксидантной защите на клеточном уровне. АТО в первую очередь связывается с тиоловыми группами, которые реагируют с цистеином в белках (лигандах). Остатки цистеина необходимы для многих специфических функций митохондрий, включая выработку активных форм кислорода (ROS).

Тест Элмана использовался для количественной оценки концентрации тиоловых групп в образце, формируя стандартную кривую цистеина. Реактив Элмана представляет собой 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойную) кислоту (DTNB), и тиол реагирует с этим соединением, разрывая дисульфидную связь с образованием 2-нитро-5-тиобензоата (TNB<sup>-</sup>), который ионизируется до TNB<sup>2-</sup> - дианион в воде при нейтральном и щелочном pH. Этот ион TNB<sup>2-</sup> имеет желтый цвет, и его поглощение измеряется спектрофотометрически (рисунок 33).

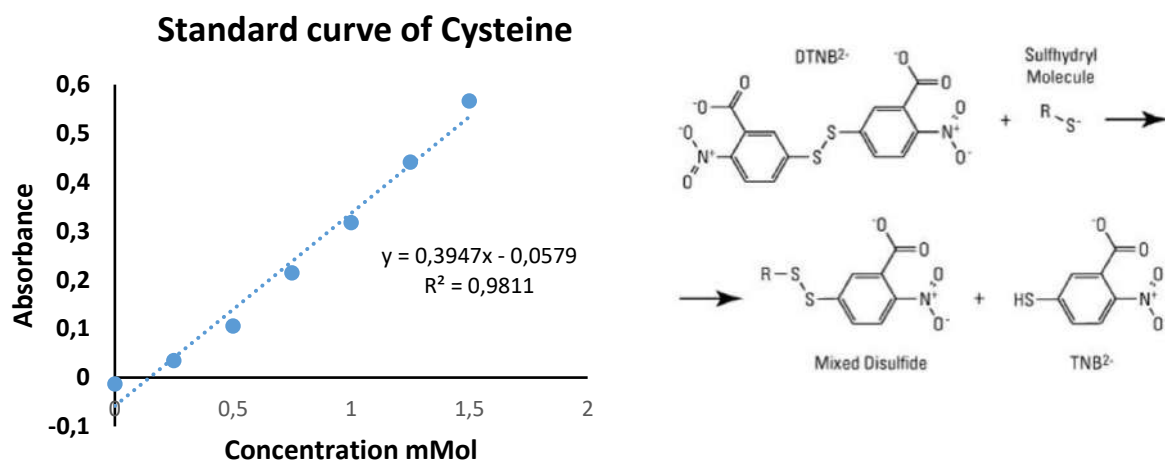
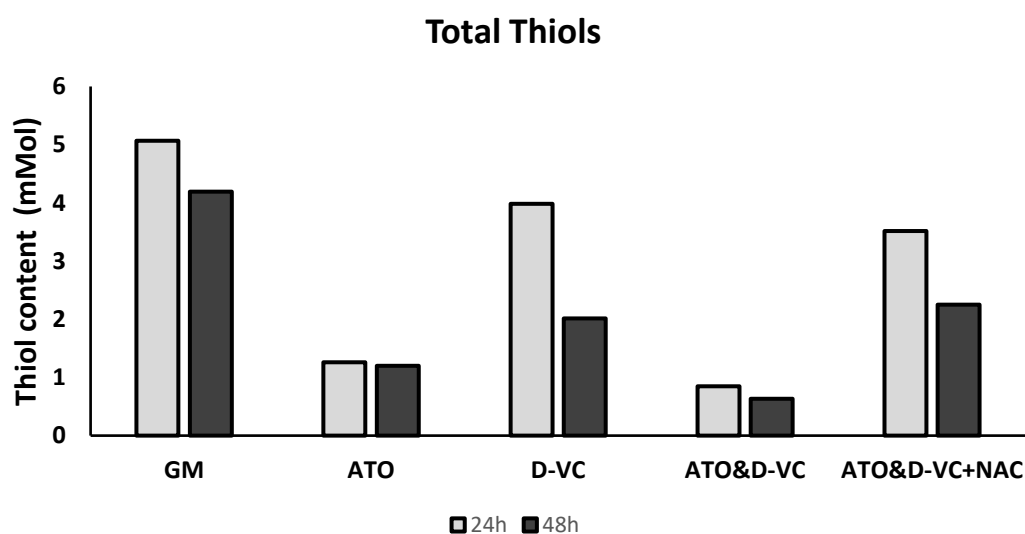


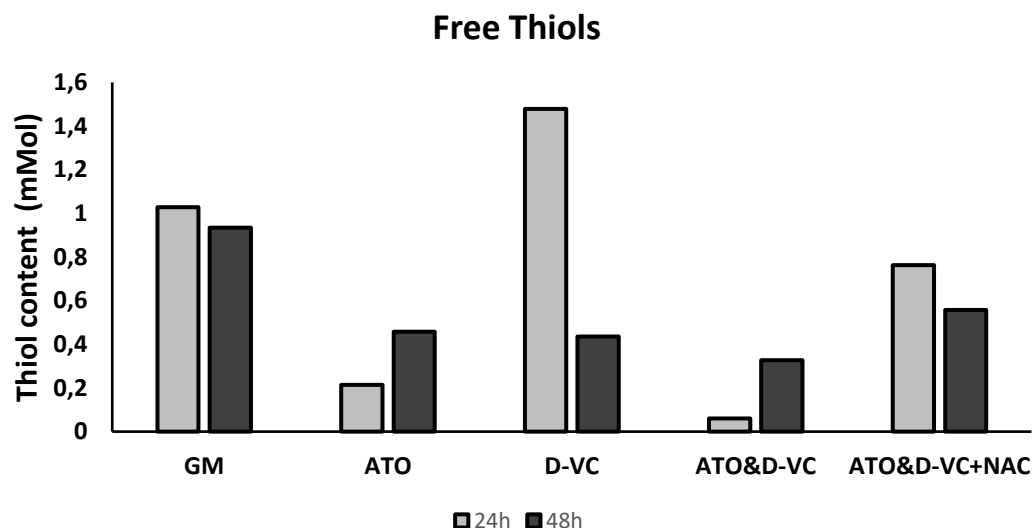
Рисунок 33. Стандартная кривая, используемая для количественного определения концентрации тиола с использованием схемы реакции DTNB и DNTB

Уровень общего и свободного тиола оценивали в клеточной линии АК 192 после обработки комбинацией окислителей АТО и DVC, а также каждым препаратом в отдельности. Клетки собирали путем обработки трипсином и осаждали, затем ресуспендировали в 30 мМ Трис-НСl, 3 мМ ЭДТА (pH 8,2) и добавляли 25 мкл 1,5 мМ DTNB, а затем 400 мкл метанола для денатурации белка. Суспензию центрифугировали при 3000 g в течение 5 минут, 250 мкл каждого супернатанта переносили в 96-луночный планшет и считывали при 400 нм. Для измерения свободных тиолов аликвоты инкубировали с 25 мкл 10% ТХУ и центрифугировали для удаления осажденных белков. Каждую аликвоту (50 мкл) переносили в 96-луночный планшет в присутствии 200 мкл 0,2 М Трис-НСl (pH

8,9) и 20 мкл DTNB и считывали при 400 нм. Полученные результаты подтвердили связывание АТО с тиоловой группой. В клетках, обработанных только АТО, наблюдались низкие общие концентрации тиолов, которые снижались в 3 и 4 раза по сравнению с GM через 24 и 48 часов. При сочетании АТО и D-VC общий уровень тиолов снизился в 6 и 7 раз по сравнению с GM через 24 и 48 часов соответственно. 1 мМ D-VC сам по себе снижал концентрацию тиолов в 1 и 2 раза через 24 и 48 часов. Предварительная инкубация клеток с 5 мМ NAC в течение 1 ч перед добавлением 5 мМ АТО и 1 мМ D-VC показала лишь небольшое снижение уровня тиолов по сравнению с GM. Более того, эта концентрация была в 4 раза и 3,5 раза выше в образцах, предварительно обработанных NAC, чем в образцах АТО&D-VC. Концентрации свободных тиолов также были ниже после обработки АТО&D-VC, и наблюдался защитный эффект NAC против АТО&D-VC (рисунок 35). Синергическое цитотоксическое воздействие, вызванное комбинацией АТО&D-VC, указывает на то, что превышение окислительного порога в раковых клетках с мутацией KRAS влияет на редокс-чувствительные клеточные системы, включая наиболее уязвимые комплексы митохондриальной системы окислительного фосфорилирования (OXPHOS) (рисунок 34).



A



Б

Рисунок 34. Результаты анализа Элмана для концентрации общего и свободного тиола в клетках Ak192, обработанных PBC (GM), 5 мМ АТО, 1 мМ D-VC, 5 мМ АТО и 1 мМ D-VC, 5 мМ АТО и 1 мМ D-VC и 5 мМ NAC, А – общий уровень тиолов, Б – уровень свободных тиолов

Учитывая это, сочетание АТО и VC в уничтожении раковых клеток с мутацией KRAS может происходить следующим образом. Основным известным сильным окислителем является АТО. При воздействии высоких доз VC происходит истощение GSH и отключение антиоксидантной защиты раковых клеток. АТО переходит в режим повышенной активности, атакуя тиол-реактивные клеточные белковые группы, преимущественно атакуя митохондриальные комплексы OXPHOS. Возможно, что прямое окисление тиол-реактивных белков в комплексе OXPHOS приводит к неконтролируемому производству АФК или к суицидному производству АФК в митохондриях.

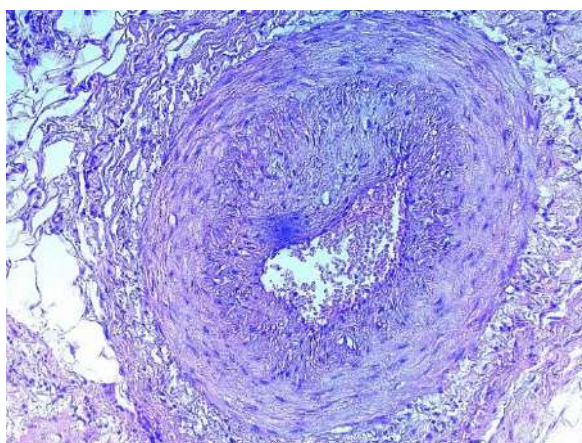
### 3.3.1 Определение типов аденокарциномы KRAS мутантных клеток, чувствительных к комбинации окислительных препаратов АТО/D-VC на животных моделях

Завершен сбор образцов колоректального рака и рака поджелудочной железы на базе ГКП на ПХВ «Многопрофильного медицинского центра» г. Астаны. Ранее мы собирали информационные листы и формы согласия на исследование от пациентов для добровольного участия в исследовании. Образцы опухоли брались интраоперационно и доставлялись в специальной среде для дальнейшего исследования (рисунок 35).

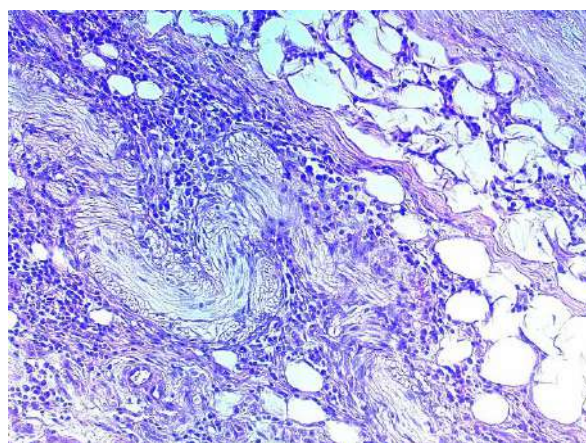


Рисунок 35 - Образцы колоректального рака

Материал был направлен для проведения клеточного, генетического и гистологического исследования (рисунок 36).



X200



X100

Рисунок 36 – гистологический препарат колоректального рака

Качественную и количественную оценку гДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop1000 и флуориметре Qubit, качество гДНК также оценивали на горизонтальном форезе (рисунок 37).

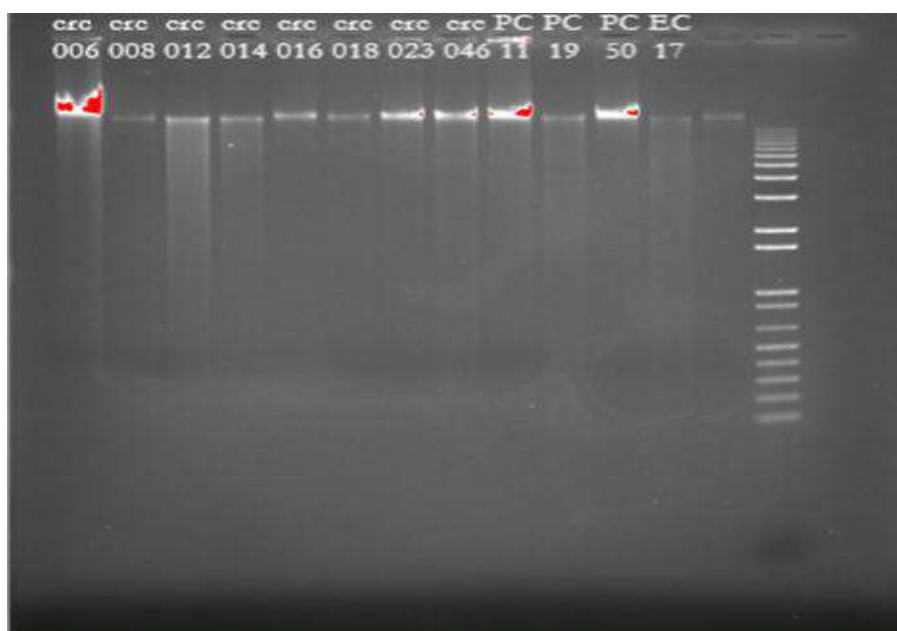


Рисунок 37 – Качественная и количественную оценку гДНК.

Таблица 29 - Характеристика полученной гДНК

ID	Material	Histology	Nanodrop			Qubit
			Conc.	260/280	260/230	
003	FFPE	Moderately differentiated ductal adenocarcinoma (G-II) of the pancreas	43,4	1,96	1,84	11,3
011	FFPE	Metastasis of adenocarcinoma to the liver.	19,1	1,95	1,75	4,36
041	FFPE	Moderately differentiated ductal adenocarcinoma (G-II) of the pancreas	69,2	1,9	1,51	12,3
050	FFPE	Tumor of the tail of the pancreas	182,6	1,9	2,07	32,8

Мы выделили геномную ДНК из всех образцов FFPE и провели качественную и количественную оценку (Таблица 29). Полученный опухолевый материал сохраняется в биобанке по запросу для дальнейшего анализа. Создана электронная база данных образцов и присвоены идентификационные номера.

Геномную ДНК выделяли из пластин FFPE согласно протоколу производителя, отвечающему качественным и количественным критериям.

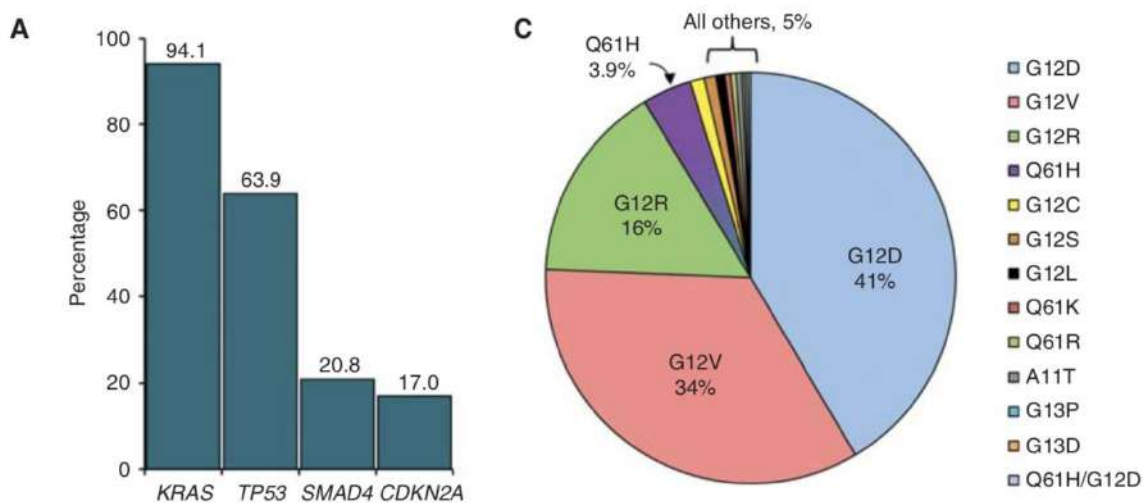


Рисунок 38– Малый G-белок KRAS является основным онкогенным драйвером

Концентрация 10-32 нг/мкл. Наиболее активный рост наблюдался в модели раковых клеток где геномное профилирование гена KRAS выявило мутацию в экзоне 2: KRAS G12D (рисунок 38).

### 1.3.2 Определение типов клеток аденокарциномы с KRAS мутацией человека, чувствительных к комбинации препаратов АТО/D-VC.

Ксенографические модели мутаций KRAS будут полезны в доклинических исследованиях воздействия комбинации АТО/D-VC, поскольку эти модели имеют важное биологическое значение для исследований рака у человека и ухода за пациентами (рисунок 39).

Комбинация АТО/D-VC оказалась эффективной в подавлении роста опухоли, индуцированного KRAS. Мутантный рак поджелудочной железы по KRAS характеризуется высокой экспрессией KRAS и наличием фотосинтетически-зависимого микроокружения опухоли. Эффекты ВК оптически зависимы, поэтому активность АТО может избирательно усиливаться при сочетании с VC в низких дозах.

Поскольку комбинация АТО/VC оказалась эффективной в культуре клеток, мы протестировали ее на модели рака ксенотрансплантата у мышей. Раковые клетки АК 192 трансплантировали подкожно мышам NOD Scid и Nu, а препарат вводили через 10 дней, когда опухоль достигла размера в диаметре >0,6 см (рис. 9). Комбинация АТО и D-VC проводилась путем двух последовательных перитониальных инфузий. Было изучено четыре группы: контрольная группа NOD Scid и Nu (без лечения), группа NOD Scid и Nu АТО/D-VC.

Через два часа после инъекции АТО следует инъекция VC. Для максимальной эффективности мы используем 2-часовой интервал между инъекциями АТО и D-VC. Чтобы избежать колебаний уровня глюкозы в крови,

мышей голодали в течение 2 часов до инъекции АТО или D-VC и кормили через 2 часа после инъекции D-VC. Доза D-VC составляет 1,5 г/кг. В течение второй недели после инъекции мы наблюдали уменьшение опухоли у мышей, получавших комбинацию АТО/D-VC. В ходе лечения изначально круглая и плотная капсула опухоли была раздавлена и сплющена (рисунок 40-41).

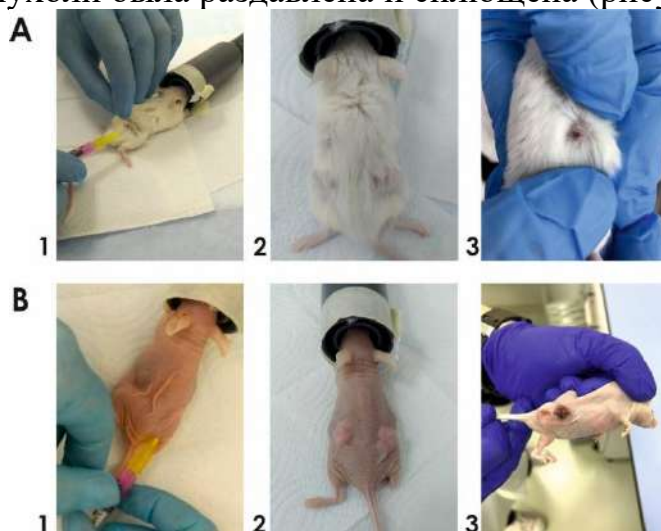


Рисунок 39. Ксенотрансплантаты. Раковые клетки АК 192 трансплантировали мышам NOD Scid и Nu.

Мы использовали две линии мышей: NOD Scid и Nu. После 15-й (последней) инъекции препарата анализ опухоли по весу показал, что комбинация АТО/D-VC вызывала сильное уменьшение опухоли у мышей NOD Scid; уменьшение опухоли было немного меньше у мышей Nu.

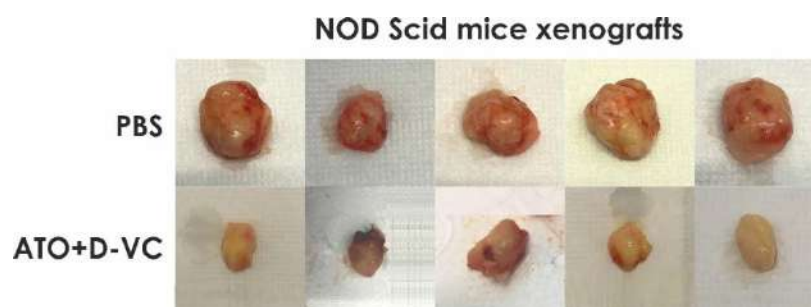


Рисунок 40. Ксенотрансплантат опухолей мышей линии NOD Scid





Рисунок 41. Ксенотрансплантат опухолей у мышей Nu

Результаты исследования показали статистически значимое снижение массы опухоли у животных обоих типов, которым вводили АТО/Д-ВС (NOD Scid и Nu), по сравнению с отрицательным контролем PBS,  $p \leq 0,0006$ ,  $p \leq 0,004$ ,  $p \leq 0,0404$  и  $p \leq 0,04$  соответственно (рисунок 42).

Было показано, что АТО / Д-ВС эффективен в подавлении роста опухолей KRAS G12D мутантных PDAC.

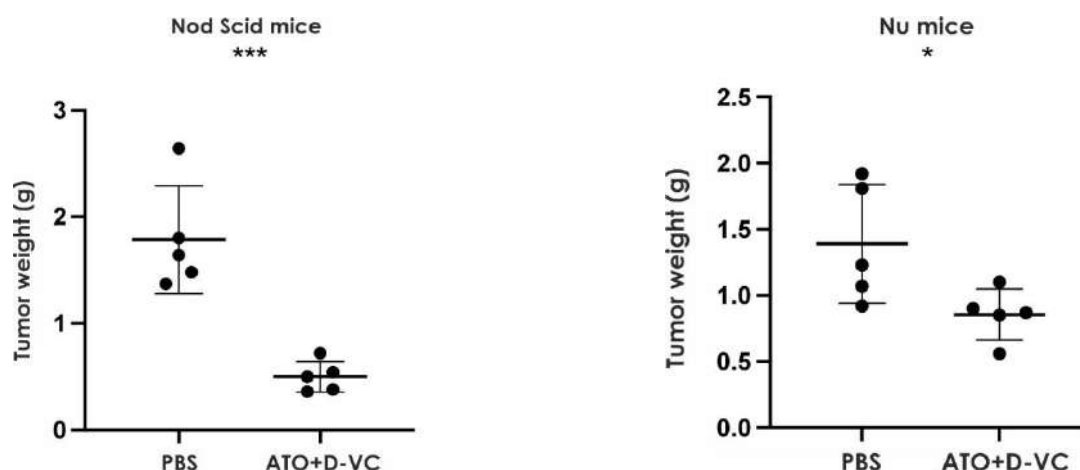


Рисунок 42. Масса опухоли ксенотрансплантатов мышей NOD Scid.  $p = 0,0006$  и Nu.  $p=0,0404$

Комбинация АТО/Д-ВС эффективна для подавления роста опухолей, вызванного Kras, у мышей NOD Scid с ксенотрансплантатом Мышь NOD Scid - АТО/Д-ВС. Подкожный узелок мягких тканей был исследован гистологически и оказался в состоянии полного некроза, что означает, что клетки были разрушены воспалением. Опухолевая ткань окружена пучками мышечных волокон. Воспалительная реакция возникает на периферии опухолевой ткани. Определяется только внешняя форма опухолевых клеток. По периферии некротических опухолевых узлов наблюдалось развитие воспаления, а также воспаление жировой ткани.

Опухолевая ткань характеризуется щелевидными полостями и короткими тяжами опухолевых клеток (частичный некроз). При частичном некрозе

структуры псевдобульбы и железы остаются нетронутыми. В опухолевой ткани наблюдаются соединительнотканые изменения (частичный некроз с железистыми структурами).

Гистологический анализ ксенотрансплантированных опухолей от нелеченых мышей Scid NOD выявил образование узелков, в некоторых местах окруженных тонкой фиброзной капсулой с обширными участками некроза и очаговыми кровоизлияниями. Под корой головного мозга волокна мышечных клеток демонстрируют хорошо выраженные дегенеративные изменения; В некоторых местах аналогичные клетки были выявлены и в строме опухоли. Опухолевая ткань сохраняется по периферии лимфатического узла и характеризуется железистыми, псевдотубулярными и стопчатыми структурами, состоящими из эпителиальных клеток с эозинофильной цитоплазмой и плеоморфными ядрами с неравномерным распределением хроматина. В некоторых местах псевдотрубчатые структуры расширяются неравномерно. Отмечено наличие папиллярных и решетчатых структур. Происходит деление клеток. В эпителиальных клетках опухоли наблюдались участки цитолиза и полиморфизма. В зоне некроза опухолевой ткани наблюдались изменения фибробластов в виде склероза папиллярной стромы и атрофии трубчатых структур. По периферии опухоли наблюдается отек стромы, стаз эритроцитов в мелких кровеносных сосудах, диффузная лимфоцитарная реакция. Небольшое кровоизлияние в плевру. Кроме того, во внутрисосудистом пространстве был обнаружен стаз эритроцитов и лейкоцитов.

Результаты показали инфильтрацию лейкоцитов вокруг некротической зоны. В просвете некоторых желез наблюдается скопление экссудата с примесью лейкоцитов (воспалительный инфильтрат). Также отмечались отек стромы, миопатия миоэпителиальных клеток и атрофия толщины опухолевой ткани. Комбинация АТО/D-VC эффективна для подавления роста опухолей, вызванного Kras, у мышей с ксенотрансплантатами Nu.

Гистологический анализ выявил выраженный фиброз в строме. Лимфатический узел окружен жировой тканью в тонкой фиброзной капсуле, псевдобульбарными структурами, псевдожелезистыми структурами, расширенными папиллярными структурами (солидная опухоль с микроскопически структурированными участками, снижение дифференцировки опухоли). Наблюдались отек и липоматозная строма опухоли.

Nu АТО/D-VC: обнаруживает инвазию опухолевой капсулы. Железы разделены гиперпластической соединительной тканью. В случаях некроза опухоли со склерозом в некоторых местах некротическая зона распространяется на капсулу. Анализ выявил некроз опухоли, отдельные опухолевые клетки под капсулой, воспаление, обширный субкапсулярный фиброз, капсульную инвазию, склероз и опухолевую липосаркому (рисунок 44). Маркеры некроза и уменьшение опухоли показали, что АТО/D-VC эффективен в уменьшении опухолей у мышей NOD Scid и Nu. Подводя итог, мы продемонстрировали, что неприродный оптический изомер VC (D-VC), конъюгированный с АТО, эффективен в подавлении опухолей с мутацией KRAS.

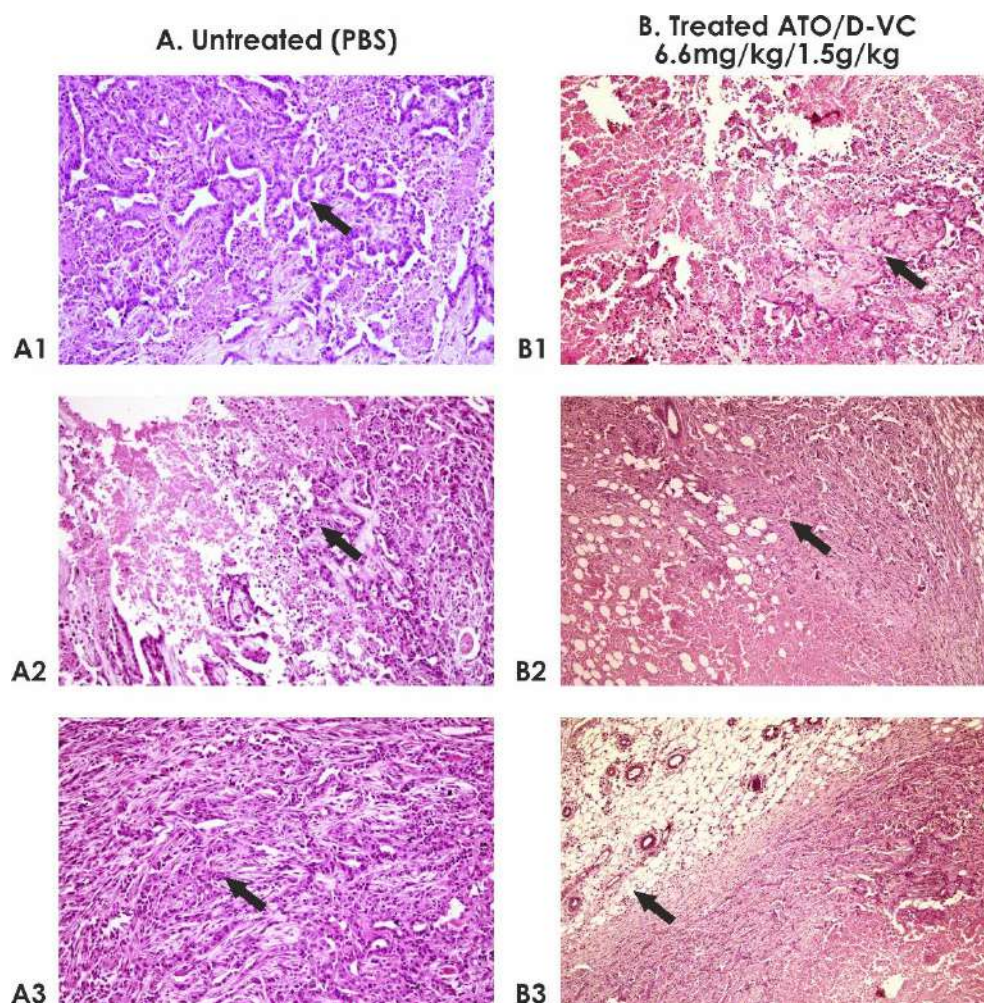


Рисунок 43. Гистологический анализ опухолевых ксенотрансплантатов от иммунодефицитных мышей NOD Scid с лечением АТО/D-VC и без него. Ткань, окрашенная гематоксилином и эозином, x200.

А. Без лечения (контроль PBS): А1 - железистые структуры с папиллярной гиперплазией эпителия. А2- воспалительная инфильтрация. А3- отек стромы.

В. Леченный АТО/D-VC: В1- некроз. В2- субтотальный некроз. В3 - субтотальный некроз

Результаты показали, что АТО/D-VC способен ингибировать рост опухолей мутантных PDAC KRAS G12D. АТО/D-VC был эффективен в снижении массы опухоли у мышей NOD Scid и Nu (рисунок 43).

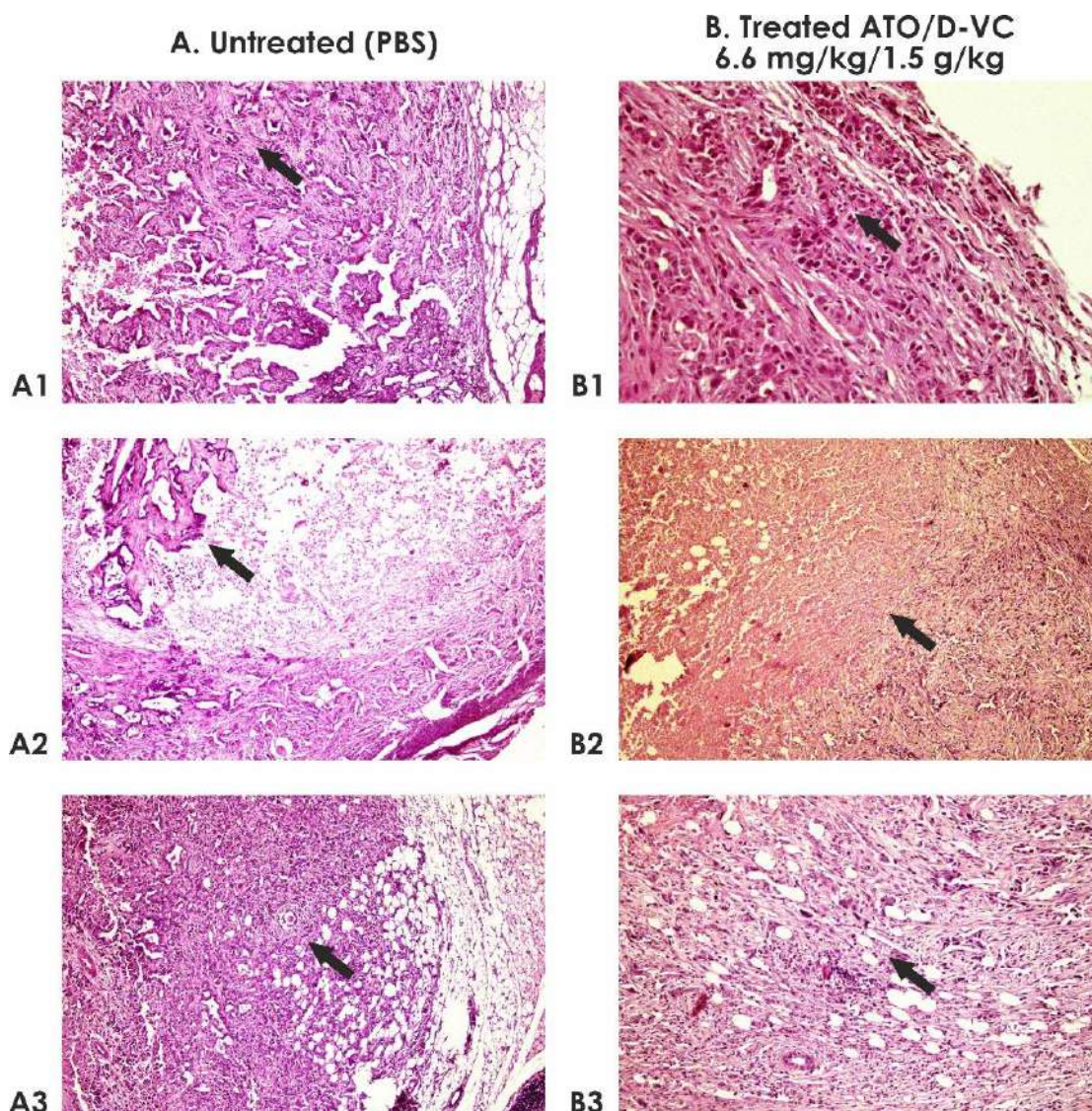


Рисунок 44. Гистологический анализ опухолевых ксенотрансплантатов мышей Nu с иммунодефицитом при лечении АТО/D-VC и без него. Ткань, окрашенная гематоксилином и эозином, х 200.

А. Без лечения (контроль PBS): А1- Инвазия опухоли в капсулу. А2 - железы разделены разрастающейся соединительной тканью.

Б. Пролеченная АТО/Д-ВК: В1 - склероз и липоматоз опухоли. В2 - некроз опухоли. В3 - Снижение индекса роста. Образец 8 - липоматоз опухоли

Комбинация препаратов окисления АТО/D-VC не токсична для мышей.

Гистологический анализ органов мыши (печень, почки, легкие, сердечная ткань) не выявил значительных аномалий или признаков некроза. Разница в изменении веса между мышами, получавшими АТО/D-VC, и мышами, не получавшими лечения, не была статистически значимой. Ни в одной из групп не наблюдалось снижения веса (дополнительная информация, рис. 44-46).

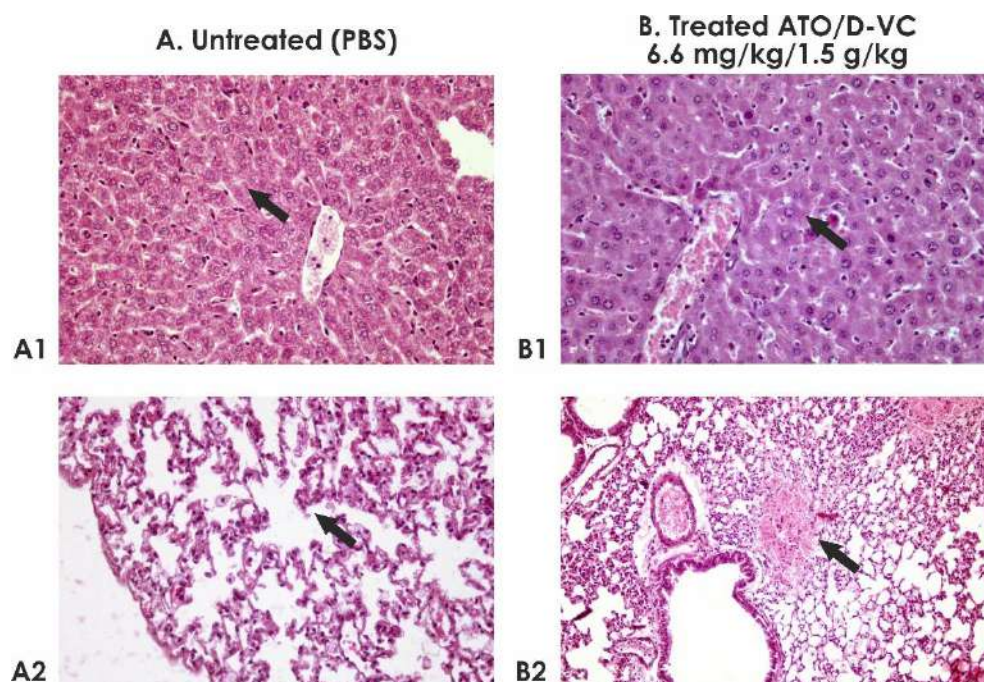


Рисунок 45. Гистологический анализ органов мышей с ксенотрансплантатом NOD Scid с обработкой ATO/D-VC и без нее. Ткань, окрашенная гематоксилином и эозином, х 200.

А. Без лечения (контроль PBS): А1 - Печень. Печеночные дольки сохраняют балочное строение. Умеренная гиперплазия клеток Купфера. А2 - Легкие. Умеренный отек межальвеолярных перегородок. Бронхи: очаговое разрастание эпителия, частичная десквамация, секреторно-активный эпителий.

В. Обработанный ATO/D-VC: В1- Печень. Нерегулярная гиперплазия клеток Купфера. В апоптотических клетках обнаруживаются небольшие очаги экстрамедуллярного кроветворения. Фрагментация ядра, пикноз ядра. Отмечается цитоллиз отдельных гепатоцитов. В субкапсулярных зонах местами определяются участки с признаками вакуолярной дистрофии гепатоцитов. В2 — легкие. Небольшой очаговый альвеолярный отек.

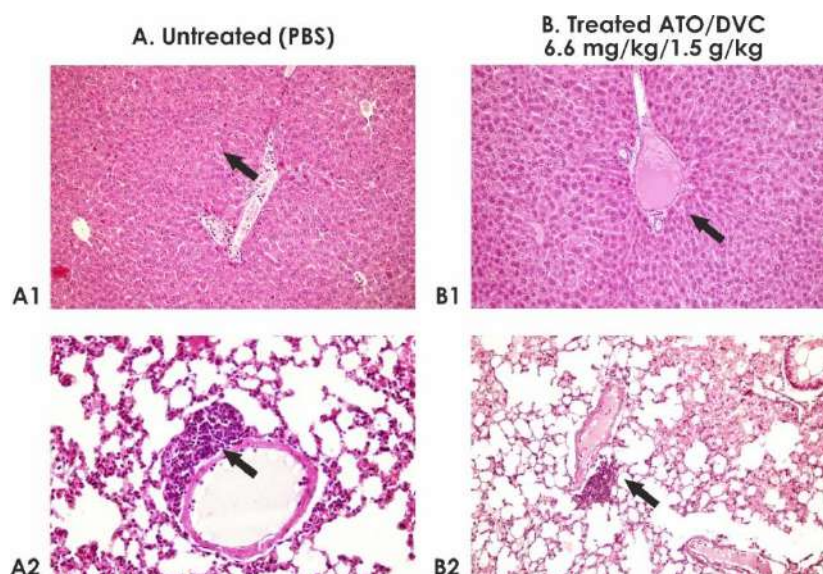


Рисунок 46. Гистологический анализ органов мышей с ксенотрансплантатом Nu с обработкой АТО/D-VC и без нее.

А. Без лечения (контроль PBS): А1 - Печень, умеренная гиперплазия одиночных клеток Купфера. Цитолиз единичных гепатоцитов. Перипортально умеренный отек в области печени. А2 - Легкие. единичные периваскулярные лимфоцитарные инфильтраты.

В. Обработанный АТО/D-VC: В3 - Печень. Экстрамедуллярный гемопоэз. (бластные клетки). Умеренная гиперплазия клеток Купфера, цитолиз отдельных групп гепатоцитов. В4- Легкие. единичные периваскулярные лимфоцитарные инфильтраты.

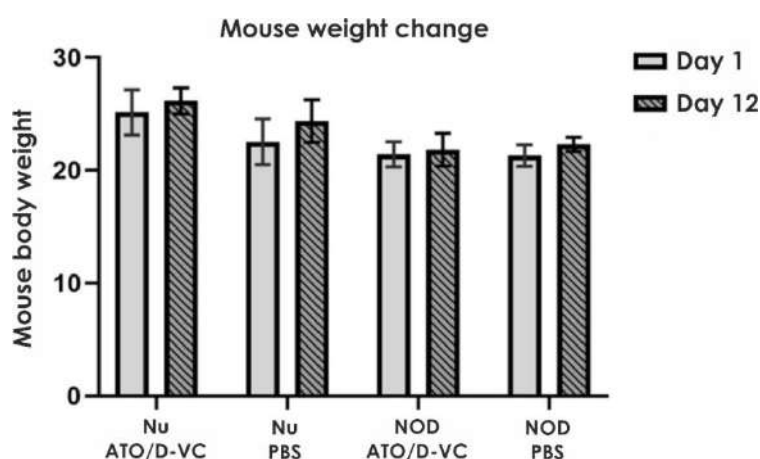


Рисунок 47. Изменение веса мышей. Разница в изменении веса между мышами, получавшими АТО/D-VC, и мышами, не получавшими лечения, не была статистически значимой. Мыши не теряли вес

Мы наблюдали влияние ксенотрансплантатов на исследуемые органы мышей. Эти процессы составляют нормальный иммунный ответ при наличии опухоли. Наши результаты показывают, что сочетание АТО и VC может привести к гибели раковых клеток с мутацией KRAS из-за окислительного стресса. Анализ опухолей показал, что средний вес опухолей у мышей NOD Scid и Nu, получавших лечение с помощью АТО/D-VC, был на 72% (в 3,57 раза) и 38% (в 1,62 раза) ниже, чем у контрольной группы соответственно (рисунки 47, 48).

Точный механизм, посредством которого продукция АФК запускает апоптоз, остается неясным, но есть данные, что раковые клетки с мутацией KRAS продуцируют АФК в условиях окислительного стресса. Сдвиг метаболизма в сторону более высокого потребления глюкозы в злокачественных раковых клетках делает их более восприимчивыми к окислению.

Хронический окислительный стресс считается характерным фактором уязвимости рака, а также адаптивной стратегией раковых клеток в условиях гипоксии. Концептуально он основан на окислительно-восстановительной биологической модели.

Идея заключается в том, что повышенное производство активных форм кислорода играет важную роль в канцерогенезе. Поэтому нарушение

окислительно-восстановительной системы является перспективной целью для предотвращения развития и прогрессирования опухолей. Несмотря на свой терапевтический потенциал, многим современным традиционным методам лечения не хватает селективности. Теперь исследователи разработали ингибитор, который может избирательно вызывать окислительный стресс в опухолях, не нанося вреда здоровым клеткам.

Здесь мы протестировали новую комбинацию препаратов, которые были одобрены FDA и считаются безопасными для клинического применения. Триоксид мышьяка является стандартным химиотерапевтическим средством для лечения солидных раков и лейкемии. Он убивает раковые клетки посредством химически индуцированного апоптоза — избыточного образования активных форм кислорода (АФК), — что, в свою очередь, приводит к снижению внутриклеточного уровня глутатиона. Раковые клетки с высоким уровнем глутатиона (GSH) более устойчивы к триоксиду мышьяка. Исследователи обнаружили, что раковые клетки можно уничтожить, объединив триоксид мышьяка с агентами, снижающими внутриклеточный уровень GSH, такими как витамин С.

Сочетание АТО и D-VC вызвало катастрофический окислительный стресс и гибель клеток, экспрессирующих мутантный KRAS *in vivo*. Мыши, которым был ксенотрансплантирован онкоген KrasG12D, хорошо отреагировали на комбинацию препаратов, включающую АТО и D-VC. Кроме того, это исследование показало, что комбинированное лечение АТО/D-VC было более эффективным в подавлении роста опухоли в модели ксенотрансплантата АК192, чем в модели ксенотрансплантата линии клеток HCT116 (средний вес опухоли был в 3,57 раза и 3,4 раза ниже, чем в контрольной группе). В заключение следует отметить, что предлагаемая комбинация препаратов может эффективно подавлять рост мутантных клеток KRAS за счет генерации высоких концентраций активных форм кислорода, которые вызывают апоптоз и подавляют образование новых кровеносных сосудов. Было показано, что новая комбинация противоопухолевых препаратов эффективна в стимуляции гибели опухолевых клеток *in vivo*. Эти результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале нового класса противоопухолевой терапии. Необходимы дальнейшие исследования для демонстрации клинической значимости, эффективности и безопасности предлагаемого подхода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных комплексных исследований были выполнены все поставленные задачи и полученные следующие результаты.

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 АК192 (G12D) и НСТ116 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.

Таким образом, было установлено, что новая комбинация противоопухолевых препаратов эффективно способствовала уничтожению опухолевых клеток. Эти результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале разработки нового класса противоопухолевой терапии и его вывода на стадию клинических испытаний.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Apr 5. doi: 10.1002/ijc.33588. Epub ahead of print. PMID: 33818764.
2. Куканова А. М., Бекишева А. Т., Макишев А. К. "Клинико-эпидемиологические и генетические особенности колоректального рака," *Onkologičeskaâ koloproktologiâ*, vol. 14, no. 1, pp. 32-43, апр 2024. [Online]. Available: 10.17650/2949-5857-2024-14-1-32-43
3. Душимова З.Д., О.В. Шатковская, Б.Т. Онгарбаев, Г.Т. Сейсенбаева, А.Е. Ажмагамбетова, А.Ж. Жылкайдарова, И.К. Лаврентьева, М.С. Саги. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2020 год: статистические и аналитические материалы / под редакцией Д.Р. Кайдаровой. – Алматы: АО «КазНИИОиР», 2021. – 366 с
4. Андреев Д.А., Завьялов А.А., Кокушкин К.А., Давыдовская М.В. Современные таргетные препараты в терапии метастатического рака прямой кишки. *Доказательная гастроэнтерология*. 2018;7(2):21-29.
5. Falcone A., Ricci S., Brunetti I. et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25:1670–6.
6. Loupakis F., Cremolini C., Masi G. et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2014; 371:1609–18.
7. Marques R.P., Duarte G.S., Sterrantino C. et al. Triplet (FOLFOXIRI) versus doublet (FOLFOX or FOLFIRI) backbone chemotherapy as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 118:54–62.
8. Hurwitz H.I., Tan B.R., Reeves J.A. et al. Phase II randomized trial of sequential or concurrent FOLFOXIRI-bevacizumab versus FOLFOX-bevacizumab for metastatic colorectal cancer (STEAM). *Oncologist* 2019;24(7):921–32.
9. Schmoll H.-J., Meinert F.M., Cygon F. et al. "CHARTA": FOLFOX/bevacizumab vs FOLFOXIRI/bevacizumab in advanced colorectal cancer – final results, prognostic and potentially predictive factors from the randomized phase II trial of the AIO. 2017 ASCO Annual Meeting. Abstr. 3533, presented June 3, 2017.
10. Sastre J., Vieitez J.M., Gomez-España M.A. et al. Randomized phase III study comparing FOLFOX + bevacizumab versus folfoxiri + bevacizumab (BEV) as 1<sup>st</sup> line treatment in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with  $\geq 3$  baseline circulating tumor cells (bCTCs). *J Clin Oncol* 2019;37(Suppl 15):3507.
11. Бровкина Ольга Игоревна, Никитин Алексей Георгиевич Мутации в генах *kras* и *ras* как биомаркеры в терапии колоректального рака и основные методы их детекции // *Клиническая практика*. 2021. №1.
12. Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio P, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross SS, Cantley LC. Vitamin C selectively kills

KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*. 2015 Dec 11;350(6266):1391-6. doi: 10.1126/science.aaa5004. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26541605; PMCID: PMC4778961.

13. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572751.

14. Нугаев А.М. Поиск новых направлений в лечении онкологических заболеваний. -Бюллетень медицинских интернет-конференций, vol. 4, no. 5, 2014, pp. 800.

15. В.В. Мартынюк. Рак ободочной кишки (заболеваемость, смертность, факторы риска, скрининг). *Практическая онкология* 3. -№1 (март), 2000

16. CRUK. Bowel cancer incidence statistics. 2017. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer/incidence#heading-One>

17. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatisse O, Are C. Colorectal cancer—global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol*. 2017;115:619–30.

18. Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int>. Data version: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024. [https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group\\_populations=1&types=1](https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&types=1)

19. О.В. Шатковская, Б.Т. Онгарбаев, Г.Т. Сейсенбаева, А.Е. Аждагамбетова, А.Ж. Жылкайдарова, И.К. Лаврентьева, М.С. Саги. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2022 год (статистические и аналитические материалы) / под редакцией Д.Р. Кайдаровой /– Алматы, 2023. – 430 с.

20. Dolatkah R., Somi M.H., Kermani I.A. et al. Increased colorectal cancer incidence in Iran: a systematic review and meta-analysis // *BMC public health*. – 2015. – Vol. 15. – P. 997.

21. Labianca R., Beretta G. D., Kildani B. et al. Colon cancer // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2010. – Vol. 74, Issue 2. – P. 106-133.

22. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA: a cancer Journal for clinicians*. – 2021. – Vol. 71, №3. – P 209-249.

23. Mauyenova D., Zhadykova Y., Khozhayev A. et al. Trends of Colorectal Cancer Incidence in Kazakhstan // *Asian Pacific Journal of cancer prevention: APJCP*. – 2021. – Vol. 22, Issue 10. – P. 3405-1-3405-10.

24. Zhylkaidarova A., Kaidarova D., Batyrbekov K. et al. Trends of Colorectal Cancer Prevalence in Kazakhstan Related to Screening // *Clinical endoscopy*. – 2021. – Vol. 54, Issue 1. – P. 32-37.

25. Кайдарова Д.Р., Жылкайдарова А.Ж., Ахметов А.А., Шаназаров Н.А., Батырбеков К.У. [Изменение эпидемиологической ситуации по колоректальному раку в Казахстане после внедрения скрининга]. *Вестник Авиценны* 2018;2-3:157–165.

26. Bekisheva A., Makishev A., Dauletyarova M. et al. Mortality and morbidity from colon cancer in the republic of Kazakhstan // *Georgian medical news.* – 2020. – Vol. 4, Issue 301. – P. 54-59.
27. Бекишева А.Т., Макишев А.К. Результаты применения реабилитационной программы у пациентов после гастрэктомии по поводу рака желудка // *Евразийский онкологический журнал.* – 2018. – Т. 6, №1. – С. 473.
28. Rao S., Tan G., Abdulla H. et al. Does colectomy predispose to small intestinal bacterial (SIBO) and fungal overgrowth (SIFO)? // *Clinical and Translational Gastroenterology.* – 2018. – Vol. 9, Issue 4. – P. 1-8.
29. Zhylkaidarova A., Kaidarova D., Batyrbekov K. et al. Trends of Colorectal Cancer Prevalence in Kazakhstan Related to Screening // *Clinical endoscopy.* – 2021. – Vol. 54, Issue 1. – P. 32-37.
30. Z. Y. Zhang, K. Z. Guiley, and K. M. Shokat, “Chemical acylation of an acquired serine suppresses oncogenic signaling of KRas(G12S),” *Nature Chemical Biology*, vol. 18, no. 11, pp. 1177–1183, 2022.
31. Y. S. Tsai, M. G. Woodcock, S. H. Azam et al., “Rapid idiosyncratic mechanisms of clinical resistance to KRAS G12C inhibition,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 132, no. 4, 2022.
32. M. Y. M. Teo, J. Y. Fong, W. M. Lim, and L. L. A. In, “Current advances and trends in KRAS targeted therapies for colorectal cancer,” *Molecular Cancer Research*, vol. 20, no. 1, pp. 30–44, 2022.
33. J. X. Li, R. Z. Li, L. R. Ma et al., “Targeting mutant Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog in non-small cell lung cancer: current difficulties, integrative treatments and future perspectives,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, 2022.
34. Begimbetova D, Kukanova A, Fazyl F, Manekenova K, Omarov T, Burska AN, Khamijan M, Gulyayev A, Yermekbayeva B, Makishev A, Saliev T, Batyrbekov K, Aitbayev C, Spatayev Z, Sarbassov D. The Oxidative Drug Combination for Suppressing KRAS G12D Inducible Tumour Growth. *Biomed Res Int.* 2022 Dec 30;2022:9426623. doi: 10.1155/2022/9426623. PMID: 36619305; PMCID: PMC9822755.
35. Z. H. Xu, W. Q. Wang, L. Liu, and W. H. Lou, “A special subtype: revealing the potential intervention and great value of KRAS wildtype pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-reviews on,*” *Cancer*, vol. 1877, no. 4, 2022.
36. R. Pirlog and G. A. Calin, “KRAS mutations as essential promoters of lymphangiogenesis via extracellular vesicles in pancreatic cancer,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 132, no. 14, 2022.
37. J. K. Messex, K. L.A. Adams, W.G.Hawkinsetal., “Oncogenic Kras-mediated cytokine CCL15 regulates pancreatic cancer cell migration and invasion through ROS,” *Cancers*, vol. 14, no. 9, p. 2153, 2022.
38. C. X. Zhu, X. Guan, X. Zhang et al., “Targeting KRAS mutant cancers: from druggable therapy to drug resistance,” *Molecular Cancer*, vol. 21, no. 1, p. 159, 2022.
39. L. M. Huang, Z. Guo, F. Wang, and L. Fu, “KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer,” *Signal transduction and targeted Therapy*, vol. 6, no. 1, 2021.

40. M. Porru, L. Pompili, C. Caruso, A. Biroccio et al., "Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities," 2018. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
41. A. Indini, E. Rijavec, M. Ghidini, A. Cortellini et al., "Targeting KRAS in Solid Tumors: Current Challenges and Future Opportunities of Novel KRAS Inhibitors," 2021. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
42. D. Reita, L. Pabst, E. Pencreach, E. Guérin et al., "Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance," 2022. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
43. M. H. Hofmann, D. Gerlach, S. Misale, M. Petronczki et al., "Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants," 2022. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
44. A. Ferreira, F. Pereira, C. Reis, M. José Oliveira et al., "Crucial Role of Oncogenic KRAS Mutations in Apoptosis and Autophagy Regulation: Therapeutic Implications," 2022. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
45. K. Parikh, G. Banna, S. V. Liu, A. Friedlaender et al., "Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review," 2022. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
46. M. Santarpia, G. Ciappina, C. Claudia Spagnolo, A. Squeri et al., "Targeted therapies for KRAS-mutant non-small cell lung cancer: from preclinical studies to clinical development—a narrative review," 2023. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
47. I. Randelović, K. Nyíri, G. Koppány, M. Baranyi et al., "Gluing GAP to RAS Mutants: A New Approach to an Old Problem in Cancer Drug Development," 2023.
48. Y. Zhou, Y. Kuang, C. Wang, Y. Yu et al., "Impact of KRAS mutation on the tumor microenvironment in colorectal cancer," 2024. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
49. J. Neumann, "Häufigkeit und klinische Relevanz von KRAS Mutationen im metastasierten Dickdarmkarzinom," 2012. [PDF]
50. P. Dimaras, "Study of Mutations and Expression of Genes Correlated to the Appearance of Colorectal Cancer / Проучване на мутации и експресия на гени, корелиращи с изязвата на колоректален карцином," 2017. [PDF]
51. M. Y. Fedyanin, A. M. Strogonova, A. I. Senderovich, S. L. Dranko et al., "Изучение конкордантности мутационного статуса генов KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки," 2017. [PDF]
52. A. Tysarowski and A. Nasierowska-Guttmejer, "Quality and practical aspects of pathological and molecular diagnostics in metastatic colorectal cancer (mCRC)," 2018. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
53. E. De Falco, L. Pacini, D. Bastianelli, G. Paolo Spinelli et al., "Concomitant Mutations G12D and G13D on the Exon 2 of the KRAS Gene: Two Cases of Women with Colon Adenocarcinoma," 2021. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
54. T. Bedau, C. Heydt, U. Siebolts, T. Zander et al., "Concurrent KRAS p.G12C mutation and ANK3:RET fusion in a patient with metastatic colorectal cancer: a case report," 2024. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)
55. A. Acharya, I. Das, D. Chandhok, and T. Saha, "Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential," 2010. [ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)

56. S. Anais Castaldo, J. Raquel Freitas, N. Vasconcelos Conchinha, and P. A. Madureira, "The tumorigenic roles of the cellular REDOX regulatory systems," 2016.
57. A. Leone, M. Serena Roca, C. Ciardiello, S. Costantini et al., "Oxidative Stress Gene Expression Profile Correlates with Cancer Patient Poor Prognosis: Identification of Crucial Pathways Might Select Novel Therapeutic Approaches," 2017. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
58. А. Д. Падюкова, Арсений Евгеньевич Южалин, Антон Геннадьевич Кутихин, Алексей Николаевич Волков et al., "АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ИНТЕРЛЕЙКИНОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА," 2017.
59. J. Lin, C. C. Chuang, and L. Zuo, "Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets," 2017. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
60. R. A. Moskalenko, Y.S. Korneeva, "Role of adipose tissue in the development and progression of colorectal cancer," 2019.
61. K. Fatima Zahra, R. Lefter, A. Ali, E. C. Abdellah et al., "The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants," 2021. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
62. M. Javed Iqbal, A. Kabeer, Z. Abbas, H. Anees Siddiqui et al., "Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer," 2024. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
63. K. Li, Z. Deng, C. Lei, X. Ding et al., "The Role of Oxidative Stress in Tumorigenesis and Progression," 2024. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
64. S. N. Nesterov, A. A. Strat, С. Н. Нестеров, and А. А. Страт, "РОБОТ-АССИСТИРОВАННАЯ РАДИКАЛЬНАЯ ПРОСТАТЭКТОМИЯ В ЛЕЧЕНИИ КЛИНИЧЕСКИ ЛОКАЛИЗОВАННОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)," 2012. [PDF]
65. P. Pietro Bianchi, F. Luca, W. Petz, M. Valvo et al., "The role of the robotic technique in minimally invasive surgery in rectal cancer," 2013. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
66. E. V. Chernoglazova, G. V. Vyshinskaya, S. L. Gutorov, I. V. Sagaydak et al., "НЕПОСРЕДСТВЕННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ МЕТАСТАЗАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ПЕЧЕНИ," 2015. [PDF]
67. А. А. Nevol'skikh, В. А. Berdov, L. N. Titova, А. А. Невольских et al., "СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ," 2015. [PDF]
68. В. Ф. Куликовский, Н. В. Олейник, А. В. Солошенко, А. В. Наумов et al., "Хирургическое лечение метастазов колоректального рака в печень," 2015. [PDF]
69. Ю. В. Слободин, Е. А. Адуцкевич, and С. А. Сидоров, "Лапароскопическая хирургия колоректального рака в условиях спаечного процесса органов брюшной полости," 2019. [PDF]
70. M. Gómez Ruiz, M. Lainez Escribano, C. Cagigas Fernández, L. Cristobal Poch et al., "Robotic surgery for colorectal cancer," 2020. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)

71. K. Kossenias, I. Karamatzanis, O. Moutzouri, B. Catalli et al., "Precision Versus Practicality: A Comprehensive Analysis of Robotic Right Colectomy Versus Laparoscopic Right Colectomy, Future Directions, Biases, Research Gaps, and Their Implications," 2024. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
72. E. V. Chernoglazova, G. V. Vyshinskaya, S. L. Gutorov, I. V. Sagaydak et al., "НЕПОСРЕДСТВЕННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ МЕТАСТАЗАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ПЕЧЕНИ," 2015. [PDF]
73. М. Ю. Федянин, "МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ РАК АНАЛЬНОГО КАНАЛА: ВОЗМОЖНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ," 2016.
74. M. Igorevna Sekacheva and Марина Игоревна Секачева, "Регорафениб: новый препарат для лечения метастатического колоректального рака," 2016.
75. I. N. Druzhkova, M. V. Shirmanova, D. S. Kuznetsova, M.M. Lukina et al., "Modern Approaches to Testing Drug Sensitivity of Patients' Tumors (Review)," 2020. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
76. S. Spranger and T. Gajewski, "Rational combinations of immunotherapeutics that target discrete pathways," 2013. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
77. D. B. Kazanskiy, Y. Yu. Silaeva, A. A. Kalinina, M. A. Zamkova et al., "Метаболические аспекты адоптивной иммунотерапии опухолей," 2017. [PDF]
78. N. Sumransub, K. Vantanasiri, A. Prakash, and E. Lou, "Advances and new frontiers for immunotherapy in colorectal cancer: Setting the stage for neoadjuvant success?," 2021. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
79. M. Wozniakova, J. Skarda, and M. Raska, "The Role of Tumor Microenvironment and Immune Response in Colorectal Cancer Development and Prognosis," 2022. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
80. D. R. Wang, X. L. Wu, and Y. L. Sun, "Therapeutic targets and biomarkers of tumor immunotherapy: response versus non-response," 2022. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
81. A. Mauri Cornista, M. Virginia Giolito, K. Baker, H. Hazime et al., "Colorectal Cancer Immunotherapy: State of the Art and Future Directions," 2023. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
82. D. D. Li, Y. L. Tang, and X. Wang, "Challenges and exploration for immunotherapies targeting cold colorectal cancer," 2023. [ncbi.nlm.nih.gov](https://ncbi.nlm.nih.gov)
83. Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio II, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross SS, Cantley LC. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*. 2015 Dec 11;350(6266):1391-6. doi: 10.1126/science.aaa5004. Epub 2015 Nov 5. PMID: 26541605; PMCID: PMC4778961.
84. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 2012;149:656–70.
85. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, et al. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 1993;260:85–8.
86. Glanz S. Biomedical statistics. – М.: Practice, 1998. – 459 p.

87. 274 dos Santos Silva I. Cancer epidemiology: principles and methods. – Lion: IARC, 1999. – 441 p.
88. 275 Merkov A.M., Polyakov L.Y. Health Statistics. – Leningrad: Medicine, 1974. – 384 p.
89. 276 Online Statistical Calculator // <https://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html>. 15.09.2021.
90. Begimbetova, D.; Burska, A.N.; Baltabekova, A.; Kussainova, A.; Kukanova, A.; Fazyl, F.; Ibragimova, M.; Manekenova, K.; Makishev, A.; Bersimbaev, R.I.; et al. The Vitamin C Enantiomers Possess a Comparable Potency in the Induction of Oxidative Stress in Cancer Cells but Differ in Their Toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 2531. <https://doi.org/10.3390/ijms25052531>



# ПРИЛОЖЕНИЕ А

## Свидетельства авторского права

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ  
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІПІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

ҚУӘЛІК

2023 жылғы «11» қаңтар № 31694

Автордың (автордың) және, атты, иеліктің аты (авторға және басқа құқықтандырушымен қорықта көрсетілме):  
КУБАНОВА АСНЯ МАРАТОВНА, Максим Абай Қайратовичі

Авторлық құқық объектісі: ғылыми мақалы

Объектінің атауы: Подвижки в клеточном конформационном пространстве белых после зрительского лечения

Объектінің жасалған күні: 10.01.2023



Құқық тасушының қолданушының аты мен ата-жарық аты: Беларусь Республикасының Республикалық Ғылым Академиясының Президенті

Құқықтандырушының аты мен ата-жарық аты: Беларусь Республикасының Президенті

ЭЦҚ ескі нұсқасында

Е. Далаева

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Свидетельства авторского права

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ  
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

ҚУӘЛІК

2023 жылғы «2» тамыз № 38224

Автордың (тарихи) жеке, аты, өресінің аты (егер ол жеке басым құралдарының атында көрсетілсе):  
**БЕГІМБЕТОВА ДИНАРА АЙТБАЕВНА, САРБАСОВ ДОС ДЖУРМАХАНБЕК, КУКАНОВА АСИЯ  
МАРАТОВНА, ФАЗЫЛ ФАТИМА БАБИТҚЫЗЫ**

Авторлық құқық объектісі: **ғылыми туынды**

Объектінің атауы: **Применения комбинации окислительных препаратов для позавалкии роста спухали,  
индуцируемой Kras G12D в доклинических исследованиях**

Объектіні жасаған күні: **28.07.2023**



Сенің тапсырысыңыз <http://www.kazpatent.kz> сайтының  
"Авторлық құқық" бөлімінен тіркелуе болсаңыз <https://copyright.kazpatent.kz>

Полнотаық объектіні қосымша тіркелуіңізге на сайт [www.kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)  
е жадына «Авторлық құқық» МҚА <https://www.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойырды

А. Артықов

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Акты внедрения

#### АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 2

достижений современной науки и здравоохранения, основанных на принципах доказательной медицины, в клиническую практику

Кафедра: онкологии

Наименование предложения: внедрение комбинации окислительных препаратов АТО/D-VC в комплексную терапию больных колоректальным раком с KRAS мутацией после хирургического лечения

Форма внедрения: использование комбинации окислительных препаратов АТО/D-VC в комплексной терапии больных колоректальным раком с KRAS мутацией после хирургического лечения в практике врача -онколога

Ответственный за внедрение и исполнитель: ассистент кафедры онкологии Куканова А.М., PhD Бекишева А.Т., заведующий кафедрой онкологии, д.м.н., профессор Макишев А.К.

Эффективность внедрения: комбинация окислительных препаратов АТО/D-VC подавляет KRAS мутацию посредством оксидативного стресса, что повышает чувствительность опухоли к химиотерапии и улучшает эффект послеоперационной лекарственной терапии.

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрения: комбинация оксидативных препаратов вызывает катастрофический окислительный стресс и гибель клеток, экспрессирующих мутантный KRAS in vivo. Данная комбинация препаратов применяется как комплексная терапия. Расчет дозировки подбирается индивидуально согласно разработанному протоколу. Данная комбинация препаратов одобрена FDA.

Срок внедрения: 2022-2023 гг.

#### Председатель комиссии:

Заведующий поликлиникой ГКП на ПХВ  
«Многопрофильного медицинского центра»  
акимата г. Астана Рутжанұлы И. \_\_\_\_\_

#### Исполнитель:

ассистент кафедры онкологии  
Куканова А.М. \_\_\_\_\_  
Завуч кафедры онкологии  
PhD Бекишева А.Т. \_\_\_\_\_  
заведующий кафедрой онкологии  
д.м.н., профессор Макишев А.К. \_\_\_\_\_



# ПРИЛОЖЕНИЕ Г

## Акты внедрения

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1

достижений современной науки и здравоохранения, основанных на принципах доказательной медицины, в клиническую практику

Кафедра: онкологии

Наименование предложения: внедрение комбинации окислительных препаратов АТО/D-VC в комплексную терапию больных раком поджелудочной железы с KRAS мутацией после хирургического лечения

Форма внедрения: использование комбинации окислительных препаратов АТО/D-VC в комплексной терапии больных раком поджелудочной железы с KRAS мутацией после хирургического лечения в практике врача -онколога

Ответственный за внедрение и исполнитель: ассистент кафедры онкологии Куканова А.М., PhD Бекишева А.Т., заведующий кафедрой онкологии, д.м.н., профессор Макишев А.К.

Эффективность внедрения: комбинация окислительных препаратов АТО/D-VC подавляет KRAS мутацию посредством окислительного стресса, что повышает чувствительность опухоли к химиотерапии и улучшает эффект послеоперационной лекарственной терапии.

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрения: комбинация окислительных препаратов вызывает катастрофический окислительный стресс и гибель клеток, экспрессирующих мутантный KRAS in vivo. Данная комбинация препаратов применяется как комплексная терапия. Расчет дозировки подбирается индивидуально согласно разработанному протоколу. Данная комбинация препаратов одобрена FDA.

Срок внедрения: 2022-2023 гг.

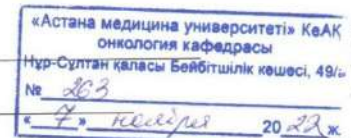
#### Председатель комиссии:

Заведующий поликлиникой ГКП на ПХВ  
«Многопрофильного медицинского центра»  
акимата г. Астана Рутжанұлы И. \_\_\_\_\_



#### Исполнитель:

ассистент кафедры онкологии  
Куканова А.М. \_\_\_\_\_  
Завуч кафедры онкологии  
PhD Бекишева А.Т. \_\_\_\_\_  
заведующий кафедрой онкологии  
д.м.н., профессор Макишев А.К. \_\_\_\_\_



## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### Акты внедрения

#### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

достижений современной науки и здравоохранения, основанных на принципах доказательной медицины, в клиническую практику

Кафедра: онкологии

Наименование предложения: разработка алгоритма питания больным колоректальным раком

Форма внедрения: использование специального алгоритма питания больных колоректальным раком в практике врача -онколога

Ответственный за внедрение и исполнитель: PhD Бекишева А.Т., ассистент кафедры онкологии Куканова А.М., заведующий кафедрой онкологии, д.м.н., профессор Макишев А.К.

Эффективность внедрения: разработанный алгоритм улучшает качество жизни больных колоректальным раком, сокращает сроки реабилитации после специального лечения.

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрения: данный алгоритм основывается на индивидуальном расчете показателей крови, физикальном осмотре и инструментальных исследований, а также применение измерительного аппарата PICOC.

Срок внедрения: 2023 гг.

Заведующий диспансерным отделением ГКП на ПХВ «Многопрофильного медицинского центра»

акимата г. Астана Рутжанұлы И.

Исполнители:

Завуч кафедры онкологии  
PhD Бекишева А.Т.

Докторант Куканова А.М.

заведующий кафедрой онкологии  
д.м.н., профессор Макишев А.К.

17.11.2023г.

# ПРИЛОЖЕНИЕ Е

## Акты внедрения

21.06.2024, 10:10

cert.amu.kz/qr/showakt.php?aktnumber=0000146 (23-24)

«АСТАНА МЕДИЦИНА  
УНИВЕРСИТЕТІ»  
коммерциялық емес акционерлік қоғам



Некоммерческое акционерное общество  
«МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ АСТАНА»

### Жаңа білім беру технологияларының нәтижелерін енгізу бойынша акт №: 0000146 (23-24) Акт внедрения результатов новой образовательной технологии

Атауы/Наименования:	Использование технологии RBL при научном исследовании на тему: "Подавление kras мутации колоректального рака при помощи воздействия оксидативного стресса у больных после хирургического лечения"
Кафедра:	Онкология
Орындаушы (лар)/Исполнитель (и):	Бекішова А.Т., Куканова А.М., Богайтұқ А.А.
Енгізу нысаны/Форма внедрения:	✓ авторлық- авторская ✓ технология - технология ✓ оқыту- для преподавания ✓ практикалық сабақта - на практическом занятии
Пән бойынша/ По дисциплине:	Онкология. Онкология в стационаре.
Курс, факультет:	Резиденты 1,2 года "Онкология взрослая", "Гастроэнтерология", "Семейная медицина", Радиационная онкология"
Апробация мерзімі/Период апробации:	15.01.2024г. - 30.05.2024г.

#### КЕЛІСІЛДІ/СОГЛАСОВАНО:

Білім беру технологияларын трансферттеу орталығының (БЕТТО) басшысы /  
Руководитель Центра трансферта образовательных технологий (ЦТОТ):  
Мухамедьярова Айгерім Бауржановна

#### БЕКІТЕМІН/УТВЕРЖДАЮ:

Проректор / Проректор  
Жунусова Айгүль Битімбаевна



БЕТТО-да тіркелген / Зарегистрировано в ЦТОТ: 20.06.2024, Рег.№ 0000146 (23-24)

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

### Заключение Локального Биоэтического Комитета НАО «МУА»



**«АСТАНА МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» КсАҚ**  
Локальды Биоэтикалық комитет

#### Решение ЛКБ НАО МУА №2

Заседание № 2

Дата (Д/М/Г) 23.02.2022 г.

Название протокола: Подавление kras мутации колоректального рака при помощи воздействия оксидативного стресса у больных после хирургического лечения.					
Основной исследователь:		Куканова А.М. Руководитель: д.м.н., профессор Макишев А.К.			
Институт:		НАО «Медицинский университет Астана»			
Рассмотренные элементы		Приложены <sup>√</sup>	Не приложены		
Повторное рассмотрение да нет <sup>√</sup>		Дата предыдущего рассмотрения:			
Решение:	Разрешено (Р) <sup>√</sup>		Разрешено с рекомендациями (Рек)		
	Повторная заявка (ПЗ)		Не разрешено (НР)		
№.	Голосование членов ЛЭК	решение			
		Р	Рек	ПЗ	НР
1	Рахметова Венера Саметовна	√			
2	Камалбекова Гульнара Маратовна	√			
3	Аканов Амангали Балтабекович	√			
4	Хамчиев Курейш Мавлович	√			
5	Базарова Анна Викентьевна	√			
6	Дербисалина Гульмира Ажмадиновна	√			
7	Мусина Айман Аяшевна	√			
8	Жусупова Гульнара Даригеровна		√		
9	Макалкина Лариса Геннадьевна				
10	Тургамбаева Асия Кайрбаевна	√			
11	Тулешова Гульнара Турехановна		√		
12	Изтаев Ергали Утебаевич				


Примечание: Р - Разрешено; Рек – Разрешено с рекомендациями; ПЗ – Повторная заявка; НР – Не разрешено

**Обсуждение:**

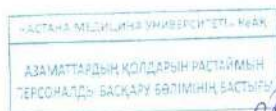
Были рассмотрены документы исследования на предмет этической совместимости, представленные на рассмотрение ЛКБ.

**Принятое решение:**

Одобрить проведение исследования.

  
Председатель ЛКБ НАО МУА  
д.м.н., проф. Рахметова В.С.

  
Секретарь ЛКБ НАО МУА  
МРН Саусаикова С.Б.



## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

### Форма информированного согласия на молекулярно-генетическое исследование

#### ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ НА УЧАСТИЕ В ИССЛЕДОВАНИИ

Участник исследования \_\_\_\_\_  
(Ф. И. О.)

Исследовательский центр: "National Laboratory Astana" при АО "Назарбаев Университет"

Врач-исследователь: **Кусякова Асия Миратовна**

Название проекта: «Разработка терапии лечения колоректального рака и рака поджелудочной железы посредством комбинации окислительных препаратов, нацеленных на KRAS мутантные раковые клетки»

#### ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Уважаемый участник исследования!

В соответствии с Вашим желанием (принять участие) у Вас предполагается произвести взятие образца биологического материала (кровь, **букальные клетки**, **биопсийный материал**, и др.), который будет использован для молекулярно-генетического исследования (исследование ДНК). Эти исследования помогут выявить носительство некоторых генетических заболеваний или увеличение риска наиболее частых болезней, развитие которых зависит как от наследственных факторов, так и от факторов внешней среды.

Прежде, чем молекулярно-генетическое исследование будет выполнено, сотрудники лаборатории Геномной и персонализированной медицины Центра наук о жизни, Назарбаев Университет, должны объяснить Вам цель тестирования, его информативность, вероятность получения правильного результата и возможные последствия тестирования (в том числе, возможность практического использования результатов) для Вас или Ваших родственников.

Подписывая данную форму, Вы подтверждаете, что даете свое согласие на молекулярно-генетическое исследование добровольно, обладая достаточной информацией, и что у Вас была возможность задать все вопросы, которые могли у Вас возникнуть относительно молекулярно-генетического исследования. Все личные данные, касающиеся Вас или Ваших родственников, являются конфиденциальными, и не могут быть переданы другим лицам иначе, как с Вашего ясно выраженного согласия. Вы можете отозвать свое согласие в любое время без дополнительных объяснений.

*Настоящим я выражаю свое согласие на то, что генетическое исследование будет выполнено:*

Мне \_\_\_\_\_  
(Фамилия, имя, отчество) (Дата рождения)

с целью \_\_\_\_\_

и биологический материал будет сохранен до получения и оценки результатов, а также для выполнения других дополнительных исследований, если это потребуется для получения четких результатов.

\_\_\_\_\_ (дата подписи)

\_\_\_\_\_ (Подпись участника)

\_\_\_\_\_ (Ф. И. О. сотрудница лаборатории)

\_\_\_\_\_ (Подпись)



Пожалуйста, определите точно, каким образом могут быть использованы Ваши образцы.

После того, как сотрудник лаборатории ответит на все Ваши вопросы, ответьте на предлагаемые вопросы, отмечая «ДА» или «НЕТ» в соответствующих графах:



Я согласен (согласна) с тем, что образец будет использован для следующего молекулярно-генетического исследования (исследований):	ДА	НЕТ
Я хочу знать результаты молекулярно-генетического исследования	ДА	НЕТ
Я согласен с тем, что результаты исследования будут предоставлены: * только мне * контактному лицу _____ (указать) * членам семьи _____ (указать)	ДА	НЕТ
Я согласен (согласна) с тем, что образец может быть использован для научных исследований, при условии, что это не приведет к раскрытию личной информации обо мне.	ДА	НЕТ
При необходимости, результаты исследований могут быть использованы в медико-генетическом консультировании или генетическом исследовании других членов семьи.	ДА	НЕТ
Я согласен (согласна) с тем, что при необходимости сотрудник лаборатории, проводящий исследование, может связаться со мной, используя контактную информацию.	ДА	НЕТ
Я согласен (согласна) с тем, чтобы мой биологический материал был сохранен и добавлен в генетический банк, для использования в других научных проектах.	ДА	НЕТ

Я могу изменить свое мнение по одному или всем пунктам в любое время.

\_\_\_\_\_  
(Ф.И.О. участника)

\_\_\_\_\_  
(Дата)

\_\_\_\_\_  
(Подпись)

Адрес \_\_\_\_\_

См. \_\_\_\_\_

Телефон: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Ф.И.О. сотрудника лаборатории)

\_\_\_\_\_  
(Дата)

\_\_\_\_\_  
(Подпись)

## ПРИЛОЖЕНИЕ И

### Форма информированного согласия на участие в клиническом исследовании

#### ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ НА УЧАСТИЕ В ИССЛЕДОВАНИИ

Участник исследования \_\_\_\_\_  
(Ф. И. О.)

Исследовательский центр: "National laboratory Astana" при АОО "Назарбаев Университет"

Врач исследователь: **Куканова Асия Маратовна**

Название проекта: «Разработка терапии лечения колоректального рака и рака поджелудочной железы посредством комбинации окислительных препаратов, нацеленных на KRAS мутантные раковые клетки»

#### Уважаемый участник исследования!

В соответствии с Вашим желанием (принять участие) у Вас предполагается произвести взятие образца биологического материала (кровь, букальные клетки, биопсийный материал, и др.), который будет использован для лабораторных исследований, будет производиться сбор данных истории болезни (включая предыдущие лабораторно-диагностические исследования, консультации специалистов и проводимого лечения). Эти исследования помогут выявить факторы риска появления вашего заболевания, оценить течение болезни, провести динамическое наблюдение состояния здоровья, проанализировать результаты лечения.

Сотрудники лаборатории Геномной и персонализированной медицины Центра наук о жизни, Назарбаев Университет и кафедры онкологии НАО «медицинский университет Астана» объяснят Вам цель исследования и его задачи.

Подписывая данную форму, Вы подтверждаете, что даете свое согласие на участие в данном исследовании добровольно, обладая достаточной информацией, и что у Вас была возможность задать все вопросы, которые могли у Вас возникнуть относительно молекулярно-генетического исследования. Все личные данные, касающиеся Вас или Ваших родственников, являются конфиденциальными, и не могут быть переданы другим лицам иначе, как с Вашего ясно выраженного согласия. Вы можете отозвать свое согласие в любое время без дополнительных объяснений.

*Настоящим я выражаю свое согласие на участие в исследовании:*

Я \_\_\_\_\_  
(Фамилия, имя, отчество) (Дата рождения)  
\_\_\_\_\_  
(дата подписи) (Подпись участника)  
\_\_\_\_\_  
(Ф. И. О. сотрудника лаборатории) (Подпись)

**Я могу изменить свое мнение по одному или всем пунктам в любое время.**

\_\_\_\_\_  
(Ф.И.О. участника) (Дата) (Подпись)  
Адрес \_\_\_\_\_  
e-mail: \_\_\_\_\_  
Телефон: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(Ф.И.О. сотрудника лаборатории) (Дата) (Подпись)

# ПРИЛОЖЕНИЕ К




## Евразийский патент на изобретение № 044080

06.09.2023, 10:23

ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ (ЕАПО)

### РЕЕСТР ЕВРАЗИЙСКИХ ПАТЕНТОВ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### Евразийский патент на изобретение № 044080

Библиографические данные	
(11) Номер евразийского патента	044080 
Дата регистрации в Реестре евразийских патентов	2023.07.20
(21) Номер евразийской заявки	202190580
(22) Дата подачи евразийской заявки	2019.08.20
(51) Индексы Международной патентной классификации	<b>A61K 31/4025</b> (2006.01) <b>A61K 31/41</b> (2006.01) A61K 31/7135 (2006.01)
(43)(13) Дата публикации евразийской заявки, код вида документа	<b>A1</b> 2021.06.25 Бюллетень № 06  <a href="#">ТИТ.ЛИСТ, ОПИСАНИЕ</a>
(45)(13) Дата публикации евразийского патента, код вида документа	<b>B1</b> 2023.07.21 Бюллетень № 07  <a href="#">ТИТ.ЛИСТ, ОПИСАНИЕ</a>
(31) Номер заявки, на основании которой испрашивается приоритет	62/720,257
(32) Дата подачи заявки, на основании которой испрашивается приоритет	2018.08.21
(33) Код страны, идентифицирующий ведомство или организацию, которая присвоила номер заявки, на основании которой испрашивается приоритет	US
(86) Номер и дата подачи международной заявки	US2019/047334
(87) Номер и дата публикации международной заявки	2020/041364 2020.02.27
(71) Сведения о заявителе(ях)	БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС СИСТЕМЗ (US)
(72) Сведения об изобретателе(ях)	Сарбассов Дос Д., У Синган, Эллис Ли, Бхаттачария Раджат (US)
(73) Сведения о патентовладельце(ях)	БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС СИСТЕМЗ (US)
(54) Название изобретения	КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ ИНДУКЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА
СВЕДЕНИЯ О ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВЕ	
Сведения о представителях патентовладельца	МЕДВЕДЕВ Валерий Николаевич (RU)
Адрес для переписки	ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры" ул. Большая Спасская, д. 25, стр. 3, г. Москва, Россия, 129090
СВЕДЕНИЯ О ДЕЙСТВИИ ПАТЕНТА НА ТЕРРИТОРИИ ДОГОВАРИВАЮЩИХСЯ ГОСУДАРСТВ И РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА	

Срок первой уплаты годовой пошлины	2023.10.20									
Сведения о действии патента на территории Договаривающихся государств и Республики Молдова	Год	Период	AM	AZ	BY	KG	KZ	RU	TJ	TM
	1	2019.08.20 - 2020.08.20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	2	2020.08.21 - 2021.08.20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	3	2021.08.21 - 2022.08.20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	4	2022.08.21 - 2023.08.20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	5	2023.08.21 - 2024.08.20	-	-	-	-	✓	✓	-	-

[Назад](#) | [Новый поиск](#)

[Оформить заявление о поддержании евразийского патента в силе](#)

[Оформить заявление о поддержании евразийского патента в силе в порядке доуказания](#)



**ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО**

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ



**ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ  
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ  
№ 044080**

**Название изобретения:**

**«КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ ИНДУКЦИИ  
ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА»**

**Патентовладельцы:**

**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДВЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС СИСТЕМЗ (US)**

**Изобретатели:**

**Сарбассов Дос Д., У Синган, Эллис Ли, Бхаттачария Раджат (US)**

**Заявка №: 202190580**

**Дата подачи заявки: 20 августа 2019 г.**

**Дата выдачи патента: 21 июля 2023 г.**

Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение с формулой, опубликованной в Бюллетене Евразийского патентного ведомства «Изобретения (евразийские заявки и патенты)» № 7 / 2023 год.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств-участников Евразийской патентной конвенции – Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана.

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 1650024017000

Владелец: Ивлиев Григорий Петрович

Действителен с 15.04.2022 по 14.04.2027

**ИВЛИЕВ Григорий Петрович  
Президент Евразийского патентного ведомства**



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.07.21
- (21) Номер заявки  
202190580
- (22) Дата подачи заявки  
2019.08.20
- (51) Int. Cl. *A61K 31/4025* (2006.01)  
*A61K 31/41* (2006.01)  
*A61K 31/7135* (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК  
ПОСРЕДСТВОМ ИНДУКЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

- (31) 62/720,257  
(32) 2018.08.21  
(33) US  
(43) 2021.06.25  
(86) PCT/US2019/047334  
(87) WO 2020/041364 2020.02.27  
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМЗ (US)
- (72) Изобретатель:  
Сарбасов Дос Д., У Синган, Эллис  
Ли, Бхаттачария Раджат (US)
- (74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)
- (56) Grad et al. "Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells" *Blood*, 2001, vol 98, pg. 1-31; pg. 1, abstract, pg. 3, para 2, pg. 21, para 3  
Li. "Vitamin C, a Multi-Tasking Molecule, Finds a Molecular Target in Killing Cancer Cells" *Reactive Oxygen Species*, 01 March 2016 (01.03.2016), vol 1, pg. 141-156; pg. 141, abstract, pg. 149, right col, para 1  
Biase et al. "Fasting-Mimicking Diet Reduces HO-1 to Promote T Cell-Mediated Tumor Cytotoxicity" *Cancer Cell*, 11 July 2016 (11.07.2016), vol 30, pg. 136-146; pg. 136, abstract, pg. 137, left col, para 1  
US-B2-9931315  
WO-A1-2016069458  
Noguem et al. "High-dose ascorbate and arsenic trioxide selectively kill acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia blasts in vitro" *Oncotarget*, 06 March 2017 (06.03.2017), vol 16, pg. 1-15
- (57) В изобретении предусматриваются способы и композиции для лечения злокачественных опухолей посредством D-VC и триоксида мышьяка. В некоторых аспектах злокачественные опухоли для лечения согласно вариантам осуществления включают злокачественные опухоли с повышенной экспрессией GLUT1 и/или имеют мутацию KRAS.

Настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/720257, поданной 21 августа 2018 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### Уровень техники, к которому относится изобретение

##### 1. Область изобретения.

Изобретение относится, главным образом, к области онкологии. Более конкретно, оно относится к лечению злокачественной опухоли посредством индукции цитотоксического оксидативного стресса.

##### 2. Описание уровня техники.

Многие метастазирующие злокачественные опухоли в настоящее время неизлечимы, и 5-летняя выживаемость все еще является очень низкой, несмотря на десятилетия исследований и постоянно растущее финансирование. Например, мутации KRAS являются частыми при раке поджелудочной железы, раке ободочной и прямой кишки и раке легкого, и в настоящее время в настоящее время не существует эффективного вмешательства в случае онкогена KRAS. Одним из возможных подходов для лечения злокачественных опухолей, таких как злокачественные опухоли с мутантным KRAS, является индукция оксидативного стресса, который может селективно уничтожать злокачественные клетки относительно окружающей нормальной ткани. Однако не сегодняшний день остается потребность в способах и композициях, которые способны индуцировать достаточный оксидативный стресс, который является селективным в отношении злокачественных клеток, для обеспечения терапевтической эффективности.

#### Сущность изобретения

В первом варианте осуществления предусматривается способ лечения злокачественной опухоли у индивидуума, включающий воздействие на злокачественные клетки оксидативного стресса и введение индивидууму эффективного количества D-VC или его фармацевтически приемлемых солей. В некоторых аспектах воздействие на злокачественные клетки оксидативного стресса включает введение индивидууму эффективного количества окислителя. Например, в некоторых аспектах окислитель выбран из группы, состоящей из (но не ограничиваясь ими) триоксида мышьяка (ATO), метилового эфира 2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO-Me), куркумина, бегулиновой кислоты, синтетического нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), GT-094, целастрола, толперизона и ланперизона (производное толперизона).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы триоксида мышьяка (ATO) и D-витамина C (D-VC, также известного как D-аскорбиновая кислота) или их фармацевтически приемлемых солей. В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль с мутантным KRAS. В некоторых аспектах злокачественная опухоль протестирована, и определено, что она имеет мутацию KRAS. В некоторых аспектах злокачественная опухоль демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1. В некоторых аспектах злокачественная опухоль протестирована, и определено, что она демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1 или демонстрирует высокое поглощение глюкозы. В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль с мутантным KRAS и демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1.

В некоторых аспектах оксидативный стресс применяют отдельно от введения D-VC. В следующих аспектах оксидативный стресс применяют в течение 24 ч от введения D-VC. В следующих аспектах оксидативный стресс применяют в пределах 8, 6, 4 или 2 ч от введения D-VC. В следующих аспектах оксидативный стресс применяют в пределах 1 ч от введения D-VC. В некоторых аспектах оксидативный стресс применяют по существу одновременно с введением D-VC. В других аспектах D-VC вводят после применения оксидативного стресса. В следующих аспектах D-VC вводят приблизительно через 2 ч после применения оксидативного стресса.

В некоторых аспектах окислитель, например ATO, и D-VC вводят в отдельных композициях. В следующих аспектах окислитель, такой как ATO, и D-VC вводят в пределах 24 ч друг от друга. В следующих аспектах окислитель (например, ATO) и D-VC вводят в пределах 8, 6, 4 или 2 ч друг от друга. В следующих аспектах окислитель (например, ATO) и D-VC вводят в пределах 1 ч друг от друга. В некоторых аспектах ATO и D-VC вводят совместно. В других аспектах D-VC вводят после окислителя (например, ATO). В следующих аспектах D-VC вводят приблизительно через 2 ч после введения окислителя (например, ATO).

В некоторых аспектах индивидуум является голодным. В некоторых аспектах индивидуум голодает в течение по меньшей мере 1 ч перед введением D-VC. В других аспектах индивидуум голодает в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 или 24 ч перед введением D-VC. В некоторых аспектах способы, кроме того, включают тестирование уровня глюкозы в крови индивидуума перед введением D-VC. В некоторых аспектах окислитель (например, ATO) и D-VC составляют в одной композиции. В некоторых аспектах окислитель (например, ATO) и D-VC вводят по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 раз. В некоторых аспектах окислитель (например, ATO) и D-VC вводят каждые сутки в течение одной недели, двух недель, одного месяца, двух месяцев или трех месяцев. В некоторых аспектах окислитель представляет собой ATO, и его вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно

10 мг/кг. В следующих аспектах АТО вводят в дозе от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В следующих аспектах АТО вводят в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг. Например, АТО можно вводить в дозе по меньшей мере от 0,1 мг/кг до приблизительно 0,5, 1, 2, 3 или 4 мг/кг. В следующих аспектах АТО вводят в дозе приблизительно 0,2 мг/кг.

В некоторых аспектах D-VC вводят в дозе от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 г/кг. В следующих аспектах D-VC вводят в дозе от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 20 г/кг. В следующих аспектах D-VC вводят в дозе от приблизительно 150 мг/кг до приблизительно 15 г/кг. В следующих аспектах D-VC вводят в дозе приблизительно 1,5 г/кг. В некоторых аспектах индивидуум является голодным при введении окислителя (например, АТО) и D-VC. В некоторых аспектах индивидуум голодает в течение по меньшей мере 2 ч перед введением окислителя (например, АТО) и D-VC. В некоторых аспектах индивидуум продолжает голодать в течение по меньшей мере 2 ч после введения окислителя (например, АТО) и D-VC.

В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, рак ободочной и прямой кишки, рак поджелудочной железы или рак легкого. В следующих аспектах лейкоз представляет собой острый промиелоцитарный лейкоз (APL). В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки или множественную миелому. В некоторых аспектах злокачественная опухоль имеет мутацию KRAS и/или демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1. В некоторых аспектах АТО и/или D-VC вводят внутривенно, внутривнутрибрюшинно, интратекально, внутрь опухоли, внутримышечно, эндоскопическим путем, внутрь очага повреждения, подкожно, регионарным путем или посредством прямой инъекции или перфузии. В других аспектах АТО и/или D-VC вводят не парентеральным путем. В следующих аспектах АТО и/или D-VC вводят местным, эпидермальным или мукозальным путем. В некоторых аспектах АТО и D-VC вводят интраназально, перорально, вагинальным путем, ректально, сублингвально или местным путем. В некоторых аспектах АТО и D-VC вводят одним и тем же путем введения. В некоторых аспектах способы дополнительно включают лечение посредством по меньшей мере одной другой терапии против злокачественной опухоли. В следующих аспектах по меньшей мере одна другая терапия против злокачественной опухоли выбрана из резекции опухоли, химиотерапии, иммунотерапии и лучевой терапии. В следующих аспектах по меньшей мере одна другая терапия против злокачественной опухоли включает окислитель. В конкретных аспектах окислитель выбран из группы, состоящей из метилового эфира 2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO-Me), куркумина, бетулиновой кислоты, синтетического нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), GT-094, целастрола, толперизона и ланперизона.

В следующих вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим окислитель (например, триоксид мышьяка (АТО), метиловый эфир 2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO-Me), куркумин, бетулиновая кислота, синтетическое нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID), GT-094, целастрол, толперизон и ланперизон (производное толперизона)) и D-VC или его фармацевтически приемлемые соли, составленные в фармацевтически приемлемом эксципиенте. В следующих вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим триоксид мышьяка (АТО) и D-VC или его фармацевтически приемлемые соли, составленные в фармацевтически приемлемом эксципиенте.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам идентификации индивидуума для лечения окислителем (например, АТО) и D-VC, включающим тестирование образца от индивидуума для определения того, имеет ли индивидуум злокачественную опухоль, которая содержит мутацию KRAS и/или демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1, где, если злокачественная опухоль содержит мутацию KRAS и/или демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1 или высокое всасывание глюкозы, тогда индивидуум является кандидатом для терапии посредством АТО и D-VC. В некоторых аспектах способы, кроме того, включают проведение терапии АТО и D-VC у идентифицированного индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли у индивидуума, включающим воздействие на злокачественные клетки оксидативного стресса посредством введения эффективного количества триоксида мышьяка (АТО) или его фармацевтически приемлемых солей и эффективного количества второго окислителя индивидууму. В некоторых аспектах второй окислитель выбран из группы, состоящей из метилового сложного эфира 2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO-Me), куркумина, бетулиновой кислоты, синтетического нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), GT-094, целастрола, толперизона и ланперизона. В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль с мутантным KRAS. В некоторых аспектах злокачественная опухоль протестирована, и определено, что она имеет мутацию KRAS. В некоторых аспектах злокачественная опухоль имеет повышенную экспрессию GLUT1 или высокое поглощение глюкозы. В некоторых аспектах злокачественная опухоль протестирована, и определено, что она имеет повышенную экспрессию GLUT1. В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль с мутантным KRAS и демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1. В некоторых аспектах второй окислитель вво-



дят в пределах 24 ч от введения АТО. В некоторых аспектах второй окислитель вводят в пределах 8, 6, 4 или 2 ч от введения АТО. В некоторых аспектах второй окислитель вводят в пределах 1 ч от введения АТО. В некоторых аспектах АТО вводят после введения второго окислителя. В следующих аспектах АТО вводят приблизительно через 2 ч после второго окислителя. В некоторых аспектах индивидуум является голодным. В некоторых аспектах индивидуум является голодным в течение по меньшей мере 1 ч перед введением АТО. В следующих аспектах индивидуум является голодным в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 или 24 ч перед введением АТО. В некоторых аспектах способы, кроме того, включают тестирование уровня глюкозы в крови индивидуума перед введением АТО.

Как используют в рамках изобретения, "по существу свободный" в отношении определенного компонента, используют в настоящем описании для указания на то, что никакое количество указанного компонента не составлено намеренно в композицию и/или присутствует только в качестве примеси или в следовых количествах. Общее количество указанного компонента в результате ненамеренной контаминации композиции предпочтительно составляет менее 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой не может быть обнаружено никакое количество указанного компонента с использованием стандартных способов анализа.

Как используют в рамках изобретения в описании и формуле изобретения, форма единственного числа означает один или несколько. Как используют в рамках изобретения в описании и формуле изобретения, при использовании со словом "содержащий", форма единственного числа может означать один или более одного. Как используют в рамках изобретения в описании и формуле изобретения, "другой" или "следующий" может означать по меньшей мере второй или более.

Как используют в рамках изобретения в описании и формуле изобретения, термин "приблизительно" используют для указания на то, что величина включает присущее ей варьирование в результате погрешности устройства, способа, используемого для определения величины, или варьирования, которое существует среди исследуемых индивидуумов.

Другие задачи, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из приведенного ниже подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на определенные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными специалистам в данной области из этого подробного описания.

#### Краткое описание чертежей

Приведенные ниже чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может стать более понятным с помощью одного или нескольких из этих чертежей в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, приведенных в настоящем описании.

Фиг. 1 - комбинированные способы лечения витамин С/АТО и D-витамин С/АТО являются эффективными в отношении индукции цитотоксичности в злокачественных клетках с мутантным KRAS. Клетки рака ободочной и прямой кишки HCT116 обрабатывали указанным раствором в течение 72 ч: контроль (фосфатно-солевой буфер, PBS, добавленный к культуральной среде в разведении 1:1000), 1 mM VC (витамин С использовали в концентрации 1 mM), 1 mM D-VC (D-витамин С использовали в концентрации 1 mM), 5 мкМ АТО (триоксид мышьяка использовали в концентрации 5 мкМ) и комбинация 1 mM VC с 5 мкМ АТО или 1 mM D-VC с 5 мкМ АТО. Изображения клеток представлены с обозначениями, указывающими на обработку клеток;

фиг. 2 - проточно-цитометрический анализ апоптоза злокачественной опухоли HCT116 после обработки лекарственным средством. Клетки HCT116 обрабатывали лекарственными средствами, как описано на фиг. 1, и после обработки клетки окрашивали аннексином-V FITC и сортировали;

фиг. 3 - графическое представление апоптоза по данным проточной цитометрии. Данные проточной цитометрии в отношении апоптоза, показанные на фиг. 2, представлены в качестве графика;

фиг. 4 - детекция активных форм кислорода (ROS) посредством проточной цитометрии. Клетки HCT116 обрабатывали указанными соединениями, как описано на фиг. 1, и анализировали посредством проточной цитометрии для обнаружения присутствия активных форм кислорода с помощью реагента Mito Sox Red. Mito Sox Red представляет собой реагент от Invitrogen™, каталожный номер #LSM360084;

фиг. 5 - графическое представление присутствия активных форм кислорода (ROS), определенное посредством проточной цитометрии. Данные детекции ROS, представленные на фиг. 4, приведены в качестве графика;

фиг. 6 - ксенотрансплантированные опухоли HCT116 после 9 инъекций. Изображены ксенотрансплантированные опухоли каждой из 5 мышей на условия введения. Мышам внутривенно вводили PBS (контроль), витамин С (1,5 г/кг), D-витамин С (1,5 г/кг), АТО 7 мг/кг, АТО (7 мг/кг)+витамин С (1,5 г/кг) или АТО (7 мг/кг)+D-витамин С (1,5 г/кг). Мышам проводили инъекцию каждые сутки в течение 6 суток и после 6-й инъекции мышей оставляли в покое на одни сутки. Рубцевание наблюдали в нескольких опухолях, включая все из опухолей после введения D-VC+АТО;

фиг. 7 - ксенотрансплантированные опухоли HCT116 после 12 инъекций. Изображены ксенотрансплантированные опухоли каждой из 5 мышей на условия введения, как описано на фиг. 6, после 12 инъ-

екций (лечение в течение 2 недель). Рубцевание наблюдали в нескольких опухолях, включая все из опухолей после введения D-VC+ATO;

фиг. 8 - ксенотрансплантированные опухоли HCT116 после 15-й (конечной) инъекции после резекции. Представлены вырезанные опухоли после 15 инъекций, описанных на фиг. 6. Рубцевание наблюдали в нескольких опухолях, включая все из опухолей после введения D-VC+ATO;

фиг. 9 - масса опухолей после 15 инъекций. Значения p для одностороннего статистического анализа ANOVA показывают статистически значимое отличие в массе опухоли между группами мышей, представленными на фиг. 8, которым вводили PBS против VC+ATO, PBS против D-VC+ATO, и VC+ATO против D-VC+ATO.

#### Описание иллюстративных вариантов осуществления

Витамин С в его природной форме, также обозначаемый в настоящем описании как VC, L-VC или посредством его химического названия L-аскорбиновая кислота, может индуцировать оксидативный стресс в определенных злокачественных клетках, таких как злокачественные опухоли с мутантным KRAS. Исследования, описанные в настоящем описании, демонстрируют, что D-энантиомер витамина С (D-VC), отдельно или в комбинации с окислителем, таким как триоксид мышьяка, может индуцировать выраженный оксидативный стресс в злокачественных клетках, таких как злокачественные клетки с мутантным KRAS. В частности, исследования показывают, что оптический изомер витамина С, D-витамин С (также обозначаемый в настоящем описании как D-VC или D-аскорбиновая кислота), является в высокой степени эффективным в отношении индукции оксидативного стресса злокачественных клеток с мутантным KRAS. Для усиления окислительного действия D-VC на клетки с мутантным KRAS D-VC вводили с другим окисляющим соединением, триоксидом мышьяка (ATO). Исследования, описанные в настоящем описании, демонстрируют, что комбинация D-VC/ATO является в высокой степени цитотоксической для злокачественных клеток с мутантным KRAS, происходящих как из человека, так и из мыши. Кроме того, данные, приведенные в настоящем описании, указывают на то, что применение комбинации D-VC/ATO является значительно более эффективным в отношении подавления роста опухоли с мутантным KRAS в модели с ксенотрансплантатом на мышах, чем комбинация витамина С и ATO. Поскольку мутации KRAS являются частыми при раке поджелудочной железы, ободочной и прямой кишки и легкого, и в настоящее время не существует эффективного вмешательства для онкогена KRAS, настоящее изобретение относится к мощной цитотоксической комбинации, которая специфически нацелена на злокачественные клетки с мутантным KRAS. Кроме того, эту комбинацию D-VC и ATO также можно использовать для любого типа злокачественной опухоли, ассоциированной с высокой экспрессией GLUT1.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения злокачественной опухоли триоксидом мышьяка и D-VC.

#### I. Способы лечения.

В одном аспекте в рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения злокачественной опухоли у индивидуума, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества триоксида мышьяка и D-VC.

Опухоли, для которых являются пригодными настоящие способы лечения, включают любой тип злокачественных клеток, такой как злокачественные клетки, встречающиеся в солидной опухоли или гематологической опухоли. В частности, злокачественная опухоль может представлять собой злокачественную опухоль, сверхэкспрессирующую переносчик GLUT1, такую как злокачественная опухоль с мутантным KRAS или злокачественные опухоли, которые демонстрируют высокое поглощение глюкозы.

Злокачественные опухоли, от которых можно лечить с использованием способов, описанных в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого), злокачественную опухоль брюшины, гастральный рак или рак желудка (включая желудочно-кишечный рак и желудочно-кишечный стромальный рак), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак ободочной и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или ренальный рак, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи, и меланому. Иллюстративные злокачественные опухоли, от которых можно лечить с использованием способов по настоящему изобретению, могут сверхэкспрессировать GLUT1, как, например, злокачественные опухоли с мутантным KRAS.

Злокачественная опухоль, в частности, может относиться к следующему гистологическому типу, хотя и не ограничивается ими: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома, недифференцированная; гигантоклеточная и веретенноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходно-клеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастриннома злокачественная; холангиокарцинома; печеночно-клеточная карцинома; комбинированная печеночно-клеточная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденокистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный коли-полипоз; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-

екций (лечение в течение 2 недель). Рубцевание наблюдали в нескольких опухолях, включая все из опухолей после введения D-VC+ATO;

фиг. 8 - ксенотрансплантированные опухоли HCT116 после 15-й (конечной) инъекции после резекции. Представлены вырезанные опухоли после 15 инъекций, описанных на фиг. 6. Рубцевание наблюдали в нескольких опухолях, включая все из опухолей после введения D-VC+ATO;

фиг. 9 - масса опухолей после 15 инъекций. Значения p для одностороннего статистического анализа ANOVA показывают статистически значимое отличие в весе опухоли между группами мышей, представленными на фиг. 8, которым вводили PBS против VC+ATO, PBS против D-VC+ATO, и VC+ATO против D-VC+ATO.

#### Описание иллюстративных вариантов осуществления

Витамин С в его природной форме, также обозначаемый в настоящем описании как VC, L-VC или посредством его химического названия L-аскорбиновая кислота, может индуцировать оксидативный стресс в определенных злокачественных клетках, таких как злокачественные опухоли с мутантным KRAS. Исследования, описанные в настоящем описании, демонстрируют, что D-энантиомер витамина С (D-VC), отдельно или в комбинации с окислителем, таким как триоксид мышьяка, может индуцировать выраженный оксидативный стресс в злокачественных клетках, таких как злокачественные клетки с мутантным KRAS. В частности, исследования показывают, что оптический изомер витамина С, D-витамин С (также обозначаемый в настоящем описании как D-VC или D-аскорбиновая кислота), является в высокой степени эффективным в отношении индукции оксидативного стресса злокачественных клеток с мутантным KRAS. Для усиления окислительного действия D-VC на клетки с мутантным KRAS D-VC вводили с другим окисляющим соединением, триоксидом мышьяка (ATO). Исследования, описанные в настоящем описании, демонстрируют, что комбинация D-VC/ATO является в высокой степени цитотоксической для злокачественных клеток с мутантным KRAS, происходящих как из человека, так и из мыши. Кроме того, данные, приведенные в настоящем описании, указывают на то, что применение комбинации D-VC/ATO является значительно более эффективным в отношении подавления роста опухоли с мутантным KRAS в модели с ксенотрансплантатом на мышах, чем комбинация витамина С и ATO. Поскольку мутации KRAS являются частыми при раке поджелудочной железы, ободочной и прямой кишки и легкого, и в настоящее время не существует эффективного вмешательства для онкогена KRAS, настоящее изобретение относится к мощной цитотоксической комбинации, которая специфически нацелена на злокачественные клетки с мутантным KRAS. Кроме того, эту комбинацию D-VC и ATO также можно использовать для любого типа злокачественной опухоли, ассоциированной с высокой экспрессией GLUT1.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения злокачественной опухоли триоксидом мышьяка и D-VC.

#### I. Способы лечения.

В одном аспекте в рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения злокачественной опухоли у индивидуума, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества триоксида мышьяка и D-VC.

Опухоли, для которых являются пригодными настоящие способы лечения, включают любой тип злокачественных клеток, такой как злокачественные клетки, встречающиеся в солидной опухоли или гематологической опухоли. В частности, злокачественная опухоль может представлять собой злокачественную опухоль, сверхэкспрессирующую переносчик GLUT1, такую как злокачественная опухоль с мутантным KRAS или злокачественные опухоли, которые демонстрируют высокое поглощение глюкозы.

Злокачественные опухоли, от которых можно лечить с использованием способов, описанных в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого), злокачественную опухоль брюшины, гастральный рак или рак желудка (включая желудочно-кишечный рак и желудочно-кишечный стромальный рак), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак ободочной и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или ренальный рак, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи, и меланому. Иллюстративные злокачественные опухоли, от которых можно лечить с использованием способов по настоящему изобретению, могут сверхэкспрессировать GLUT1, как, например, злокачественные опухоли с мутантным KRAS.

Злокачественная опухоль, в частности, может относиться к следующему гистологическому типу, хотя и не ограничивается ими: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома, недифференцированная; гигантоклеточная и веретенноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходно-клеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастроинтестинальная злокачественная; холангиокарцинома; печеночно-клеточная карцинома; комбинированная печеночно-клеточная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденокистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный коли-полипоз; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-

альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; зернистоклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; эндометриодная карцинома; карцинома из придатков кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; перувинозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидно-клеточная карцинома; инфильтрирующая протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, молочной железы; ацидозно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома со сквамозной метаплазией; тимома, злокачественная; стромальная опухоль яичника, злокачественная; текома, злокачественная; гранулезоклеточная опухоль, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественная; опухоль из жировых клеток, злокачественная; параганглиома, злокачественная; экстрамаммарная параганглиома, злокачественная; феохромоцитом; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностная распространяющаяся меланома; меланома типа злокачественного лентиго; акральные лентигозные меланомы; узелковые меланомы; злокачественная меланома в гигантском пигментированном невусе; эпителиоидно-клеточная меланома; синий невус, злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитомы, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная опухоль; мюллерова смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы, злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; филоидная опухоль, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома, злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; струма яичника, злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитомы, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; одонтогенная опухоль, злокачественная; амелобластическая одонтосаркома; амелобластома, злокачественная; амелобластическая фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимомы; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендрогиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; мозжечковая саркома; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; ольфакторная нейрогенная опухоль; менингиома, злокачественная; нейрофибросаркома; неврилеммома, злокачественная; зернисто-клеточная опухоль, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; лимфома Ходжкина; парагранулема; злокачественная лимфома, мелколимфоцитарная; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; фунгоидный микоз; другие уточненные неходжскинские лимфомы; В-клеточная лимфома; низкозлокачественная/фолликулярная неходжскинская лимфома (NHL); мелколимфоцитарная (SL) NHL; промежуточно-злокачественная/фолликулярная NHL; промежуточно-злокачественная диффузная NHL; высокозлокачественная иммунобластная NHL; высокозлокачественная лимфобластная NHL; высокозлокачественная мелкоклеточная NHL с не расщепленными клетками; NHL с массивным поражением; лимфома из клеток мантийной зоны; СПИД-ассоциированная лимфома; макроглобулинемия Вальденстрема; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; саркома из тучных клеток; иммунопролиферативное заболевание тонкого кишечника; лейкоз; лимфоидный лейкоз; плазматочный лейкоз; эритролейкоз; лейкоз из клеток лимфосаркомы; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз из тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; волосатоклеточный лейкоз; хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); острый миелоидный лейкоз (AML) и хронический миелобластный лейкоз.

В определенных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество АТО и D-VC вводят индивидууму внутривенно, внутрь опухоли или внутрибрюшинно. Соответствующая дозировка АТО и D-VC может быть определена на основе типа злокачественной опухоли, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, клинического состояния индивидуума и мнения лечащего врача.

А. Комбинированные способы терапии.

В определенных вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, кроме того, включают стадию введения индивидууму по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. Все дополнительные терапевтические средства, описанные в настоящем описании, вводят индивидууму в соответствии с надлежащей клинической практикой для каждой конкретной композиции или терапии, учитывая какую-либо потенциальную токсичность, вероятные побочные эффекты и любые другие значимые факторы.

В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия может представлять собой иммунотерапию, лучевую терапию, хирургическую операцию (например, хирургическая резекция опухоли), химиотерапию, трансплантацию костного мозга или комбинацию вышеуказанных. Дополнительная

терапия может представлять собой направленную терапию. В определенных вариантах осуществления дополнительную терапию проводят до основного лечения (т.е. в качестве адъювантной терапии). В определенных вариантах осуществления дополнительную терапию проводят после основного лечения (т.е. в качестве неадъювантной терапии).

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство включает лечение посредством лучевой терапии. В определенных вариантах осуществления лучевая терапия выбрана из группы, состоящей из гамма-лучей ( $\gamma$ -лучи), рентгеновских лучей, микроволн, облучения протонным пучком, ультрафиолетового излучения и направленной доставки радионуклидов в опухоль. В определенных вариантах осуществления лучевая терапия включает лечение рентгеновскими лучами. В определенных вариантах осуществления рентгеновские лучи применяют в суточных дозах от 50 до 200 рентген на протяжении периода от трех до четырех недель. В определенных вариантах осуществления рентгеновские лучи применяют в однократной дозе от 2000 до 6000 рентген. В определенных вариантах осуществления лучевая терапия включает направленную доставку радионуклидов в опухоль. Диапазоны дозировок для радионуклидов широко варьируются в зависимости от времени полужизни изотопа, силы и типа испускаемой радиации, и степени поглощения опухолевыми клетками, однако специалист в данной области способен определить соответствующую терапевтически эффективную дозу.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство включает введение средств для лечения побочных эффектов, ассоциированных с основным лечением (например, тошнота, кахексия и т.п.). В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия включает иммунотерапию. В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия включает лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия включает гамма-излучение. В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия включает хирургическую операцию. В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия включает комбинацию лучевой терапии и хирургической операции. В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия включает лечение классом химиотерапевтических средств, выбранным из группы, состоящей из алкилирующих средств, антрациклинов, разрушающих цитоскелет средств, эпитопионов, ингибиторов деацетилазы гистонов, ингибиторов топоизомеразы I, ингибиторов топоизомеразы II, ингибиторов киназ, нуклеотидных аналогов и аналогов нуклеотидных предшественников, пептидных антибиотиков, соединений на основе платины, ретиноидов, алкалоидов барвинка и их производных.

Дополнительные способы терапии, предусматриваемые в рамках настоящего изобретения, можно проводить до, после или одновременно с введением композиций, описанных в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления дополнительную терапию проводят до введения композиций, описанных в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления дополнительную терапию проводят после введения композиций, описанных в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления дополнительную терапию проводят с одним или несколькими интервалами до или после введения композиций, описанных в настоящем описании. Определение соответствующего интервала для проведения дополнительной терапии, так чтобы для индивидуума, подвергаемого лечению, была полезной комбинированная терапия, входит в пределы уровня среднего специалиста в данной области.

В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой терапию ингибитором иммунной точки контроля. Ингибитор иммунной точки контроля ингибирует белок иммунной точки контроля, выбранный из группы, состоящей из белка каскада запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1/CD279) и его лигандов (PD-L1/CD274 и PD-L2/CD273), ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA-4/CD152), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3/CD223), В- и Т-лимфоцитарного аттенуатора (BTLA), доменов (TIGIT) Т-клеточного иммунорецептора с Ig и иммунорецепторного ингибиторного мотива на основе тирозина (ITIM), белка 3 с доменом Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3/HAVcr2), иммуноглобулин-подобного рецептора киллерных клеток (KIR/CD158), супрессора активации Т-клеток с V-доменом иммуноглобулина (VISTA), и рецептора аденозина A2a (A2aR).

Ингибиторы иммунной точки контроля могут представлять собой лекарственные средства, такие как низкомолекулярные средства, рекомбинантные формы лигандов или рецепторов, или, в частности, представляют собой антитела, такие как антитела человека. Можно использовать известные ингибиторы белков иммунной точки контроля или их аналогов, в частности, химеризованные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как будет известно специалисту в данной области, для определенных антител, упоминаемых в настоящем описании, могут использоваться альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные названия являются взаимозаменяемыми в контексте настоящего изобретения. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями МК-3475 и пембролизумаб.

В определенных вариантах осуществления ингибитор иммунной точки контроля представляет собой связывающий PD-1 антагонист. В определенных вариантах осуществления связывающий PD-1 антагонист представляет собой антитело против PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В определенных вариантах осуществления связывающий PD-1 антагонист представляет собой иммуноадгезин (например,

иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или связывающую PD-1 часть PDL1 или PDL2, слитую с константной областью иммуноглобулина (например, Fc-область последовательности иммуноглобулина)).

В определенных вариантах осуществления ингибитор иммунной точки контроля представляет собой связывающий CTLA-4 антагонист. В определенных вариантах осуществления связывающий CTLA-4 антагонист представляет собой антитело против CTLA-4. В определенных вариантах осуществления антитело против CTLA-4 выбрано из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелимумаба.

#### В. Фармацевтические композиции.

В другом аспекте в рамках настоящего изобретения предусматриваются фармацевтические композиции и составы, содержащие триоксид мышьяка (ATO), D-VC и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции и составы, как описано в настоящем описании, можно получать путем смешения активных ингредиентов (ATO и D-VC), имеющих желаемую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 22<sup>nd</sup> edition, 2012), в форме водных растворов, таких как нормальный солевой раствор (например, 0,9%) и сывороточный альбумин человека (например, 10%). Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексамететония; хлорид бензалкония; хлорид бензонтия; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы цинк-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

#### II. Наборы и диагностические средства.

В различных аспектах изобретения предусматривается набор, содержащий диагностические средства, терапевтические средства и/или другие терапевтические средства или средства доставки. В некоторых вариантах осуществления предусматривается набор для получения и/или введения терапевтического средства согласно вариантам осуществления. Набор может содержать реагенты, которые могут быть использованы для введения активного или эффективного средства (средств). Например, реагенты набора могут включать по меньшей мере один фармацевтический состав D-VC и по меньшей мере один фармацевтический состав ATO, а также реагенты для получения, составления и/или введения компонентов согласно вариантам осуществления. В следующих аспектах набор может содержать диагностические реагенты, такие как реагенты для определения экспрессии GLUT1 и/или статуса KRAS в образце.

В некоторых вариантах осуществления набор также может содержать подходящий контейнер, который представляет собой контейнер, который не реагирует с компонентами набора, такой как пробирка Eppendorf, шприц, бутылка или губа. Контейнер может быть изготовлен из поддающихся стерилизации материалов, таких как пластмасса или стекло.

Кроме того, набор может включать инструкции, в которых описаны процедурные стадии способов, и они соответствуют по существу тем же процедурам, которые описаны в настоящем описании или известны специалисту в данной области.

#### III. Примеры.

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области должно быть понятно, что способы, описанные в примерах, которые описаны ниже, представляют собой способы, разработанные автором изобретения для надежного функционирования при применении настоящего изобретения на практике и, таким образом, могут считаться составляющими предпочтительные способы его применения на практике. Однако специалисты в данной области должны, ввиду настоящего изобретения, понять, что многие изменения могут быть внесены в конкретные варианты осуществления, которые описаны, и все еще может быть получен такой же или сходный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1. Испытание *in vitro* обработки посредством D-VC злокачественных клеток с мутантным KRAS.

Клетки рака ободочной и прямой кишки HCT116 обрабатывали в течение 72 ч PBS, 1 мМ раствором витамина С (VC), 1 мМ D-витамином CVC (D-VC, также указываемый как D-аскорбиновая кислота), 5 мкМ триоксидом мышьяка (ATO), витамином С и ATO (VC/ATO), или D-VC и ATO (D-VC/ATO) (фиг. 1). Как и ожидалось, ATO оказывал мягкое цитотоксическое действие по сравнению с буфером отдельно, в то время как обработка витамином С и ATO индуцировала значительно более сильную цитотоксичность, чем обработка буфером или витамином С отдельно (фиг. 1). Интересно, что обработка D-VC и ATO вызывала в равной степени устойчивую цитотоксичность (фиг. 1). Сходный синергический цито-

токсический эффект VC/АТО и D- VC/АТО также наблюдался в других злокачественных клетках с мутантным KRAS, включая HPAC и злокачественные клетки MiaPaCA2 (поджелудочная железа) и A549 (легкое). Однако ни одна из комбинаций не индуцировала цитотоксичность в PC3 (клетки рака предстательной железы PTEN-нуль) или первичных фибробластах легких, что указывает на то, что индукция цитотоксичности может быть ограничена злокачественными клетками с мутантным KRAS.

Для подтверждения этих результатов проводили измерение апоптоза в проточно-цитометрическом анализе, определяющем аннексин V, конъюгированный с FITC, для измерения апоптоза (фиг. 2). Обработка витамином С или его D-энантиомером продемонстрировала уровень апоптоза, сходный с контролем в виде буфера (фиг. 2 и 3, сравнивающие VC и D-VC против PBS). Как и ожидалось, обработка 5 мкМ АТО индуцировала низкое повышение апоптоза относительно контроля в виде буфера, однако обработка витамином С или аналогом D-витамином С вместе АТО индуцировала значительно больший апоптоз, чем АТО отдельно (фиг. 2 и 3).

Ожидалось, что причиной цитотоксического стресса и апоптоза было накопление активных форм кислорода (ROS), так что клетки HCT116 обрабатывали, как описано выше, и анализировали в отношении присутствия ROS посредством проточной цитометрии (фиг. 4). Аналогично анализу цитотоксичности и апоптоза, обработка витамином С или его D-энантиомером не индуцировала увеличение образования ROS выше исходного уровня, и было обнаружено, что приблизительно 5% клеток были накапливающими ROS (фиг. 4 и 5). Обработка 5 мкМ АТО увеличивала количество клеток, демонстрирующих накопление ROS, до 26% (фиг. 4 и 5). Обработка витамином С или D-витамином С в дополнение к АТО увеличивала образование ROS, так что было обнаружено, что приблизительно 95% клеток накапливали ROS (фиг. 4 и 5).

Пример 2. Исследование на ксенотрансплантатах *in vivo* лечения посредством D-VC злокачественной опухоли с мутантным KRAS.

Было показано, что VC действует посредством конкуренции с глюкозой. Во избежание колебаний уровней глюкозы в крови, пищу забирали у мышей за 2 ч перед инъекциями лекарственных средств и пищу возвращали мышам через 2 ч после инъекции VC или D-VC.

Первоначально, VC или D-VC (2 г/кг) инъекцировали с АТО (8 мг/кг) одновременно. Инъекции в течение 2 недель не были токсичными для мышей: масса тела не уменьшалась. Размер опухоли не демонстрировал поддающегося измерению изменения при определении с использованием толщиномера.

Для оптимизации инъекций лекарственных средств применяли перерыв 2 ч (временной интервал) между инъекциями АТО и VC или D-VC. После второй инъекции все мыши (группа из 5 мышей) в группе инъекций АТО+VC погибли, и только 2 мыши погибли в группе 5, в которой проводили инъекции АТО+D-витамина С. Это показало, что использование 2-ч перерыва между инъекциями вызывало значительное токсическое воздействие, что указывает на то, что комбинация лекарственных средств действовала более эффективно путем обеспечения оксидативного стресса в тканях мышей. Также это указывает на то, что D-VC является менее токсичным, чем VC, в комбинации с АТО. Концентрации лекарственных средств снижали, чтобы избежать токсичности, и их оптимизировали для инъекций мышам (VC или D-витамина С 1,5 г/кг и АТО 7 мг/кг). Оптимизированные концентрации лекарственных средств были эффективными в отношении подавления роста опухоли с мутантным KRAS.

1,5 миллиона клеток злокачественной опухоли человека HCT116 (мутант KRAS) инъекцировали мышам *nude*, 5 мышей на экспериментальную группу. Через 10 суток и после достижения опухоли размера по меньшей мере 0,8 см мышам проводили инъекцию каждые сутки PBS, PBS+1,5 г/кг витамина С, PBS+7 мг/кг АТО, PBS+7 мг/кг АТО+1,5 г/кг витамина С, PBS+1,5 г/кг D-витамина С, или PBS+7 мг/кг АТО+1,5 г/кг D-витамина С. Мышам проводили инъекцию каждые сутки, 6 раз в неделю, и их оставляли в покое на один день в неделю, с всего 15 инъекциями лекарственных средств. За двое суток до первых инъекций в этих концентрациях проводили инъекцию более низких доз лекарственных средств. Первоначально АТО инъекцировали в дозе 3 мг/кг, в то время как витамин С или D-VC инъекцировали в дозе 1 г/кг. На следующие сутки АТО использовали в дозе 7 мг/кг, в то время как витамин С и D-VC использовали в дозе 1 г/кг.

После 9 инъекций ксенотрансплантаты опухолей фотографировали (фиг. 6). Было выявлено рубцевание опухолей D-VC (2/5 мышей) и АТО+D-VC (5/5 мышей) у мышей, которым проводили лечение в течение первой недели инъекций (фиг. 6). После 12 инъекций опухоли вновь визуализировали (фиг. 7). Рубцевание присутствовало в 2/5 опухолей с введением АТО, 2/5 мышей с введением D-VC, 1/5 мышей с введением АТО и витамина С и всех мышей с введением АТО плюс D-VC (фиг. 7).

Затем опухоли извлекали из мышей после 15-й инъекции. Рубцевание, наблюдаемое в результате введения АТО плюс D-VC, приводило к тому, что эти опухоли имели "плоский" внешний вид (фиг. 8). Первоначальные рубцы наблюдали после 6 инъекций. Рубцы, наблюдаемые в других группах введения, как правило, появлялись значительно позднее и были менее частыми, чем в случае введения АТО плюс D-VC. Затем проводили взвешивание опухолей из каждой группы введения (фиг. 9). Средняя масса опухолей при введении АТО, витамина С и D-VC была более низкой по сравнению с опухолями при введении PBS, однако эти отличия не были статистически значимыми (фиг. 9). Как опухоли при введении АТО плюс витамин С, так и опухоли при введении АТО плюс D-VC имели значительно меньший вес,

чем опухоли при введении PBS, и опухоли при введении D-VC плюс АТО имели значительно меньший вес, чем опухоли при введении витамина С плюс АТО (фиг. 9).

По сравнению с инъекциями PBS (контроль), все компоненты по отдельности (АТО, витамин С или D-VC) демонстрируют ингибиторный эффект на рост опухоли, и введение D-VC оказалось более эффективным отдельно, однако его эффект не был устойчивым (2 мыши из группы, включавшей 5). Было обнаружено, что комбинированное лечение является более эффективным, чем инъекция данных лекарственных средств по отдельности, на что указывает уменьшение массы опухоли. Важно, что комбинация D-VC плюс АТО была значительно более эффективной, чем комбинация витамина С плюс АТО. Интересно, что также наблюдалось, что введение комбинации D-VC плюс АТО приводило к рубцеванию или ожогу опухолей в ходе 6 инъекций. Опухоли у этих мышей стали плоскими после 15 инъекций вследствие эффекта рубцевания. Опухоли с рубцами наблюдались у всех 5 мышей, которым проводили инъекцию комбинации АТО и D-VC, в то время как эффект рубцевания, индуцированный введением комбинации АТО плюс витамин С, наблюдался только после 15 инъекций и присутствовал только в 3 из 5 образцов.

Первоначальные инъекции комбинаций лекарственных средств продемонстрировали только незначительный эффект на рост опухоли, таким образом, дозу увеличивали, как показано выше. Во-вторых, эффект усиливался при применении 2-часового перерыва (временного интервала) между инъекциями АТО и D-VC. Схема инъекций представляла собой: инъекция АТО/2-часовой перерыв/инъекция витамина С или D-VC. Вероятно, витамин С или D-VC инактивируют окисляющее соединение АТО *in vivo*, поскольку как витамин С, так и D-VC являются известными антиоксидантами. Однако эта инактивация наблюдалась только в ксенотрансплантатах опухолей, но не в условиях культивирования клеток. Кроме того, также известно, что эффект введения витамина С на злокачественные клетки с мутантным KRAS зависит от глюкозы. Во избежание колебаний уровня глюкозы в крови и повышения эффекта витамина С и D-VC, инъекции лекарственных средств проводили после изъятия корма у мышей за 2 ч до инъекций АТО, и корм вновь предоставляли только через 2 ч после инъекций витамина С или D-VC.

Таким образом, было обнаружено, что D-конфигурация VC (D-витамин С или D-VC) является эффективной для индукции оксидативного стресса в злокачественных клетках с мутантным KRAS. Для усиления окислительного действия D-VC на клетки с мутантным KRAS, D-VC вводили в комбинации с другим окислителем, триоксидом мышьяка (АТО). Было определено, что комбинация D-VC/АТО является в высокой степени цитотоксической для злокачественных клеток с мутантным KRAS, происходящих из человека или мыши. Это исследование также указывает на то, что использование комбинации D-VC/АТО является более эффективным в отношении подавления роста опухоли с мутантным KRAS в модели с ксенотрансплантатом мыши, чем комбинация L-формы витамина С (VC) и АТО. Таким образом, комбинацию D-VC и АТО можно использовать для лечения злокачественных опухолей с мутантным KRAS. Мутации KRAS являются частыми при раке поджелудочной железы, ободочной и прямой кишки и легкого, и отсутствует эффективное вмешательство онкогена KRAS. Изобретение, описанное в настоящем описании, обеспечивает мощную цитотоксическую комбинацию для лечения мутантных злокачественных клеток и, в частности, злокачественных клеток с мутантным KRAS. Подход с комбинированием D-VC и АТО можно также применять к любому типу злокачественной опухоли, ассоциированному с высокой экспрессией GLUT1 или к злокачественным опухолям с высоким поглощением глюкозы.

Все способы, описанные и заявленные в настоящем описании, можно осуществлять и проводить без излишнего экспериментирования ввиду настоящего изобретения. В то время как композиции и способы по настоящему изобретению описаны посредством предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что можно использовать варьирование способов и стадий или последовательности стадий способа, описанного в настоящем описании, без отклонения от идеи, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет понятно, что определенными агентами, которые являются как химически, так и физиологически родственными, можно заменять агенты, описанные в настоящем описании, при достижении тех же или сходных результатов. Все такие сходные замены и модификации, понятные специалистам в данной области, считаются входящими в пределы сущности, объема и идеи изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

#### Ссылки

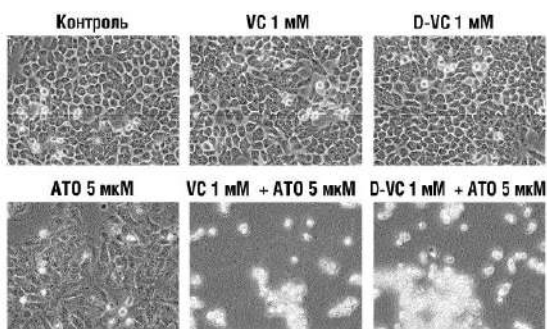
Следующие ссылки до той степени, в которой они обеспечивают иллюстративные методические или другие детали, дополнительные для тех, которые описаны в настоящем описании, специально включены в настоящее описание в качестве ссылок.

- Dinnen et al., *Mol Cancer Ther.*, 12(12):2792-2803, 2013.
- Grad et al., *Blood*, 96(3):805-813, 2001.
- Yedjou et al., *Arch Drug Info.*, 2:59-65, 2009.
- Yun et al., *Science*, 350(6266): 1391-1396, 2015.

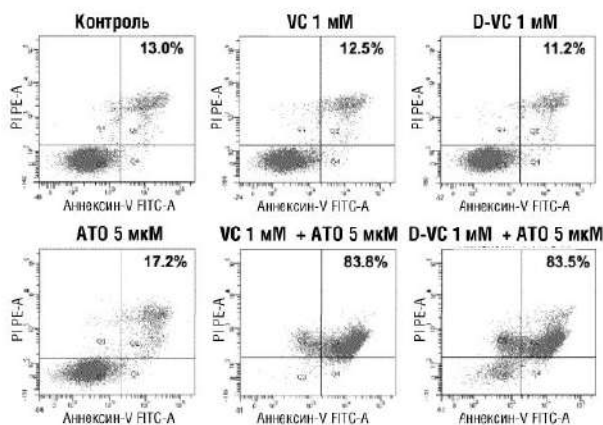


## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы триоксида мышьяка (ATO) и D-витамина С (D-VC) или его фармацевтически приемлемых солей, где злокачественная опухоль содержит мутацию KRAS.
2. Способ по п.1, где злокачественная опухоль демонстрирует повышенную экспрессию GLUT1 или высокое поглощение глюкозы.
3. Способ по п.1, где ATO и D-VC вводят в отдельных композициях.
4. Способ по п.1, где ATO и D-VC составлены в одной композиции.
5. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, рак ободочной и прямой кишки, рак поджелудочной железы или рак легкого.
6. Способ по п.5, где лейкоз представляет собой острый промиелоцитарный лейкоз (APL).
7. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки или множественную миелому.
8. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой рак ободочной и прямой кишки.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая триоксид мышьяка (ATO) и D-витамин С (D-VC) или его фармацевтически приемлемые соли, составленная в фармацевтически приемлемом эксципиенте.
10. Способ идентификации индивидуума для лечения посредством триоксида мышьяка (ATO) и D-витамина С (D-VC), включающий тестирование образца от индивидуума для определения того, имеет ли индивидуум злокачественную опухоль, которая имеет мутацию KRAS, где, если злокачественная опухоль имеет мутацию KRAS, тогда индивидуум является кандидатом для лечения посредством ATO и D-VC.
11. Способ по п.10, дополнительно включающий проведение терапии посредством ATO и D-VC у идентифицированного индивидуума.



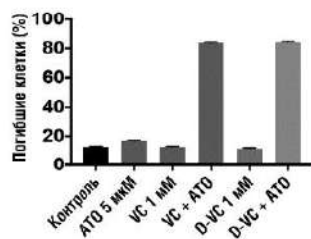
Фиг. 1



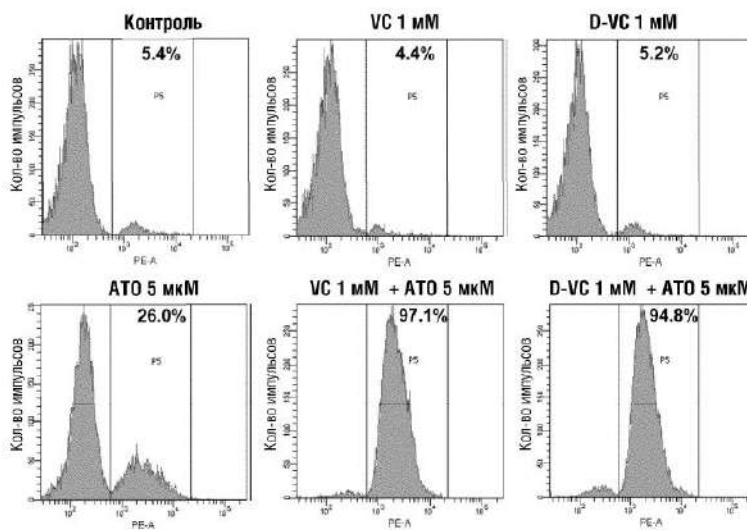
Фиг. 2

044080

### НСТ116

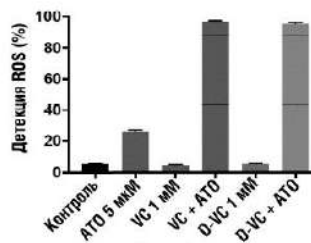


Фиг. 3

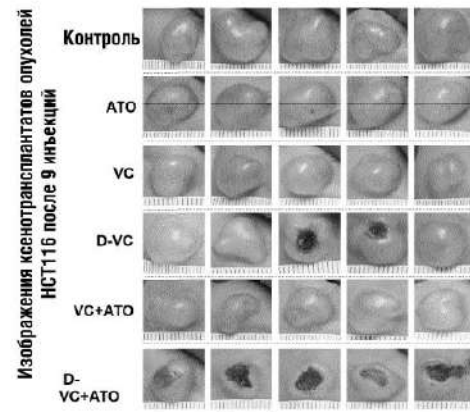


Фиг. 4

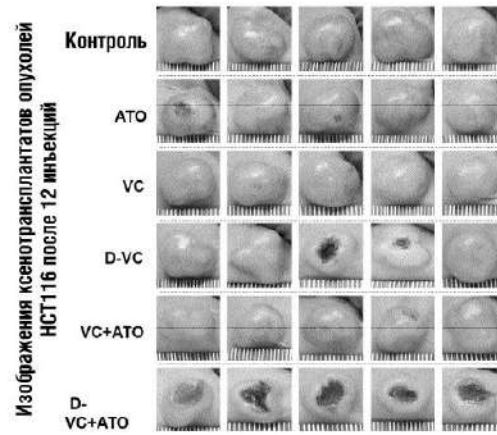
### НСТ116



Фиг. 5

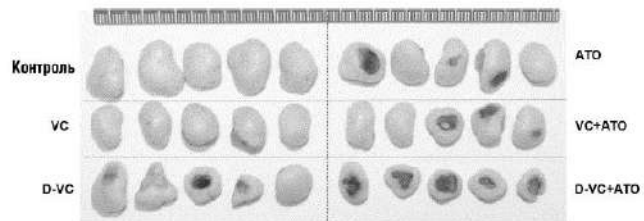


Фиг. 6



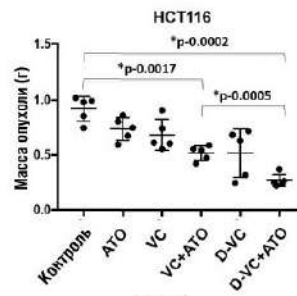
Фиг. 7

Изображения извлеченных ксенотрансплантированных опухолей НСТ116 после 15-й инъекции лекарственного средства



Фиг. 8

044080



Евразийская патентная организация, ЕАПВ  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2