

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. ПЕТРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ОСИПОВ

Михаил Анатольевич

**КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
МЕЛАТОНИНА И МЕТФОРМИНА
В КОМБИНАЦИИ С СИСТЕМНОЙ ТЕРАПИЕЙ БОЛЬНЫХ
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Семиглазова Татьяна Юрьевна

доктор медицинских наук, доцент

Анисимов Владимир Николаевич

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Санкт-Петербург – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Общая характеристика мелатонина	11
1.2 Влияние мелатонина на опухолевый рост <i>in vitro/in vivo</i>	12
1.2.1 Влияние мелатонина на клетки рака молочной железы <i>in vitro</i>	12
1.2.2 Воздействие мелатонина на химически индуцированный канцерогенез молочных желез	14
1.2.3 Влияние мелатонина на рост перевиваемых опухолей молочной железы у животных.....	15
1.2.4 Воздействие мелатонина на ксенографты рака молочной железы (РМЖ)	17
1.3 Мелатонин в клинической онкологии	18
1.3.1 Уровни мелатонина у больных злокачественными опухолями.....	18
1.3.2 Монотерапия мелатонином больных РМЖ	19
1.3.3 Мелатонин совместно с гормонотерапией и химиотерапией в лечении больных РМЖ.....	20
1.3.4 Мелатонин совместно с иммунотерапией в лечении больных РМЖ	21
1.4 Общая характеристика метформина	22
1.5 Влияние метформина на опухолевый рост <i>in vitro/in vivo</i>	23
1.5.1 Влияние метформина на рост клеток рака молочной железы <i>in vitro</i>	23
1.5.2 Воздействие метформина на химически индуцированные опухоли молочной железы.....	24
1.5.3 Влияние метформина на рост ксенографтов рака молочной железы.....	25
1.6 Метформин и лечение РМЖ.....	27

Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	32
2.1 Экспериментальная часть	32
2.1.1 Животные.....	33
2.1.2 Препараты.....	33
2.1.3 Разведение препаратов	34
2.1.4 Опухоль и методика трансплантации	36
2.1.5 Методы оценки противоопухолевой активности препаратов.....	36
2.1.6 Опыт 1. Влияние доксорубицина в сочетании с различными способами введения мелатонина на рост перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у самок – мышей SHR	38
2.1.7 Опыт 2. Влияние паклитаксела в сочетании с мелатонином и метформинном на рост перевиваемой опухоли молочной железы HER2 у самок линии FBV/N	39
2.1.8 Опыт 3. Изучение действия торемифена и метформина у трансгенных мышей FBV/N с HER2-положительным РМЖ	40
2.1.9 Опыт 4. Влияние метформина на острую токсичность доксорубицина и паклитаксела у мышей – самцов линии SHR.....	41
2.2 Статистическая обработка результатов опытов	41
2.3 Клиническая часть	42
2.3.1 Характеристика групп наблюдения	44
2.3.2 Методы обследования пациентов	47
2.3.3 Оценка качества жизни	50
2.3.4 Статистические методы оценки результатов исследования	50
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	54
3.1 Экспериментальное обоснование применения мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией РМЖ	54
3.1.1 Опыт 1. Влияние доксорубицина в сочетании с различными способами введения мелатонина на рост перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у самок мышей SHR	54

3.1.2 Опыт 2. Влияние паклитаксела в сочетании с мелатонином и метформином на рост перевиваемой опухоли молочной железы HER2 у самок линии FBV/N	58
3.1.3 Опыт 3. Изучение действия торемифена и метформина у трансгенных мышей FBV/N с HER2-положительным РМЖ	62
3.1.4 Опыт 4. Влияние метформина на острую токсичность доксорубицина и паклитаксела у мышей – самцов линии SHR	64
3.2 Клиническое обоснование применения мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией больных РМЖ.....	66
3.2.1 Влияние мелатонина и метформина на эффективность неоадьювантной химиотерапии больных РМЖ.....	66
3.2.2 Влияние мелатонина и метформина на эффективность неоадьювантной гормонотерапии больных РМЖ	69
3.2.3 Влияние мелатонина и метформина на качество жизни больных РМЖ на фоне неоадьювантного лечения.....	72
Глава 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ.....	88
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В 21-м веке по-прежнему отмечается рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) – самой масштабной проблемы современной онкологии [103]. Поиск новых лекарственных препаратов для снижения риска развития и улучшения результатов лечения РМЖ остается одной из ведущих задач современной онкологии. В этой связи представляет интерес изучение мелатонина (МЛТ) и метформина (МТФ) как препаратов с возможной противоопухолевой активностью. Оба вещества обладают выраженными геропротекторными свойствами, что показали результаты экспериментальных исследований на животных [22, 23, 27]. Как МЛТ, так и МТФ, обладают противоопухолевой активностью *in vitro* в отношении различных опухолевых штаммов, в частности клеточных линий РМЖ [22, 76, 80], *in vivo* способны тормозить спонтанный [21] и химически индуцированный канцерогенез РМЖ [63], а также сдерживать опухолевый рост на моделях перевиваемых опухолей и ксенографтах опухолей молочной железы [37, 94]. В связи с вышесказанным целесообразно проведение исследования влияния МЛТ и МТФ на токсичность цитостатиков и вместе с тем оценка их активности в комбинации с цитостатиками и гормонотерапией на моделях перевиваемых опухолей молочной железы. Опубликованные результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о снижении заболеваемости злокачественными опухолями и смертности в целом у пациентов, которые принимали МТФ в связи с сахарным диабетом (СД). В частности, отмечено снижение риска заболеваемости РМЖ на 17-20% у пациенток с СД, получавших МТФ по сравнению с теми, кто не получал препарат [26, 72]. В нескольких работах были отмечены преимущества в общей и безрецидивной выживаемости (ОВ и БРВ) при использовании МТФ после радикального лечения больных РМЖ [52, 60, 87]. Тем не менее, клинические исследования с применением ретроспективного анализа данных уступают в уровне доказательности

проспективным рандомизированным исследованиям, которых к настоящему времени проведено не было. В связи с вышесказанным можно предположить, что к началу 2018 года мы имеем несомненный дефицит данных относительно вопроса о целесообразности применения МФТ как дополнительного компонента в лечении РМЖ. Требуется проведение рандомизированных клинических испытаний, тщательный анализ результатов которых позволит судить о клинической эффективности препарата при совместном его применении со стандартной терапией РМЖ как у пациенток с СД, так и без. МЛТ, напротив, уже исследовался как комбинаторный агент в лечении солидных опухолей, однако, за последние 10 лет не было опубликовано ни одной работы по этой теме. Все исследования были выполнены в конце 20-го века и данные этих работ были включены в два метаанализа [77, 127]. Результаты метаанализов показали, что лечение солидных опухолей стандартными методами с добавлением высоких доз МЛТ ассоциировалось со значимым повышением частоты объективных ответов, а также со снижением частоты нежелательных явлений. Тем не менее, при детальном анализе всех работ, обращает на себя внимание, что характеристики включенных в исследования пациентов были достаточно разнородны: пациенты с разными стадиями и локализациями опухолевого процесса и практически ни в одном исследовании не проводился подгрупповой анализ.

Гормонотерапия местно-распространенного люминального РМЖ наряду с улучшением показателей выживаемости, способна усугублять метаболические обменные процессы в организме больных.

Представляет несомненный интерес, в особенности с учетом механизма действия, дальнейшее изучение в неоадьювантном режиме таких хорошо известных препаратов как мелатонин и метформин, которые, влияя на клинικο-метаболические обменные процессы, возможно будут индуцировать противоопухолевый ответ, по крайней мере, у части больных раком молочной железы.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения больных местно-распространенным раком молочной железы.

Задачи исследования

1. Изучить противоопухолевый эффект сочетанного применения доксорубицина и мелатонина на модели перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у мышей – самок линии SHR.
2. Оценить влияние мелатонина и метформина на противоопухолевую активность паклитаксела и торемифена на модели перевиваемой HER2-положительной опухоли молочной железы у мышей-самок линии FBV/N.
3. В рамках рандомизированного проспективного клинического исследования оценить результаты неоадьювантной антрациклин – и таксансодержащей химиотерапии в сочетании с метформином или мелатонином у больных местно-распространенным раком молочной железы.
4. В рамках рандомизированного проспективного клинического исследования оценить результаты неоадьювантной гормонотерапии торемифеном в сочетании с метформином или мелатонином у больных местно-распространенным раком молочной железы.

Научная новизна работы

1. Впервые был оценен эффект совместного применения мелатонина и/или метформина с доксорубицином, паклитакселом и торемифеном в эксперименте на моделях перевиваемых опухолей молочной железы.
2. В рамках проспективного рандомизированного клинического исследования в зависимости от биологического подтипа впервые было изучено влияние мелатонина и метформина в комбинации с предоперационной лекарственной терапией (гормонотерапией торемифеном при эстроген-рецептор-позитивных

опухолях или антрациклин – и таксансодержащей химиотерапией) на частоту объективных ответов, степень патоморфологического ответа и уровень пролиферативной активности опухоли.

Практическая значимость

1. Полученные в эксперименте данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения комбинаций метформина и мелатонина с системной терапией рака молочной железы в рамках многоцентровых рандомизированных клинических исследований.
2. Добавление метформина к неоадьювантной гормонотерапии торемифеном на протяжении 4-х месяцев снижает пролиферативную активность опухоли – суррогатного маркера улучшения показателей выживаемости больных местно-распространенным люминальным раком молочной железы. Значимая корреляция отмечена между динамикой снижения индекса Ki-67 в опухоли и индексом массы тела больных выше нормы.
3. Добавление мелатонина к неоадьювантной гормонотерапии торемифеном в течении 4-х месяцев повышает частоту объективного ответа у больных местно-распространенным люминальным раком молочной железы.
4. Прием мелатонина во время проведения неоадьювантной антрациклин- и таксансодержащей химиотерапии у больных местно-распространенным раком молочной железы благоприятно воздействует на качество жизни, включая такие показатели как сон, ролевое функционирование и утомляемость.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мелатонин на моделях перевиваемых опухолей молочной железы в эксперименте потенцирует эффект доксорубицина и паклитаксела.

2. Метформин в эксперименте обладает сравнимым с паклитакселом и торемифеном потенциалом противоопухолевой активности, а также способен усиливать противоопухолевый эффект торемифена.
3. Комбинация метформина с неоадьювантной гормонотерапией торемифеном способствует значимому снижению индекса Ki-67 у больных местно-распространенным люминальным раком молочной железы. Отмечается значимая корреляция между динамикой снижения Ki-67 в опухоли и индексом массы тела больных выше нормы.
4. Комбинация мелатонина с неоадьювантной гормонотерапией торемифеном способствует увеличению частоты объективных клинических ответов у больных местно-распространенным люминальным раком молочной железы.
5. Прием мелатонина во время проведения неоадьювантной антрациклин – и таксансодержащей химиотерапии у больных местно-распространенным раком молочной железы благоприятно воздействует на качество жизни, включая такие показатели как сон, ролевое функционирование и утомляемость.

Апробация диссертации

Апробация диссертации состоялась на объединенной научно-практической конференции ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с кафедрами онкологии ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западного государственного медицинского университета имени академика И.И. Мечникова» Минздрава России и ФГБОУ ВО «Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова» Минздрава России. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2015, 2016); «Конкурсе молодых ученых» (Санкт-Петербург, 2015, 2018); Научном обществе онкологов Санкт-Петербурга (Санкт-Петербург, 2017); III и IV Петербургском онкологическом форуме с международным участием «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017, 2018).

Внедрение результатов работы в практику

Результаты исследования отражены в научных статьях, внедрены и используются в практической и научно-исследовательской работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ГБУЗ Ленинградском областном онкологическом диспансере.

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 8 печатных работ, включая 5 работ в журналах, рецензируемых ВАК.

Личный вклад автора

Соискатель принимал непосредственное участие на всех этапах проведения экспериментальной и клинической части работы.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа содержит 29 таблиц, 16 рисунков. Библиографический указатель включает 18 отечественных и 112 зарубежных источников.

Глава 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика мелатонина

Мелатонин – это индольное соединение, секретлируемое в основном шишковидной железой из аминокислоты триптофана в течение темного времени суток, был открыт А. Лернером в 1958 году [58]. Синтез мелатонина (МЛТ) в организме человека происходит из незаменимой аминокислоты триптофана, поступающей в организм с пищей. В эпифизе эта аминокислота превращается в серотонин, с участием ферментов триптофангидроксилазы и 5-окситриптофандекарбоксилазы, далее с помощью ферментов N-ацетилтрансферазы и оксииндол-О-метилтрансферазы из серотонина образуется МЛТ, который выделяется в кровь и ликвор [19]. С возрастом ночные пиковые концентрации мелатонина в плазме снижаются и к 70-ти годам их уровень приближается к дневным [59]. Основная функция МЛТ это регулированием цикла сон – бодрствование [1]. Помимо этого, МЛТ является сильным антиоксидантом – индольная часть его молекулы взаимодействует со свободными радикалами и нейтрализует их, активируя фермент глутатионпероксидазу [75, 112], обладает геропротекторными свойствами [21] и проявляет иммуномодуляторный эффект [47, 48, 78]. Рецепторы к МЛТ обнаружены в сетчатке, головном мозге, супрахиазматических ядрах гипоталамуса, яичниках, мозговых и периферических артериях, почках, поджелудочной железе, иммунных клетках и адипоцитах. Существует 2 типа мембранных рецепторов – MT1 и MT2, реализующие передачу сигнала через G белки и ядерные рецепторы – RZR α , ROR α . Описаны такие эффекты, возникающие посредством взаимодействия с лигандом, как вазоконстрикция в мозговых артериях и вазодилатация в каудальных артериях у крыс, ингибирование секреции инсулина бета клетками поджелудочной железы, краевого стояния лейкоцитов, секреции тестостерона клетками Лейдига, секреции

пролактина передней долей гипофиза [57], а также снижение выработки кортизола надпочечниками и увеличение продукции IL-2 [67], ингибирование апоптоза, активированного факторов некроза опухоли альфа (TNF α) [42].

Таким образом, МЛТ обладает большим количеством функций в организме. В последние годы наибольший интерес вызывает противоопухолевая активность этого биогенного амина, которая в опытах *in vitro/in vivo*.

1.2 Влияние мелатонина на опухолевый рост *in vitro/in vivo*

1.2.1 Влияние мелатонина на клетки рака молочной железы *in vitro*

Исследования жизнеспособности опухолевых клеток при добавлении МЛТ в среду подтверждают его выраженную противоопухолевую активность *in vitro* в отношении различных опухолевых штаммов РМЖ. МЛТ в физиологических концентрациях тормозит рост позитивных по рецепторам эстрогенов и прогестерона опухолевых клеток молочной железы человека – MCF-7 [25, 39, 50, 55, 83] и способствует снижению способности злокачественных клеток к инвазии и миграции [79]. При добавлении МЛТ к культуре HER2 – позитивных клеток рака молочной железы линии MDA-MB-361 также наблюдается торможение роста [115], а в отношении еще 2-х штаммов HER2 – позитивного РМЖ – SKBR-3 и MCF-7Her2.1 уменьшение инвазивного потенциала [84]. Рост клеточной линии MDA-MB-231 – штамма трижды негативного РМЖ аналогично другим подтипам угнетается МЛТ [37, 79]. Эффект МЛТ реализовывался через МТ1 рецептор, экспрессирующийся на поверхности клеток [73, 74]. Во всех упомянутых исследованиях также определялась экспрессия различных маркеров пролиферации. Так, было отмечено значительное снижение уровня экспрессии ROCK-1 (Rho – ассоциированной киназы) – белка, задействованного в поддержании сократительной способности актомиозина [79]. Еще в одной

работе выявлено снижение экспрессии белка RSK2 в клетках HER 2 положительного рака молочной железы [84]. Добавление МЛТ вызывало индукцию Аraf-1/каспаза зависимого апоптоза и подавление COX-2, p300, и NF-Кб [115]. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние МЛТ на рост клеточных линий различных биологических подтипов РМЖ

Биологический подтип РМЖ	Опухолевая линия	Доза	Эффект*	Авторы
ER/PR (+)	MCF-7;	0,001mM – 1 mM	= ↓ ↓ ↓ ↓	Blask D., 1986 [25] Cos S., 1996, 1998 [39, 55] Hill S., 1998 [50] Leon Blanco M., 2003 [83] Borin T., 2016 [79]
HER2 +	MDA-MB-361 SKBR-3 MCF-7Her2.1	10 ⁻⁹ M	↓ ↓ ↓	Wang J., 2012 [127] Mao L., 2016 [84]
ER/PR/HER2 (-)	MDA-MB-231 BT-20	1 mM 100 µl	↓ ↓	Jardim-Perassi B., 2014 [37]
Примечание – ↓ - подавляет рост; = не влияет.				

Таким образом, МЛТ несомненно оказывает антипролиферативное действие *in vitro* на штаммы ER положительного, HER2 – позитивного и трижды негативного РМЖ.

1.2.2 Воздействие мелатонина

на химически индуцированный канцерогенез молочных желез

В ряде исследований доказан онкостатический эффект МЛТ на химически индуцированный канцерогенез молочной железы у крыс. Так, еще в 1981, выявлено у крыс Sprague-Dawley, что МЛТ в дозе 2,5 мг/кг назначавшийся в один день с диметилбензантраценом (ДМБА) значительно снижал частоту развития аденокарцином молочной железы с 79% до 20% [82]. Позднее было показано на крысах Holtzman с удаленной шишковидной железой, что МЛТ в дозе 100 мкг/день, назначавшийся за 30 дней до и на 90 дней после воздействия ДМБА значительно снижает частоту развития аденокарцином молочной железы и увеличивает латентный период роста опухоли [63]. МЛТ, назначавшийся в дозе 500 мкг/день в комбинации с 13 цис-ретиноевой кислотой увеличивает апоптоз и вызывает регресс опухолей молочной железы, индуцированных нитрозометилмочевинной (ННМ) у крыс Sprague-Dawley [111]. Еще в одном исследовании МЛТ в дозе 10 мг/кг/день назначался самкам крыс Sprague-Dawley за 15 дней до воздействия канцерогена (ДМБА) или в течение 6 месяцев после. Наблюдали снижение частоты возникновения аденокарцином молочной железы по сравнению с контролем среди крыс, получавших МЛТ с превентивной целью до воздействия канцерогена ($p=0,04$) и также у животных, получавших МЛТ с лечебной целью ($p=0,01$) [108]. В более поздней работе также было продемонстрировано влияние МЛТ в дозе 20 мг/л с питьевой водой на ДМБА индуцированный канцерогенез молочной железы у крыс, находившихся на диете с высоким содержанием жиров. Длительность назначения МЛТ составляла 20 дней до воздействия канцерогена и 14 недель после. В группе животных, получавших МЛТ, частота развития опухолей молочной железы была ниже, чем в группе контроля. При иммуногистохимическом исследовании опухолей, развившихся у животных, получавших МЛТ выявлялась повышенная экспрессия маркеров апоптоза (caspase-3, BAX) [85].

Данные о влиянии МЛТ на химически индуцированный канцерогенез молочной железы у крыс представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Действие МЛТ на канцерогенез молочных желез у крыс

Линия животных	Канцероген	Доза	Эффект	Ссылка
Holtzman	ДМБА	100 мкг/день	↓	Kothari L., 1987 [63]
Sprague-Dawley	ДМБА	2,5 мг/кг	↓	Tamarkin L., 1981 [82]
	ДМБА	10 мг/кг	↓	Lenoir V., 2005 [108]
	ДМБА	20 мг/л	↓	Bojkova B., 2017 [85]
Sprague-Dawley	ННМ	500 мкг/день	↓	Melancon K., 2005 [111]
Примечание – ↓ – подавляет канцерогенез.				

1.2.3 Влияние мелатонина

на рост перевиваемых опухолей молочной железы у животных

Первая работа на эту тему была выполнена отечественными учеными, было продемонстрировано противоопухолевое действие МЛТ на рост перевиваемой опухоли молочной железы (РСМ) [18]. У крыс линии Fisher подкожное введение МЛТ в дозе 1 мг приводило к статистически значимому снижению веса опухоли по сравнению с контролем [54]. Помимо изучения непосредственного противоопухолевого действия МЛТ были предприняты попытки определить степень его влияния на рост опухоли при использовании совместно с некоторыми цитостатиками у животных. Было показано, что МЛТ, при использовании совместно с циклофосфамидом и нитрозометилмочевинной не оказывает влияния на степень торможения роста опухоли Эрлиха у самок мышей SHR [4]. В более позднем исследовании изучалось сочетанное применение доцетаксела, гемцитабина, доксорубицина и цисплатина с МЛТ у мышей линии самок FBV с перевиваемой HER2-положительной опухолью молочной железы. Добавление

МЛТ в дозе 10 мг/мл внутрь существенно не влияло на вызываемое цитостатиками торможение опухолевого роста, за исключением сочетания МЛТ с гемцитабином 25 мг/кг, которое приводило к значительному усилению противоопухолевого эффекта, что сопровождалось увеличением продолжительности жизни мышей [5].

Таким образом, МЛТ с одной стороны показал самостоятельную противоопухолевую активность, а в комбинации с цитостатиками потенцировал их эффект лишь в случае гемцитабина. Результаты исследований эффективности цитостатиков совместно с МЛТ представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние МЛТ на рост перевиваемых опухолей РМЖ

Животные вид, линия	Опухолевый штамм	Доза МЛТ	Цитостатик	Эффект	Ссылка
Мыши – самки, ЁЗІÀ	РСМ	50µг/мышь п/к	–	↓	Анисимов В., 1973 [18]
Крысы – самки, Fisher	R3230AC	1 мг п/к	–	↓	Karmali R., 1978 [54]
Мыши – самки, FVB	HER2	10 мг/мл внутри	Гемцитабин Доцетаксел Доксорубицин Цисплатин	↓ = = =	Попович И., 2014 [5]
Мыши – самки, SHR	Эрлих	5 мг/кг п/к 20 мг/л внутри	Циклофосфан ННМ	= =	Мусатов С., 1997 [4]
Примечание – ↓ – подавляет рост; = не влияет.					

1.2.4 Воздействие мелатонина на ксенографты рака молочной железы

В последнее время активность новых противоопухолевых агентов на доклиническом уровне активно изучается не только *in vitro*, но и с использованием ксенографтов опухолей человека. Ксенографты РМЖ человека, как и других опухолей, могут быть успешно перевиты лишь безтимусным мышам. Противоопухолевая активность МЛТ была продемонстрирована в отношении ксенографтов различных биологических подтипов РМЖ. На модели перевитой опухоли молочной железы человека MCF 7 (ER+) у мышей линии SHR было продемонстрировано снижение объема опухоли в группе животных, получавших МЛТ с питьевой водой 0,1 мг/мл в течение 5 недель, начиная со второго дня после перевивки опухоли. Также отмечено снижение уровня теломеразы (один из ферментов опухолевых клеток, ответственный за увеличение количества теломер и как следствие приобретения клеткой способности к неограниченному числу митозов) в клетках опухоли мышей, получавших МЛТ, по сравнению с группой контроля [83]. Было показано, что МЛТ в дозе 40 мг/кг, назначавшийся в течение 21-го дня, не только способен тормозить рост ER/PR/HER2 (-) ксенографта РМЖ (MDA-MB-231) у безтимусных самок мышей, но и блокировать ангиогенез, за счет снижения экспрессии VEGF рецептора, а также снижать пролиферацию опухолевых клеток [37]. Исследовалось воздействие МЛТ на частоту развития метастазов в легких. Мышам перевивался ксенографт трижды негативного РМЖ человека (MDA-MB-231) – в хвостовую вену вводили суспензию клеток опухоли. Через неделю мыши получали МЛТ в дозе 100 мг/кг в сутки в вечернее время на протяжении 2-х и 5-ти недель. Для оценки количества и размеров очагов в легких всем животным была выполнена однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) на 3-й или 6-й неделях эксперимента. Результаты показали снижение количества метастазов в легких у мышей, получавших МЛТ ($p < 0,05$) [79]. Есть данные о влиянии МЛТ на рост и метастазирование ксенографтов HER2 – позитивного РМЖ (MCF7_{Her2.1-RPF}). У мышей, получавших МЛТ в дозе 50 µg/ml

количество метастатических очагов в легких было меньше, чем у группы контроля ($p < 0,05$) [84].

Таким образом, во всех вышеперечисленных экспериментах МЛТ подавлял опухолевый рост ксенографтов РМЖ, в частности, *in vivo* были подтверждены данные о противоопухолевой активности МЛТ *in vitro* в отношении штаммов всех биологических подтипов РМЖ. Результаты исследований суммированы в таблице 4.

Таблица 4 – Воздействие МЛТ на ксенографтов рака молочной железы

Опухолевый штамм	Разовая доза	Способ введения	Эффект	Авторы
MCF-7	0,1 мг/мл	внутри	↓	Leon Blanco M., 2003 [83]
MDA-MB-231	40 мг/кг	в/бр	↓	Jardim-Perassi B., 2014 [37]
	100 мг/кг/сут	внутри	↓	Borin T., 2016 [79]
MCF7 _{Her2.1-RPF}	50 µg/ml	внутри	↓	Mao L., 2016 [84]
Примечание – ↓ – подавляет рост.				

1.3 Мелатонин в клинической онкологии

1.3.1 Уровни мелатонина у больных злокачественными опухолями

С начала 40-х годов 20-го века проводились исследования, в ходе которых было доказано, что у онкологических больных наблюдаются морфологические изменения эпифиза. Это может проявляться как гипертрофией [113], так и атрофией шишковидной железы [118], развитием множества кист [33, 117], кальцификацией эпифиза у пациенток с РМЖ [35, 64]. Изучение уровней МЛТ в крови больных активно изучалось с 80-х годов 20-го века. Выявлено повышение

уровня МЛТ у онкологических больных [110] и, напротив, в другом исследовании был отмечен низкий уровень МЛТ в моче у пациенток с РМЖ [126], а также снижение ночных концентраций в крови при эстроген-рецептор-позитивном РМЖ [32]. При сравнении концентраций МЛТ у пациентов со злокачественными новообразованиями и здоровых добровольцев (n=116) было установлено, что у больных имеет место нормальный или незначительно повышенный уровень МЛТ, с тенденцией к снижению при проведении химиотерапии. Тем не менее, результаты более поздних исследований в этом направлении выявили, что у больных с солидными опухолями концентрация МЛТ в крови ниже, чем у здоровых людей. Выявлено снижение суточных концентраций МЛТ в моче у 37 пациентов с раком желудка и прямой кишки [12]. Обнаружено снижение концентрации МЛТ у пациенток с РМЖ, причем уровень МЛТ был меньше при более продвинутой стадии заболевания [116]. Подтверждено в последующих работах, что уровень МЛТ снижается только у больных с первичным РМЖ, а при возникновении рецидива опухоли уровни МЛТ сохраняются в норме [34]. Также, согласно данным эпидемиологических исследований, «световое загрязнение» (воздействие света ночью) ведет к снижению продукции эндогенного МЛТ и как следствие к нарушению циркадных ритмов. Это может, в свою очередь, приводить к повышению риска онкологических заболеваний [46].

1.3.2 Монотерапия мелатонином больных РМЖ

Были спланированы и проведены клинические исследования МЛТ с целью оценки его возможного противоопухолевого действия у пациентов с метастатическим опухолевым процессом. МЛТ назначался как в монотерапии, так и в комбинации с цитостатиками, гормонотерапией и иммунотерапией. Следует подчеркнуть, что в исследования включались больные различными солидными опухолями, в том числе и РМЖ. Было показано увеличение 1 годичной выживаемости ($p < 0,05$) в группе 50-ти пациентов с метастазами различных

злокачественных опухолей в головной мозг, получавших в дополнение к симптоматическому лечению МЛТ в дозе 20 мг в день, среди них была группа из 10-ти больных РМЖ, в которой, напротив, не было показано преимуществ в выживаемости в группе МЛТ [69]. В работе 2002 года проанализировано 1 440 пациентов с солидными опухолями, включая 118 больных с РМЖ, которые рандомизировались в группу наилучшей поддерживающей терапии с или без МЛТ. Было выявлено увеличение количества стабилизаций в группе пациенток, получавших МЛТ (24%) по сравнению с группой наилучшей поддерживающей терапии (10%). Доза МЛТ была аналогичной [71].

1.3.3 Мелатонин совместно с гормонотерапией и химиотерапией в лечении больных РМЖ

Первое рандомизированное исследование на эту тему проведена в 1995 году. Больные РМЖ (n=14), резистентные к гормонотерапии антиэстрогенами, получали МЛТ в дозе 20 мг на ночь в комбинации с тамоксифеном 20 мг в сутки. У 4-х пациенток был достигнут частичный ответ опухоли длительность 8 месяцев. [97]. В другом рандомизированном исследовании, в котором принимали участие «сильно предлеченные» больные эстроген-рецептор-негативным РМЖ, получавших тамоксифен с МЛТ. По сравнению с контрольной группой было выявлено увеличение общей выживаемости ($p < 0,01$) и частоты объективных ответов ($p < 0,05$) [97]. Еще одно исследование, в которое были включены сведения о 250 пациентов с метастатическими солидными опухолями, включая 77 пациенток с РМЖ с низким ECOG – статусом, которые получали стандартную химиотерапию с МЛТ или без него. Доза МЛТ составляла 20 мг на ночь ежедневно. Больным проводилась монокимиотерапия такими цитостатиками как доксорубицин, митоксантрон и паклитаксел. В группах пациенток, получавших паклитаксел и доксорубицин

совместно с МЛТ, было выявлено увеличение одногодичной выживаемости ($p < 0,05$) и объективного ответа ($p < 0,05$) в группе монокимиотерапии доксорубицином совместно с МЛТ (48%) по сравнению с доксорубицином без МЛТ (32%) [70].

1.3.4 Мелатонин совместно с иммунотерапией в лечении РМЖ

В рандомизированном исследовании, включавшим 80 пациентов с метастатическими опухолями (из них 7 случаев РМЖ), получавших терапию IL-2 п/к в дозе 3 миллиона МЕ +/- МЛТ 40 мг внутрь было выявлено следующее: в группе стандартной терапии у 3-х из 4-х пациенток констатировано прогрессирование заболевания, в то время как в группе с МЛТ был достигнут 1 частичный ответ, 1 стабилизация заболевания и 1 прогрессирование [69].

Проведено 2 метаанализа, в которые были включены все клинические исследования, описанные выше, а также работы по изучению активности МЛТ при других злокачественных опухолях. В первом метаанализе оценены результаты 8-ми различных исследований, в которых суммарно проводилось лечение 761 больному. Лечение стандартными методами с добавлением МЛТ ассоциировалось со значимым повышением частоты объективных ответов (8 исследований) и общей одногодичной выживаемости (5 исследований). Также при применении МЛТ достигнуто значимое снижение побочных эффектов, таких как тромбоцитопения (пять исследований), нейротоксичность (5 исследований) и слабость (5 исследований) [127]. Во втором крупном метаанализе суммированы данные 21-го клинического исследования (3 671 пациент), в которых пациенты были рандомизированы для лечения в группу с МЛТ и контрольную группу, включающую только стандартную терапию. Все исследования были посвящены солидным опухолям. Пациенты получали химиотерапию, иммунотерапию

и поддерживающее лечение с мелатонином или без него. Было показано, что МЛТ значительно влиял на снижение частоты нежелательных явлений на фоне химиотерапии, и также способствовал увеличению частоты объективных ответов, увеличению общую годовичной выживаемости [77].

Таким образом, при детальном анализе всех работ, обращает на себя внимание, ни в одном из исследований не проводился подгрупповой анализ, и главное, группы пациентов, включенных в исследование, были разнородны по стадиями и локализациями опухолевого процесса.

1.4 Общая характеристика метформина

Метформин (МТФ) – диметилбигуанид, используемый в лечении сахарного диабета (СД), поликистоза яичников и неалкогольного ожирения печени. В последнее время отмечается рост числа исследований по изучению противоопухолевого действия МТФ. Интерес к МТФ, как к препарату для возможного использования в профилактике и лечении РМЖ и других солидных опухолей, обусловлен результатами эпидемиологических исследований [53, 86, 88], данными о низком профиле токсичности и отсутствием гипогликемии у пациентов без СД при приеме МТФ [56]. В крупных метаанализах подтверждено влияние МТФ на снижение онкологической заболеваемости и смертности у пациентов с СД, принимающих данный препарат [28, 96].

Наиболее изученным механизмом в противоопухолевой активности МТФ является его способность активировать циклическую аденозин-монофосфатзависимую протеинкиназу (АМФК) [114], одного из главных ферментов регуляторов энергообеспечения и деления клеток, которая в свою очередь ингибирует активность mTOR – центрального регулятора синтеза белка и клеточного роста [2, 3, 93]. МТФ может снижать уровень глюкозы, повышенное потребление глюкозы опухолевыми клетками и уменьшать эффект Варбурга [120]. Это ведет к снижению уровня инсулина, что существенно затрагивает

систему инсулиноподобного фактора роста, который рассматривается в настоящее время как одна из основных мишеней для таргетной терапии [107].

1.5 Влияние метформина на опухолевый рост *in vitro/in vivo*

1.5.1 Влияние метформина на рост клеток рака молочной железы *in vitro*

МТФ способен тормозить рост различных опухолевых клеточных линий. Наибольший интерес представляют работы по изучению противоопухолевого эффекта МТФ на различных линиях РМЖ. Оценивалось воздействие МТФ на клеточных линиях BT474 (ER+ HER 2+), BT-20 (ER- HER 2-), MDA-MB-231, MDA-MB-453 (ER- HER 2-), MCF 7, T47D (ER + HER 2-). Ингибирующий эффект на пролиферацию наблюдался во всех случаях при дозе МТФ 8 mM ($p < 0,01$) и ассоциировался с увеличением активированной АМФК [130]. Напротив, в другом исследовании, МТФ не оказывал тормозящего пролиферацию действия в нормогликемических условиях на клеточных линиях MCF-7 (люминальный А), BT-474 (люминальный В), SK-BR-3 (HER 2+) и MDA-MB-231 (трижды негативный). Следует отметить, что использованы были только низкие дозы МТФ – 2 ммоль, что, видимо, и послужило причиной отсутствия антипролиферативного эффекта [66]. Тем не менее, в других работах подтверждается подавляющий эффект МТФ в отношении MCF 7 и MDA – MB – 231 линий РМЖ [41, 90, 125]. Представляет интерес одна из последних работ, в которой изучался не только противоопухолевый эффект МТФ в монорежиме на клеточные линии РМЖ – MCF 7 – чувствительная к доксорубину и MCF 7/ADR – резистентная к воздействию цитостатика. Выявлена дозозависимая активность МТФ (0,5-4 мг/мл) в отношении обоих штаммов, токсичность препарата в отношении митохондрий и воздействие на микроокружение опухоли [95]. Результаты экспериментов по влиянию МТФ на опухоли молочной железы представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Влияние метформина на опухоли *in vitro*

Опухолевая линия	Доза	Эффект*	Авторы
MCF-7;	8 м/М	↓	Zhuang Y., 2008 [130]
	0,5-4 мг/л	↓	Li Y., 2018 [95]
	2 м/М	=	Sadighi S., 2014 [66]
	3-9 м/М	↓	Fan C., 2015 [90]
	30-130 μМ	↓	Topcul M., 2015 [125]
	5-20 м/М	↓	Hadad S., 2014 [41]
MCF-7/ADR	0,5-4 мг/л	↓	Li Y., 2018 [95]
T-47D	8 м/М	↓	Zhuang Y., 2008 [130]
BT-474	2 м/М	=	Sadighi S., 2014 [66]
SK-BR-3;	2 м/М	=	Sadighi S., 2014 [66]
MDA-MB-231	2 м/М	=	Sadighi S., 2014 [66]
	8 м/М	↓	Zhuang Y., 2008 [130]
	3-9 м/М	↓	Fan C., 2015 [90]
	5-20 м/М	↓	Hadad S., 2014 [41]
BT 20	8 м/М	↓	Zhuang Y., 2008 [130]
MDA – MB -453;	2 м/М	=	Sadighi S., 2014 [66]
	8 м/М	↓	Zhuang Y., 2008 [130]
Примечание – ↓ – подавляет рост; = не влияет.			

1.5.2 Воздействие метформина на химически индуцированные опухоли молочной железы

МТФ в дозах 50 мг/кг и 150 мг/кг на модели, индуцированных нитрозометилмочевинной, опухолей молочной железы у самок крыс Sprague-Dawley не снижал частоту возникновения опухолей [65]. В другом исследовании МТФ (9,3 ммоль/кг) аналогично не оказывал влияние на канцерогенез в молочной железе [40]. В более ранней работе МТФ в дозе 5 мг/кг также не тормозил канцерогенез, индуцируемый ННМ, но в более высокой дозе 50 мг/кг/день оказывал

антиканцерогенное действие [91]. Эти данные были подтверждены также в 2013 году [31]. В исследовании того же автора было показано, что МТФ назначавшийся с пищей в дозе 2 мг/кг (0,2%), способен тормозить канцерогенез, индуцируемый ДМБА у крыс [85].

Таким образом, напрашивается вывод о дозозависимом ингибировании МТФ химически индуцированного канцерогенеза у крыс. Данные суммированы в таблице 6.

Таблица 6 – Воздействие МТФ на химически индуцированный канцерогенез

Линия животных	Канцероген	Доза	Эффект	Ссылка
Sprague-Dawley	ННМ	50-150 мг/кг	=	Thompson M., 2015 [65]
Sprague-Dawley	ННМ	5 мг/кг 50 мг/кг	= ↓	Bojkova B., 2009 [85]
Sprague-Dawley	ННМ	50 мг/кг	↓	Zhu Z., 2013 [31]
Sprague-Dawley	ННМ	9,3 ммоль/кг	=	Zhu Z., 2015 [40]
Sprague-Dawley	ДМБА	2 мг/кг	↓	Bojkova B., 2017 [85]
Примечание – ↓ – подавляет рост; = не влияет.				

1.5.3 Влияние метформина на рост ксенографтов рака молочной железы

Особый интерес представляет способность МТФ влиять на рост ксенографтов. В исследованиях выявлено сильное противоопухолевое действие МТФ на различные типы опухолей, которое проявляется не только в уменьшение объема опухоли, но и в торможении роста. В проведенных экспериментах МТФ мыши получали либо внутрь с питьевой водой и посредством применения желудочного зонда, либо в внутривентральных инъекциях. Во многих из этих опытов было выявлено статистически значимое торможение роста опухолей по сравнению с контрольными группами. Перевивались ксенографты опухолей

молочной железы (MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MMTV-ErbB2). Использовались дозы МТФ от 100 мг/кг до 750 мг/кг в сутки внутрь. Следует отметить, что эффект наблюдался вне зависимости от применяемой дозы. Помимо торможения роста опухолей, в группах мышей получавших МТФ оценивались дополнительные параметры: экспрессия VEGFR [106], Ki 67 [94], апоптотическая активность [29, 106], а также количества фосфорилированного m-TOR, P-AMPK [106].

Активно изучается совместное применение МТФ с различными противоопухолевыми агентами. В работе американских авторов (2011) было исследовано использование МТФ совместно с цитостатиками на опухолевый рост. Мышам переливались различные опухолевые штаммы – молочной железы (BT 474, MDA-MB-231) и предстательной железы (PC3), далее выполнялось 4 внутриопухолевые инъекции карбоплатина 20 мг/кг, паклитаксела 10 мг/кг, доксорубицина 4мг/кг и 1 мг/кг. Инъекции назначались на 10, 15, 20 и 25 дни после перевивки опухоли. Противоопухолевые препараты вводились либо самостоятельно, либо в комбинации с МТФ внутрь с питьевой водой в дозе 200 µg/ml. Выявлено уменьшение объема опухоли при сочетанном использовании всех цитостатиков с метформином [89]. Во втором исследовании этих же авторов на мышях с перевитой опухолью MCF10-ER-Src молочной железы было подтверждено противоопухолевое действие метформина вне зависимости от дозы доксорубицина [89]. При назначении этого бигуанида мышам вместе с таргетной терапией (эверолимус) также наступает статистически значимое усиление противоопухолевого действия данного ингибитора mTOR [30]. В одном из последнего исследования изучалось совместное применение метформина и доксорубицина при воздействии на опухоль молочной железы (MDA-MB-231). МТФ тормозил опухолевый рост в монорежиме, однако, не усилил действие доксорубицина [119]. Необходимо подчеркнуть, что согласно данным большинства опытов добавление МТФ к противоопухолевым препаратам (как к цитостатикам, так и к таргетным) сказывается на выраженном статистически значимом усилении их противоопухолевого эффекта. Также в ряде случаев

применение метформина позволяет снизить дозу цитостатика без ущерба эффективности, соответственно это способствует снижению токсичности. Возможными механизмами могут быть как снижение активности опухолевых ферментов, увеличение количества АМФК, ингибирование пути mTOR, сокращение экспрессии ростовых факторов и сосудисто-эндотелиального фактора роста, так и усиление клеточной гибели, путем активации ключевых ферментов апоптоза. Данные всех опытов обобщены в таблице 7.

Таблица 7 – Влияние МТФ на рост ксенографтов РМЖ

Опухолевый штамм	Разовая доза	Способ введения	Эффект	Авторы
MDA-MB-435	750 мг/кг	внутри	↓	Phoenix K., 2008 [106]
MDA-MB-231	200-250 мг/кг	внутри	↓ ↓ ↓	Bolin L., 2009 [94] Cheong J., 2011 [29] Garcia-Castillo V., 2017 [119]
MDA-MB-468	50 мг/кг	зонд	↓	Orecchioni S., 2015 [121]
BT-474-HER-2 ⁺	200 мкг/мл	внутри	↓	Pipoulos D., 2011 [89]
MCF10-ER-src	200 мкг/мл	внутри	↓	Heather A., 2013 [89]

1.6 Метформин и лечение РМЖ

Опубликованные результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о снижении заболеваемости злокачественными опухолями и смертности в целом у пациентов, которым был назначен МТФ [86, 88]. В отношении снижения заболеваемости РМЖ также есть результаты нескольких работ. Так, выявлено снижение риска заболеваемости РМЖ на 20% у пациенток, получавших МТФ по сравнению с теми, кто не получал препарат [26], в другом исследовании отмечено снижение заболеваемости РМЖ на 17% [72, 102]. Было

изучено влияния МТФ на отдаленные результаты лечения РМЖ, оценивалась ОВ и БРВ. В нескольких исследованиях не было отмечено преимуществ в ОВ и БРВ при использовании МТФ после радикального лечения больных РМЖ [24, 38, 122, 127]. Однако, есть данные и о положительном влиянии препарата на эти показатели. Продемонстрировано увеличение ОВ ($p=0,041$) и более низкая смертность по причине прогрессирования ($p=0,023$) у больных HER2-положительным РМЖ и СД, принимавших МТФ, по сравнению с не принимавшими. В другой работе показано, что среди пациенток, радикально пролеченных по поводу РМЖ, получавших метформин по поводу СД была более высокая ОВ по сравнению с теми, кто не получал МТФ ($p=0,024$). При подгрупповом анализе выяснилось, что больные трижды положительным РМЖ (опухоли, которые одновременно экспрессировали рецепторы к эстрогенам, прогестерону и HER2) и получавшие МТФ, имели статистически значимо большую БРВ по сравнению с пациентами с СД, не получавшими МТФ ($p=0,001$). Тогда как при других биологических подтипах различий между группами получено не было [60]. Опубликованы так же результаты анализа влияния приема МТФ у больных СД II типа с HER-положительным РМЖ на ОВ и БРВ [52]. Анализ проводился с учетом базы данных пациентов, участвовавших в исследовании ALTTO (адьювантное лечение в 4-х группах больных HER2-положительным ранним РМЖ – трастузумаб, лапатиниб, последовательное назначение трастузумаба и лапатиниба, и совместное их применение) [20]. Среди всех включенных в это исследование пациенток ($n=8\ 381$) страдали СД II типа 446 (5,3%) больных, из них 260 принимали МТФ. Медиана наблюдения составила 4,5 года. Результаты исследования показали, что БРВ и ОВ больных HER2-положительным РМЖ с СД, принимавших МТФ, была сопоставима с пациентами без СД ($p=0,873$, $p=0,541$). При сравнении данных показателей среди 2-х групп больных HER2-положительным РМЖ с СД II типа на МТФ и без него выяснилось, что больные, принимавшие препарат, имеют более длительную БРВ ($p=0,013$) и ОВ ($p=0,004$). Также авторы отмечают более плохие результаты лечения среди пациентов, получавших инсулин. Таким образом, прием МТФ больными ранним HER2-положительным РМЖ,

страдающих сахарным диабетом второго типа, достоверно увеличивает ОБ и БРВ данной категории больных.

Результаты исследований по влиянию МТФ на отдаленные результаты лечения представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты исследований по оценке влияния приема метформина на отдаленные результаты лечения РМЖ

Автор	Число пациентов	Биологический подтип	Медиана наблюдения, мес.	Влияние метформина на ОБ и БРВ
Bayraktar S., 2012 [38]	1 318	Трижды негативный	62	Не влияет
Lega I., 2013 [24]	1 094	Все подтипы	54	Не влияет
Peeters P., 2013 [127]	508/550	Все подтипы		Не влияет
Oppong B., 2014 [122]	141	Все подтипы	87	Не влияет
Kim H., 2015 [60]	6 581	Все подтипы	100,3	Увеличивает ОБ, увеличивает БРВ при ER +PR+ HER2+
Sonnenblick A., 2017 [52]	8 831	HER 2	54	Увеличивает БРВ и ОБ

В одном из исследований ретроспективно оценивалось достижение полного патоморфологического ответа (pCR) у пациенток, получавших неоадьювантную химиотерапию с включением антрациклинов и таксанов по поводу местно-распространенного РМЖ. Было выявлено увеличение частоты pCR у пациенток с СД (n=68), принимавших МТФ (p=0,007) по сравнению с группой пациенток с СД, не принимавших препарат (n=87) [45]. В более поздней работе также ретроспективно оценивалась частота pCR у пациенток с СД, принимавших МТФ в дозе 500 мг (n=14) и не принимавших его (n=39). У 64,3% пациенток 1-й группы был достигнут pCR, в то время как во 2-й группе – только у 23,1% (p=0,008) [128].

Бигуанид назначался женщинам с впервые выявленным операбельным РМЖ, не страдающих СД, с момента биопсии и до операции, при этом противоопухолевого лечения пациентки в этот период не получали. Так, в первом из них, пациенткам (n=39) МТФ назначался в дозе 500 мг в день с момента биопсии и до операции. Медиана приема препарата составила 18 дней (13-40). Было отмечено снижение Ki-67 с 36 до 33,5%. Следует отметить короткий период приема препарата, низкую ежедневную дозу, небольшое количество включенных пациенток и отсутствие группы контроля [92]. Во втором, уже рандомизированном исследовании наблюдали 200 пациенток с впервые выявленным операбельным РМЖ. Больные рандомизировались на 2 равные группы. Первая группа (люминальный А – 23, Люминальный В – 62, HER2-позитивный – 7 и трижды негативный – 8) получали МТФ 850 мг 2 раза в сутки, другая половина – плацебо (люминальный А – 29, Люминальный В – 59, HER2-позитивный – 2 и трижды негативный – 10). Время приема составляло 4 недели с момента биопсии опухоли до оперативного лечения. Эффект МТФ на снижение Ki-67 был больше на 4% по сравнению с плацебо, однако это не является статистически значимым [36]. Результаты эпидемиологических исследований и опытов на животных послужили причиной для начала изучения метформина в клинике с целью оценки его противоопухолевой активности у больных злокачественными новообразованиями. В таблице 9 суммированы исследования на 2017 год по изучению непосредственной противоопухолевой активности МТФ в клинике (ClinicalTrialGov).

Таблица 9 – Исследования по изучению МТФ в лечении РМЖ, зарегистрированные в ClinicalTrialGov

Стадия	Лечение	Фаза исследования	Ссылка
I-II	АС +/- метформин	II	NCT02472353
	Аторвастатин + метформин	I	NCT01980823

Продолжение таблицы 9

II - III	ТАС +/- метформин	II	NCT01929811
	Летрозол +/- метформин	II	NCT01589367
	Химиотерапия АС +/- метформин	III	NCT02506777
	Химиотерапия липосомальный доксорубицин + трастузумаб + метформин	II	NCT02488564
	Торемифен +/- метформин	III	NCT02506790
IV	АС +/- метформин	II	NCT01885013
	Химиотерапия любая +/- метформин	II	NCT01310231
	Лапатиниб +/- ГТ +/- метформин	II	NCT01477060
	Экземестан + эверолимус + метформин	II	NCT01627067
	Эрлотиниб + метформин	I	NCT01650506
	Паклитаксел +/- метформин	II	NCT02360059

Исходя из всего вышесказанного, представляется целесообразным дальнейшее изучение как МЛТ, так и МТФ в клинической онкологии, как препаратов, обладающих доказанной эффективностью в преклинических испытаниях. Наиболее точные данные по их активности в отношении РМЖ могут быть получены только в рамках проспективных рандомизированных исследований, дизайн которых будет предполагать включение МЛТ и МТФ в стандартные режимы лекарственного лечения РМЖ.

Глава 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальная часть

Для экспериментального обоснования применения мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией рака молочной железы было проведено на моделях перевиваемых опухолей у 211 мышей 4 опыта, из них 3 опыта – по оценке эффективности химиотерапии или гормонотерапии в сочетании с МЛТ и МТФ и 1 опыт – по изучению влияния МТФ на острую токсичность цитостатиков:

- опыт № 1 – влияние доксорубицина в сочетании с различными способами введения мелатонина на рост перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у самок – мышей SHR (n=60);
- опыт № 2 – влияние паклитаксела в сочетании с мелатонином и метформином на рост перевиваемой опухоли молочной железы HER2 у самок линии FBV/N (n=69);
- опыт № 3 – изучение действия торемифена и метформина у мышей FBV/N с HER2-положительным раком молочной железы (n=42);
- опыт № 4 – влияние метформина на острую токсичность доксорубицина и паклитаксела у мышей – самцов линии SHR (n=40).

Дизайн экспериментов по оценке эффективности различных видов лечения был одинаков во всех трех экспериментах. Мышам подкожно в правый бок перевивалась опухолевая взвесь. Далее животные с помощью компьютерной программы рандомизировались в различные группы лечения (от 4-х до 7-ми групп).

Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли, а также по площади под кинетической кривой роста опухоли и индексу роста опухоли.

В опыте по токсичности животным однократно внутрибрюшинно вводили цитостатик в максимально переносимой дозе в монорежиме или в сочетании с МТФ. Токсичность оценивали по продолжительности жизни и изменению веса мышей.

2.1.1 Животные

В исследовании использованы 100 мышей линии SHR весом 22-26 г, 3 мес. возраста (60 самок, 40 самцов) и 111 мышей линии FBV/N весом 22-26 г, 3-4 мес. возраста (42 самца и 69 самок) собственной разводки вивария НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Животные содержались в пластиковых клетках со стальными решетками типа ТЗ и получали питьевую воду и полнорационный брикетированный корм ПК-120 (производство ООО «Лабораторкорм», Москва) ad libitum.

Все проведенные исследования с лабораторными животными выполнялись в соответствии с правилами Европейской Конвенции о защите позвоночных животных (СДСЕ № 123) и нормами биоэтики (CIOMS, ICLAS, 2012).

2.1.2 Препараты

В работе использованы противоопухолевые препараты доксорубин Синдроксоцин (Actavis, Румыния), паклитаксел (Тева Прайвет Ко, Венгрия), антиэстроген торемифен (Orion согр., Финляндия), антидиабетический бигуанид метформин (Biomedicals, LLC, Франция) и гормон эпифиза мелатонин (Biomedicals, LLC, Франция).

2.1.3 Разведение препаратов

2.1.3.1 Приготовление раствора доксорубицина

Один флакон доксорубицина 50 мг растворяли в 100 мл 0,9% раствора хлорида натрия и получали раствор с концентрацией 0,5 мг/мл. Дозы доксорубицина и объем раствора препарата рассчитывали в зависимости от веса животных. Дозы мелатонина в зависимости от веса животных представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Дозы доксорубицина и объемы раствора препарата для инъекций

При дозе доксорубицина 5 мг/кг веса			При дозе доксорубицина 2 мг/кг веса		
вес мыши	мг/мышь	объем, мл	вес мыши	мг/мышь	объем, мл
20	0,1	0,20	20	0,04	0,08
22	0,11	0,22	22	0,044	0,09
24	0,12	0,24	24	0,048	0,10
26	0,13	0,26	26	0,052	0,10
28	0,14	0,28	28	0,056	0,11
30	0,15	0,30	30	0,06	0,12
32	0,16	0,32	32	0,064	0,13

2.1.3.2 Приготовление раствора паклитаксела

Дозу паклитаксела и объем раствора (6 мг/мл) препарата для инъекций рассчитывали в зависимости от веса животных. Дозировка паклитаксела и объем раствора для введения в зависимости от веса мышей представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Дозы паклитаксела и объемы раствора препарата для инъекций

Вес мыши (г)	Доза ПКЛ (мг/мышь)	Объем для введения (мл)
20	0,12	0,20
22	0,132	0,22
24	0,144	0,24
26	0,156	0,26
28	0,168	0,28
30	0,18	0,30
32	0,192	0,32
34	0,204	0,26
36	0,216	0,28
38	0,228	0,30
40	0,24	0,32

2.1.3.3 Приготовление раствора метформина

Метформин мыши получали внутрь в дозе 100 мг/кг. Для приготовления раствора метформина 1 000 мг метформина растворяли в 1 л водопроводной воды.

2.1.3.4 Приготовление раствора мелатонина

Для подкожного введения при разведении мелатонина исходили из среднего веса тела животных 25 г. При дозе 10 мг/кг веса тела необходимо было вводить в среднем 0,25 мг/мышь. Соответственно готовили раствор МЛТ с концентрацией 1,25 мг/мл. 10 мг МЛТ разводили в 0,02 мл этанола и добавляли Ф/Р до общего объема 8 мл. Для приготовления раствора мелатонина для приема внутрь при разведении мелатонина, исходили из среднего веса тела животных 25 г. Учитывая дозу 10 мг/кг веса тела, необходимо было вводить в среднем 0,25 мг/мышь. Соответственно готовили раствор МЛТ с концентрацией 1,25 мг/мл. 10 мг МЛТ разводили в 0,02 мл этанола и добавляли Ф/Р до общего объема 8 мл.

2.1.3.5 Приготовление раствора торемифена

Торемифен животные получали растворённым в питьевой воде в дозе 30 мг/кг, что эквивалентно 0,6 мг на мышь с массой тела 20 г. Растворяли 60 мг торемифена (1 таблетку) в 200 мл воды, получая 0,6 мг в 2 мл. Такое количество препарата полностью растворяется в воде.

2.1.4 Опухоль и методика трансплантации

В экспериментах использованы 2 опухолевых штамма – солидный штамм опухоли Эрлиха, который на протяжении многих лет поддерживается на мышах и сохраняется в опухолевом банке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и штамм солидной перевиваемой опухоли, полученный путем последовательной трансплантации новообразования, возникшего у трансгенной мыши-самки FVB/N с инкорпорированным геном HER2. Опухоли перевивались мышам подкожно в правый бок. Суспензия опухолевых клеток 0,2 мл 10% раствора вводилась инсулиновым шприцом.

2.1.5 Методы оценки противоопухолевой активности препаратов

Ежедневно осматривали всех животных и регистрировали время появления опухолей. Регулярно (два раза в неделю) животных взвешивали и измеряли у них длину и ширину опухолевых узлов. Данные веса тела мышей и размеры опухолей отмечали на специальных бланках. Объем опухоли рассчитывали по формуле:

$$V = (a \times b^2) / 2, \quad (1)$$

где a – наибольший;

b – наименьший линейный размер узла.

Измерение размеров опухоли начинали с 10-14-го дня после перевивки опухоли, когда с надежностью можно было убедиться в развитии опухолевых узелков на месте перевивки. К этому сроку опухоли развились у всех животных. Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли, а также по площади под кинетической кривой роста опухоли и индексу роста опухоли. Величину торможения роста рассчитывали по формуле:

$$(V_K - V_O) / V_K \times 100\%, \quad (2)$$

где V_K – средний объем опухоли в контрольной группе;

V_O – средний объем опухоли в опытной группе, и выражали в процентах. Ускорение роста опухоли, рассчитывали по аналогичной формуле и отмечали на бланках со знаком минус (-), соответственно. Индекс роста (ИРО) опухоли определяли в процентах по формуле:

$$\text{ИРО} = \frac{S_{\text{Э}}}{S_K} \times 100, \quad (3)$$

где $S_{\text{Э}}$ – площадь под кинетической кривой роста опухоли в группе мышей, получавших терапию;

S_K – площадь под кинетической кривой роста опухоли мышей контрольной группы.

Очевидно, что индекс роста опухоли контроля всегда будет равен 100%, тогда как в подопытных группах при регрессии, стабилизации или замедлении роста опухоли он будет меньше 100%, а при стимуляции роста опухоли – больше 100%. То есть, чем сильнее противоопухолевый эффект, тем меньше ИРО. Существенно, что ИРО оказывается интегральным критерием противоопухолевой активности терапии, учитывающим не только выраженность противоопухолевого действия, но и его продолжительность. Для измерения площади под кинетической кривой роста опухоли использовали метод трапеций, базирующийся на формуле:

$$S = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{V_i + V_{i+1}}{2} \times t_i = \frac{V_1 + V_2}{2} \times t_1 + \frac{V_2 + V_3}{2} \times t_2 + \dots + \frac{V_{n-1} + V_n}{2} \times t_{n-1}, \quad (4)$$

где V_i – объем опухоли в соответствующем измерении под номером i ;

n – число измерений;

t_1 – время в днях между первым и вторым измерениями;

t_2 – время в днях между вторым и третьим измерениями,

t_{n-1} – время в днях между предпоследним и последним измерениями.

В качестве критерия эффективности терапии использовали увеличение продолжительности жизни животных (УПЖ, %), которое определяли по формуле:

$$\begin{aligned} \text{УПЖ} &= (\text{МПЖ}_K - \text{МПЖ}_Э) / \text{МПЖ}_K \times 100 \\ U &= (LO/LK - 1) \times 100\%, \end{aligned} \quad (5)$$

где U – увеличение продолжительности жизни, %;

LO – медиана продолжительности жизни в экспериментальной группе;

LK – медиана продолжительности жизни в контрольной группе.

Регистрировали сроки гибели животных для оценки выживаемости и расчета медианы продолжительности жизни мышей после перевивки опухоли. Эксперимент 1 был завершен (стоп-эксперимент) через 31 день, эксперимент 2 – через 39 дней после перевивки опухоли, а эксперимент 3 – через 38 дней после перевивки опухоли, когда большинство животных пали.

2.1.6 Опыт 1. Влияние доксорубицина в сочетании с различными способами введения мелатонина на рост перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у самок – мышей SHR

Опухоль была перевита 60-ти мышам – самкам линии SHR. Через 48 часов после перевивки опухоли, животные были рандомизированы по компьютерной программе (SAS/Stat User's Guide, version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2009. SAS institute Inc./gphpad.com, quckcalls) на 6 групп.

- *Группа № 1:* 11 мышам контрольной группы однократно внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора с 0,02 мл этанола и подкожно вводили физиологический раствор с 0,008 мл этилового спирта 5 раз в неделю на протяжении 3 недель в вечернее время (после 17 часов). В дневное время животные пили обычную водопроводную воду, в вечернее время – водопроводную воду с 0,008 мл этилового спирта.
- *Группа № 2:* 10 мышам вводили подкожно мелатонин в дозе 10 мг/кг (по 0,2 мл раствора) в вечернее время 5 раз в неделю на протяжении 3 недель.
- *Группа № 3:* 10 мышей получали мелатонин в концентрации 10 мг/л с питьевой водой в вечернее время 5 последовательных дней в неделю на протяжении 3 недель. Продолжительность экспозиции к МЛТ была выбрана такой же, как и общая длительность инъекций МЛТ во 2-й группе.
- *Группа № 4:* 10 мышам вводили внутрибрюшинно доксорубин в дозе 5 мг/кг однократно в дневное время.
- *Группа № 5:* 10 мышам вводили доксорубин как мышам 4-й группы и мелатонин как мышам 2-й группы.
- *Группа № 6:* 10 мышам вводили доксорубин как мышам 4-й группы и мелатонин как мышам 3-й группы.

2.1.7 Опыт 2. Влияние паклитаксела в сочетании с мелатонином и метформином на рост перевиваемой опухоли молочной железы HER2 у самок линии FBV/N

Было использовано 69 мышей – самок линии FBV/N. После перевивки животные были рандомизированы по компьютерной программе (SAS/Stat User's Guide, version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2009. SAS institute Inc./graphpad.com, quickcalls) на 7 групп.

- *Группа № 1:* 9 мышам контрольной группы внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора 1 раз в неделю на протяжении трех недель.

- *Группа № 2:* 10 мышам однократно внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора 1 раз в неделю на протяжении трех недель, также мыши получали мелатонин в дозе 10 мг/л ежедневно в вечернее и ночное время на протяжении всего эксперимента.
- *Группа № 3:* 10 мышам внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора 1 раз в неделю на протяжении трех недель, также мыши получали метформин внутрь с питьевой водой в дозе 100 мг/л ежедневно на протяжении всего эксперимента.
- *Группа № 4:* 10 мышам внутрибрюшинно вводили паклитаксел в дозе 6 мг/кг 1 раз в неделю на протяжении трех недель.
- *Группа № 5:* 10 мышам внутрибрюшинно вводили паклитаксел в дозе 6 мг/кг 1 раз в неделю на протяжении трех недель, также мыши получали мелатонин как в группе 2.
- *Группа № 6:* 10 мышам внутрибрюшинно вводили паклитаксел в дозе 6 мг/кг 1 раз в неделю на протяжении трех недель, также мыши получали метформин как в группе 3.
- *Группа № 7:* 10 мышам внутрибрюшинно вводили паклитаксел в дозе 6 мг/кг 1 раз в неделю на протяжении трех недель, также мыши получали мелатонин как в группе 2 и метформин как в группе 3.

2.1.8 Опыт 3. Изучение действия торемифена и метформина у мышей FBV/N с HER2-положительным РМЖ

Исследование проведено на 42 мышах-самцах трансгенной линии FBV/N. Всем мышам была инокулирована внутримышечно 20% взвесь опухолевой ткани от мыши FBV/N самки со спонтанным раком молочной железы. На 5 день после перевивки мыши были рандомизированы на 4 группы.

- *Группа № 1:* 12 мышей получали ежедневно чистую питьевую воду.

- *Группа № 2:* 10 мышей получали ежедневно торемифен 30 мг/кг с питьевой водой.
- *Группа № 3:* 10 мышей получали ежедневно метформин 100 мг/кг с питьевой водой.
- *Группа № 4:* 10 мышей получали ежедневно торемифен 30 мг/кг с питьевой водой ежедневно + метформин 100 мг/кг с питьевой водой.

2.1.9 Опыт 4. Влияние метформина на острую токсичность доксорубицина и паклитаксела у мышей – самцов линии SHR

Мышам – самцам линии SHR (n=40) вводили однократно внутрибрюшинно доксорубицин или паклитаксел в дозе 15 мг/кг, которая для этих препаратов превышала максимально переносимую дозу.

- *Группа 1:* (n=10) паклитаксел внутрибрюшинно 30 мг/кг однократно.
- *Группа 2:* (n=10) паклитаксел внутрибрюшинно 30 мг/кг однократно и метформин 100 мг/кг внутрь с питьевой водой.
- *Группа 3:* (n=10) доксорубицин внутрибрюшинно 15 мг/кг однократно.
- *Группа 4:* (n=10) доксорубицин внутрибрюшинно 15 мг/кг однократно и метформин 100 мг/кг внутрь с питьевой водой.

2.2 Статистическая обработка результатов опытов

Все экспериментальные животные принадлежали к одной линии, имели одинаковый вес и возраст. Группы животных, включенных в отдельные опыты, не имели гендерных различий, поэтому для обработки данных использовались методы базисного статистического анализа. Результаты, полученные при проведении экспериментов, были проанализированы с помощью критерия

Стьюдента с целью установления статистической значимости выявленных различий (различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$).

2.3 Клиническая часть

Клиническая часть работы «Влияние мелатонина и метформина на эффективность противоопухолевого лечения (химиотерапии и гормонотерапии) у больных с местно-распространенным раком молочной железы» была выполнена в научном отделе инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Научно-исследовательская работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Все больные до включения в научно-исследовательскую работу подписывали информированное согласие в двух экземплярах на основе ознакомления. Учитывая цели и задачи работы, формировалась выборка пациенток, в соответствии критериям включения и исключения в исследование.

Критерии включения:

- Получение информированного согласия на участие в исследовании.
- Возраст ≥ 18 лет.
- Морфологически подтвержденный диагноз РМЖ, стадии IА, IВ, IIIА, IIIВ, IIIС.
- ECOG оценка 0-2.
- Ожидаемая продолжительность жизни более 3 мес.
- Согласие пациентов применять надежные методы контрацепции на протяжении всего исследования.
- Адекватная функция печени и костного мозга
 - нейтрофилы $> 1,5 \cdot 10^9/\text{л}$;
 - гемоглобин > 80 г/л;

- тромбоциты $>100 \cdot 10^9/\text{л}$;
- повышение трансаминаз и/или билирубина <2 ст.

Критерии исключения:

- Проведение ранее любой системной терапии по поводу РМЖ.
- IV стадия заболевания.
- Тяжелые неконтролируемые сопутствующие хронические заболевания или острые заболевания.
- Наличие второй злокачественной опухоли (за исключением ранее излеченных злокачественных новообразований).
- Беременность или лактация.
- Сахарный диабет, требующий применения сахароснижающих препаратов.
- Любые состояния, которые, по мнению врача, препятствуют проведению процедур исследования.

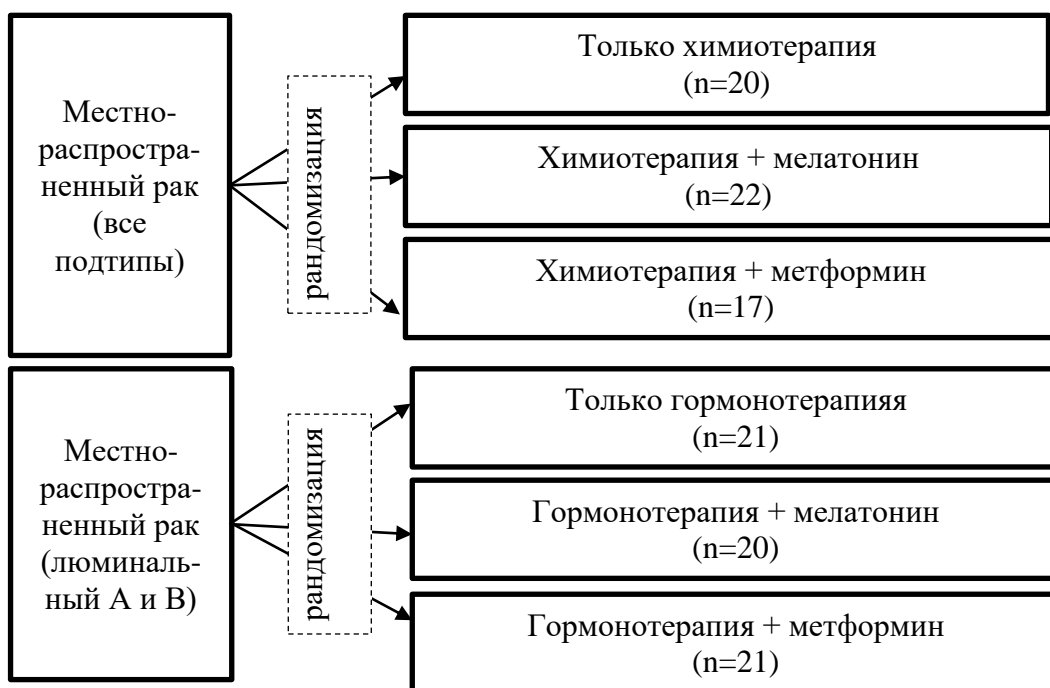


Рисунок 1 – Дизайн исследования по применению мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией больных РМЖ.

2.3.1 Характеристика исследуемых групп

После завершения обследования все пациентки с помощью компьютерной программы рандомизировались на 6 групп. Больные (люминальный А и Б, HER 2 позитивный, трижды негативный) рандомизировались в соотношении приблизительно 1:1:1 на 3 группы:

- проведение химиотерапии на основе антрациклиновых антибиотиков и таксанов в стандартных режимах;
- проведение химиотерапии на основе антрациклиновых антибиотиков и таксанов в стандартных режимах + мелатонин 3 мг внутрь ежедневно на ночь;
- проведение химиотерапии на основе антрациклиновых антибиотиков и таксанов в стандартных режимах + метформином 850 мг 2 раза в день внутрь ежедневно.

Больные местно-распространенным люминальным (А и В подтипами) рандомизировались в соотношении приблизительно 1:1:1 на 3 группы:

- прием торемифена 120 мг внутрь ежедневно;
- прием торемифена 120 мг внутрь ежедневно в сочетании с мелатонином 3 мг внутрь ежедневно на ночь;
- прием торемифена 120 мг внутрь ежедневно в сочетании с метформином 850 мг два раза в день внутрь ежедневно.

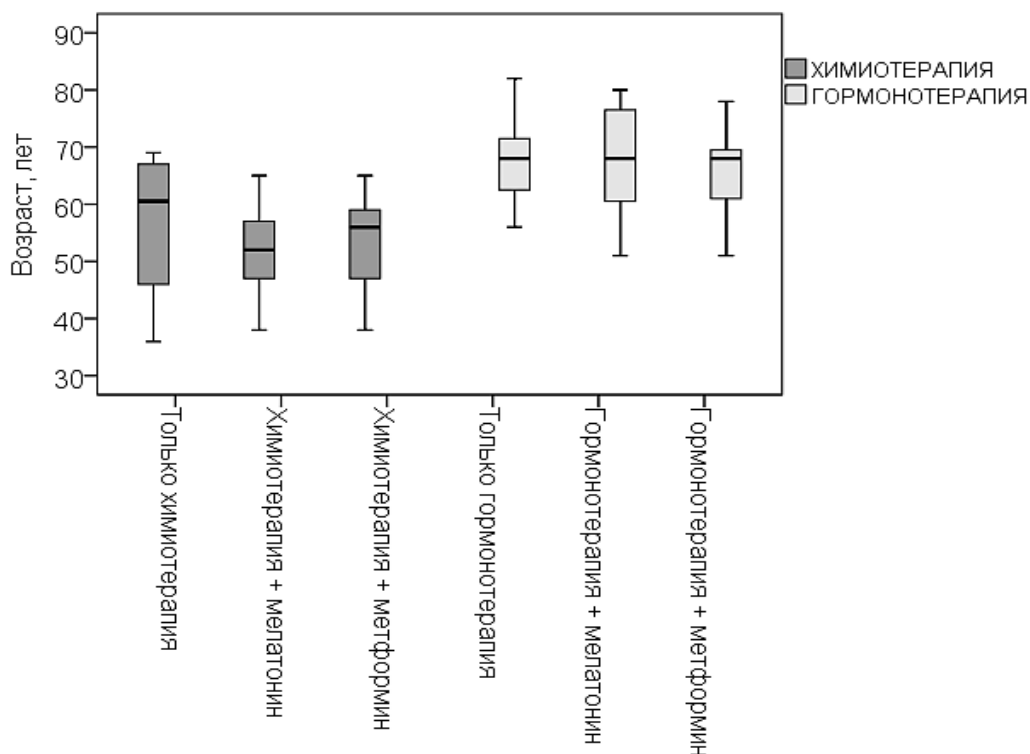
Всего в исследование были включены 122 больных местно-распространенным раком молочной железы. Характеристика пациенток, включенных в исследование представлена в таблицах 12, 13. Как видно из таблиц сравниваемые между собой группы были однородны по всем показателям. Анализ эффективности проведенного лечения были доступны данные лишь 107 из 122 пациенток (53 больных из группы химиотерапии, 54 больных из группы гормонотерапии). Медиана возраста пациенток представлена на рисунке 2.

Таблица 12 – Общая характеристика больных местно-распространенным РМЖ до начала неoadьювантной химиотерапии

Показатели	Общая группа n=60		Группа № 1 «Химиотерапия», n=21		Группа № 2 «Химиотерапия+ МЛТ», n=22		Группа № 3 «Химиотерапия+ МТФ», n=17	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Медиана возраста (годы)	56,0		60,5		52,0		56,0	
Люминальный А (ЭР+/ПР+/HER2- /Ki-67<35%)	18	34	7	35	7	33,5	4	33
Люминальный В (ЭР+/ПР+/HER2- /Ki-67>35%)	16	30,2	5	25	6	28,5	5	42
HER2-позитивный	15	28,3	6	30	6	28,5	3	25
Трижды негативный	4	7,5	2	10	2	9,5	0	0
Метастазы в аксиллярных лимфатических узлах	41	77	17	85	15	71,5	9	75
Менопауза	34	62	15	75	13	61	6	50
Нормальный ИМТ	24	45	7	35	11	52	6	50
Избыточная масса тела	16	30	8	40	4	19	4	33
Ожирение I ст.	9	17	5	25	3	14	1	8,5
Ожирение II ст.	3	6	0	0	2	9	1	8,5
Ожирение III ст.	1	2	0	0	1	6	0	0
Примечание – В общей группе у больных (n=60) местно-распространенным РМЖ сахарного диабета выявлено не было. Все больные в исследуемых группах не являлись носителями мутации BRCA 1 типа.								

Таблица 13 – Общая характеристика больных местно-распространенным неспецифицированным ЭР+РМЖ до начала неoadъювантной гормонотерапии торемифеном

Показатели	Общая группа n=62		Группа № 1 «Торемифен» n=21		Группа № 2 «Торемифен+МЛТ» n=20		Группа № 3 «Торемифен+МТФ» n=21	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Медиана возраста (годы)	68		68		68		68	
Критерии	n	%	n	%	n	%	n	%
Люминальный А (ЭР+/ПР+/HER2- /Ki-67<35%)	41	76	15	79	11	69	15	79
Люминальный В (ЭР+/ПР+/HER2- /Ki-67>35%)	13	24	4	21	5	31	4	21
Метастазы в аксиллярных лимфатических узлах	43	79,6	15	78,9	14	87,5	14	74,6
Менопауза	54	100	19	100	16	100	19	100
Нормальный ИМТ	16	30	7	37	5	31	4	21
Избыточная масса тела	15	28	3	16	7	43	5	26
Ожирение I ст.	15	28	7	37	2	12	6	31
Ожирение II ст.	4	7	1	5	1	7	2	11
Ожирение III ст.	4	7	1	5	1	7	2	11
Примечание – В общей группе у больных (n=62) местно-распространенным ЭР+РМЖ сахарного диабета выявлено не было. Все больные в исследуемых группах не являлись носителями мутации BRCA 1 типа.								



Возраст по группам по порядку: медиана (1-й, 3-й квартили)
 химиотерапия 60,5 (45,5; 67,5); химиотерапия + МЛТ 52,0 (46,0; 62,8);
 химиотерапия + МТФ 56,0 (47,0; 60,0); гормонотерапия 68,0 (62,0; 72,0);
 гормонотерапия + МЛТ 68,0 (60,3; 77,3); гормонотерапия + МТФ 68,0 (58,0; 70,0).

Рисунок 2 – Диаграмма возраста пациентов
 в исследуемых группах больных РМЖ в зависимости от проведенного лечения.

2.3.2 Методы обследования пациентов

Все пациенты, включенные в исследование, проходили стандартное обследование, которое включало биопсию ткани опухоли с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованиями, инструментальные исследования для оценки распространенности опухолевого процесса и исключения наличия отдаленных метастазов. Также все пациентки сдавали кровь для определения наличия BRCA мутации и определения показателей клинического и биохимического анализов.

2.3.2.1 Гистологическое исследование

У всех пациенток, включенных в исследование был морфологически и иммуногистохимически верифицирован РМЖ. На этапе скрининга пациенткам выполнялась трепан биопсия опухоли с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием (экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону, экспрессии HER2; индекса пролиферативной активности Ki-67) и пункционная биопсия аксиллярных лимфатических узлов при подозрении на их метастатическое поражение. Патоморфологическая оценка опухоли проводилась согласно критериям классификации ВОЗ (2012). При подсчете количества окрашенных визуализирующим агентом ядер клеток опухоли учитывалось процентное соотношение окрашенных и неокрашенных ядер клеток на 100 учтенных клеток в 10-ти репрезентативных полях зрения при увеличении×40. Результат индекса пролиферативной активности выдавался с указанием процента клеток, в которых определялась экспрессия белка к Ki-67. После операции также все пациенткам было проведено гистологическое исследование с обязательным определением наибольшего опухолевого узла, оценка гистологической формы инвазивного рака, наличие инвазии скелетной мышцы, кожи, оценка краев резекции и поражение лимфатических узлов, степень злокачественности по *Ellison-Elston* и оценка степени патоморфологического ответа опухоли проводилась по классификации I. Miller, S. Payne (2002). Также проводился иммуногистохимический анализ операционного материала.

2.3.2.2 Оценка распространенности опухолевого процесса

Пациентки перед началом терапии были обследованы. Использовались такие методы как УЗИ молочных желез с соноэластографией, маммография с оценкой по BI-RADS, позитивная сцинтиграфия молочных желез и зон регионарного лимфооттока. Оценка эффекта проводимого лечения проводилась

каждые 2 цикла в группах химиотерапии и каждые 2 месяца в группах гормонотерапии. Были использованы критерии RECIST 1.1. Методы исследования в динамике были те же, что и при первичном обследовании больных. При оценке очагов в качестве измеримых очагов выбирались опухолевые узлы в молочной железе и аксиллярные л/у, размер которых по короткой оси был ≥ 15 мм. Учитывались суммы максимальных диаметров всех очагов, за исключением лимфатических узлов, для которых использовался диаметр, перпендикулярный к максимальному. Лимфатические узлы, размеры минимального диаметра которых ≤ 10 мм расценивались как непораженные.

Для оценки клинической эффективности по шкале RECIST использовались следующие критерии:

- полный регресс – полное исчезновение всех ранее регистрировавшихся очагов при отсутствии вновь появившихся очагов (размеры патологически измененных лимфатических узлов по короткой оси должны уменьшиться менее 10 мм);
- частичный регресс – уменьшение суммарного диаметра целевых очагов более чем на 30% при отсутствии признаков прогрессирования по неизмеримым очагам и новых очагов либо полный регресс измеримых очагов при сохраняющихся без прогрессирования неизмеримых очагах;
- прогрессирование заболевания – появление новых очагов, либо увеличение суммарного диаметра наиболее крупных из измеримых очагов на 20% от минимального их размера за время исследования, либо значительное прогрессирование неизмеримых очагов;
- стабилизация заболевания – все ответы на лечение, не соответствующие ранее перечисленным критериям.

Частота клинического эффекта проводимой терапии складывалась из частоты полных и частичных регрессов у пролеченных больных.

2.3.3 Оценка качества жизни

Все пациентки перед началом лечения заполняли опросники по качеству жизни EORTC QLQ C30. На фоне проводимой терапии каждые 2 курса химиотерапии и каждые 2 месяца гормонотерапии опросники заполнялись повторно.

Анкета EORTC QLQ – C30 включает 30 вопросов и состоит из ряда шкал:

5 функциональных шкал:

- физическое функционирование (PF);
- ролевое функционирование (RF);
- эмоциональное функционирование (EF);
- когнитивное функционирование (CF);
- социальное функционирование (SF).

3 шкалы симптоматики:

- утомляемость (FA);
- тошнота/рвота (NV);
- боль (PA).

6 одиночных пунктов:

- одышка (DY);
- нарушение сна (SL);
- потеря аппетита (AP);
- запоры (CO);
- диарея (DI);
- финансовые затруднения (FI).

2.3.4 Статистические методы оценки результатов исследования

Для пациентов, получавших неoadъювантную химиотерапию, оценка эффективности лекарственной терапии проводилась на основании оценки степени

патоморфологического ответа опухоли. Для пациентов, получавших неoadьювантную гормональную терапию, оценка эффективности терапии проводилась на основании динамики индекса пролиферации опухоли Ki-67. Выбор представленных конечных точек для оценки эффективности неoadьювантной системной терапии был обусловлен тем, что для химиотерапии РМЖ именно степень патоморфологического ответа опухоли на проведенное лекарственное лечение, а для гормональной терапии именно индекс Ki-67 являются основными предикторами, определяющими долгосрочный прогноз заболевания – улучшения показателей общей выживаемости (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ).

В процессе включения пациентов в исследования выбор дополнительной терапии МЛТ или МТФ проводился на основании рандомизации пациентов, данный методологический подход позволил обеспечить относительно равномерное распределение характеристик пациентов между сравниваемыми группами. Тем не менее, в связи с достаточно небольшой численностью групп пациентов, для повышения точности результатов обработки данных в многомерном анализе потребовалось учитывать исходно имеющиеся различия между группами по ряду признаков, хотя они и не были статистически значимыми.

Анализ данных проводился с помощью статистической программы SPSS 17.0 (SPSS Corp, TX, USA) [14].

2.3.4.1 Базисный статистический анализ данных

Проверка распределения изучаемых количественных данных проводилась путем построения гистограмм распределения и с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как в большинстве случаев распределение количественных данных отличалось от нормального, для унификации представления количественных данных использовались медиана и квартили, а для графического представления – квартильные диаграммы («боксплоты»). Для представления качественных

(номинальных) данных использовались частоты в процентном выражении [7]. Для сравнения количественных данных независимых групп использовались критерии Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни [8, 10], для сравнений по типу «до-после» использовался парный критерий Вилкоксона [9]. Для сравнения качественных данных использовался критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса и точный критерий Фишера. При анализе многопольных таблиц с помощью данных критериев учитывалось ключевое условие проведения данного анализа: доля ячеек с ожидаемым числом наблюдений менее 5 не должна превышать 20% от общего числа ячеек многопольной таблицы [6].

2.3.4.2 Многомерный статистический анализа данных

При планировании анализа был учтен тот факт, что изучаемые исходы (степень патоморфологического ответа опухоли и динамика индекса Ki-67) подвержены не только непосредственно изолированному влиянию изучаемого фактора – неoadьювантному лечению (виду химиотерпии или гормонотерпии), но и другим внешним и внутренним факторам (т.н. «конфаундерам»), которые также потенциально могут оказывать влияние на исход, сравнимое по степени влияния с изучаемым фактором (рисунок 3) [6, 49].

Соответственно, закономерным следствием действия конфаундеров (т.н. «конфаундинг-эффект») является искажение полученных в результате анализа результатов исследования. Для устранения влияния на результаты исследования «конфаундинг-эффекта» используются методы многомерного статистического анализа, и в данном случае был использован метод бинарной логистической регрессии, являющийся наиболее широко используемым в биомедицинских исследованиях [16].

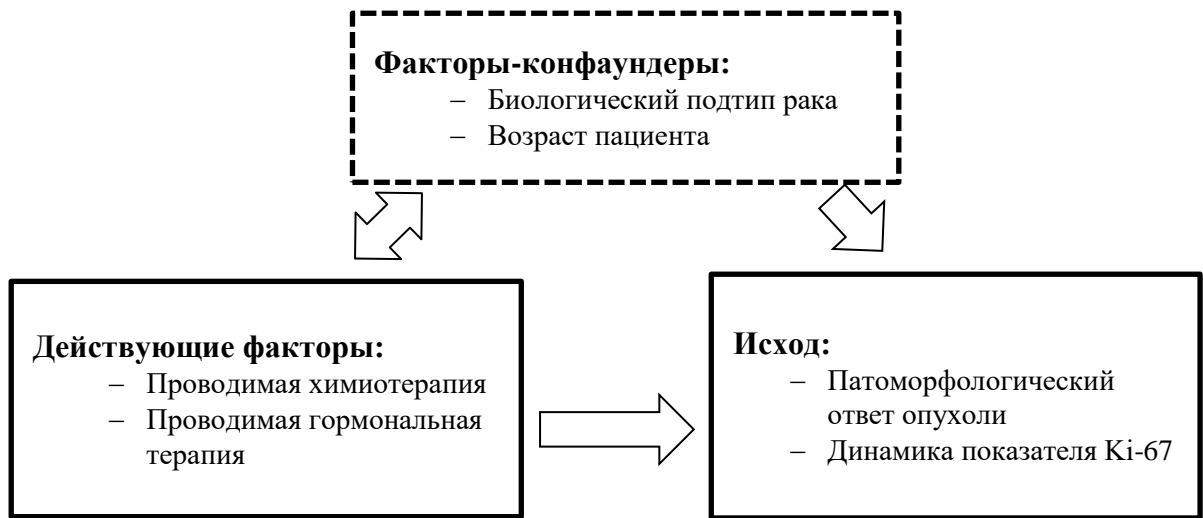


Рисунок 3 – Причинно-следственные связи между оцениваемыми исходами, изучаемыми факторами и вмешивающимися факторами (конфаундерами).

В бинарную логистическую регрессионную модель в качестве основной переменной-предиктора включался вид консервативной терапии (монотерапия или в сочетании с МЛТ или МТФ), а для повышения точности оценок в регрессионный анализ в качестве конфаундеров включались биологический подтип рака молочной железы и возраст пациентов, которые наряду с проводимой терапией потенциально оказывают существенное влияние на результаты лечения пациентов.

В бинарной логистической регрессии количественной мерой оценки влияния изучаемых предикторов на исход является отношение шансов (ОШ). В результате однофакторного регрессионного анализа (включение в модель только одного предиктора) рассчитывались нескорректированные ОШ. Скорректированные ОШ рассчитывались в результате многофакторного анализа, в котором независимые переменные-предикторы вводились в модель блоками методом форсированного ввода, что позволило не только оценить их «изолированное» влияние на переменную исхода без «наслоения» влияния других факторов, но и пошагово оценивать прирост или снижение объясняющей способности модели, что в свою очередь позволяло делать вывод о целесообразности включения в модель тех или иных переменных-предикторов.

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Экспериментальное обоснование применения мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией РМЖ

3.1.1 Опыт 1. Влияние доксорубицина в сочетании с различными способами введения мелатонина на рост перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у самок мышей SHR

Перевивка опухоли у всех мышей прошла успешно. Измерение размеров опухоли начинали с 11-го дня после перевивки опухоли. К этому сроку опухоли развились у всех животных. Подкожное введение МЛТ в дозе 10 мг/кг в вечернее время (группа № 2) на протяжении 3 недель только с 28-го дня и до конца эксперимента (39-й день) приводило к торможению роста опухоли (от 4% до 45%), однако это различие не достигало статистической достоверности по сравнению с контрольной группой мышей. В остальное время наблюдения отмечалась некоторая стимуляция роста опухоли, которая не имела статистически достоверного различия по сравнению с контролем. Индекс роста опухоли в этой группе был статистически значимо меньшим, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Аналогичные результаты были получены при изучении ведения в вечернее время на протяжении 3 недель МЛТ с питьевой водой в концентрации 10 мг/л (группа № 3). Тенденцию к торможению роста опухоли наблюдали на 25-й и 28-й день (3% и 8%, соответственно) и 35-й и 39-й день (33%). В остальные дни эксперимента у животных отмечали тенденцию к увеличению роста опухоли, что, однако, не было статистически достоверно по сравнению с контрольными мышами. Индекс роста опухоли не был статистически значимо меньше по сравнению с контролем. При однократном введении доксорубицина в дозе 5 мг/кг (группа № 4) торможение роста опухоли наблюдалось только в конце

эксперимента – 35-й и 39-й дни, причем при сравнении с контрольной группой различия были статистически достоверными ($p=0,01$) только на 39-й день – объем опухоли в этом случае был меньше контрольного на 60%. До 35-го дня в этой группе наблюдали стимуляцию роста опухоли, которая не достигала статистически значимого уровня по сравнению с контролем. Индекс роста опухоли был больше, чем в группе контроля, однако различия не были статистически достоверны. Сочетанное введение доксорубина и МЛТ (п/к 10 мг/кг, группа № 5) приводило к торможению роста опухоли на 47-62% на всем протяжении опыта при сравнении с контрольной группой мышей, причем статистически достоверными различия были на протяжении от 31-го до 39-го дня после перевивки ($p=0,003$; 0,007; 0,04). При сравнении с мышами, получавшими только доксорубин – в группе сочетанного введения доксорубина и МЛТ, наблюдали более выраженное торможение роста опухоли на протяжении всего эксперимента, при этом статистически достоверные или близкие к достоверным различия были отмечены с 25-го по 35-й день после перевивки опухоли ($p=0,01$; 0,05; 0,06; 0,07). Индекс роста опухоли составил 52,27% – статистически значимо меньше по сравнению с контролем ($p<0,001$). При введении доксорубина и МЛТ с питьевой водой (10 мг/л, группа № 6) на протяжении всего эксперимента отмечали достоверное торможение роста опухоли (за исключением 14-го дня) по сравнению с контрольными животными. Статистически достоверными различия ($p=0,004$; 0,027; 0,048) с 28-го по 39-й день – (от 51% до 68% торможения роста опухоли). По сравнению с группой мышей, получавших только доксорубин однократно, противоопухолевый эффект был более выраженным, статистически достоверные различия или близкие к достоверным различия в торможении роста опухоли отмечали с 25-го по 35-й день ($p=0,02$; 0,03; 0,05; 0,07). Индекс роста опухоли составил 49,75% – статистически значимо меньше по сравнению с контролем ($p<0,001$). Результаты опыта представлены в таблицах 14, 15 и на рисунках 4, 5.

Таблица 14 – Динамика объема опухолей у мышей с перевитой опухолью Эрлиха (см^3), подвергнутых воздействию доксорубицина и мелатонина

Воздействие	Время после перевивки опухоли, сут					
	14	21	28	31	35	39
	Объем опухоли, см^3					
Контроль	1,1±0,3	2,1±0,3	4,6±0,8	5,5±0,7	8,6±1,4	9,±1,2
МЛТ п/к	1,3±0,6	2,4±0,7	4,4±1,7	4,1±1,5	4,8±1,6	6±1,2
МЛТ внутрь	1,7±0,4	2,2±0,5	4,2±1,3	6,2±1,7	5,8±2,1	6±2
ДР	1,9±0,4	3±0,6	5,9±1,3	7,2±1,5	7,5±1,8	3,6±1,4*
ДР+МЛТ п/к	0,9±0,3	1,6±0,4	2,7±0,9	2,2±0,6*	3,3±1,1*	4,8±1,5*
ДР+МЛТ внутрь	1,3±0,5	1,5±0,6	2,1±0,8*	2,5±0,9*	2,7±1,1*	4,4±1,7*

Примечание – ДР – доксорубицин; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

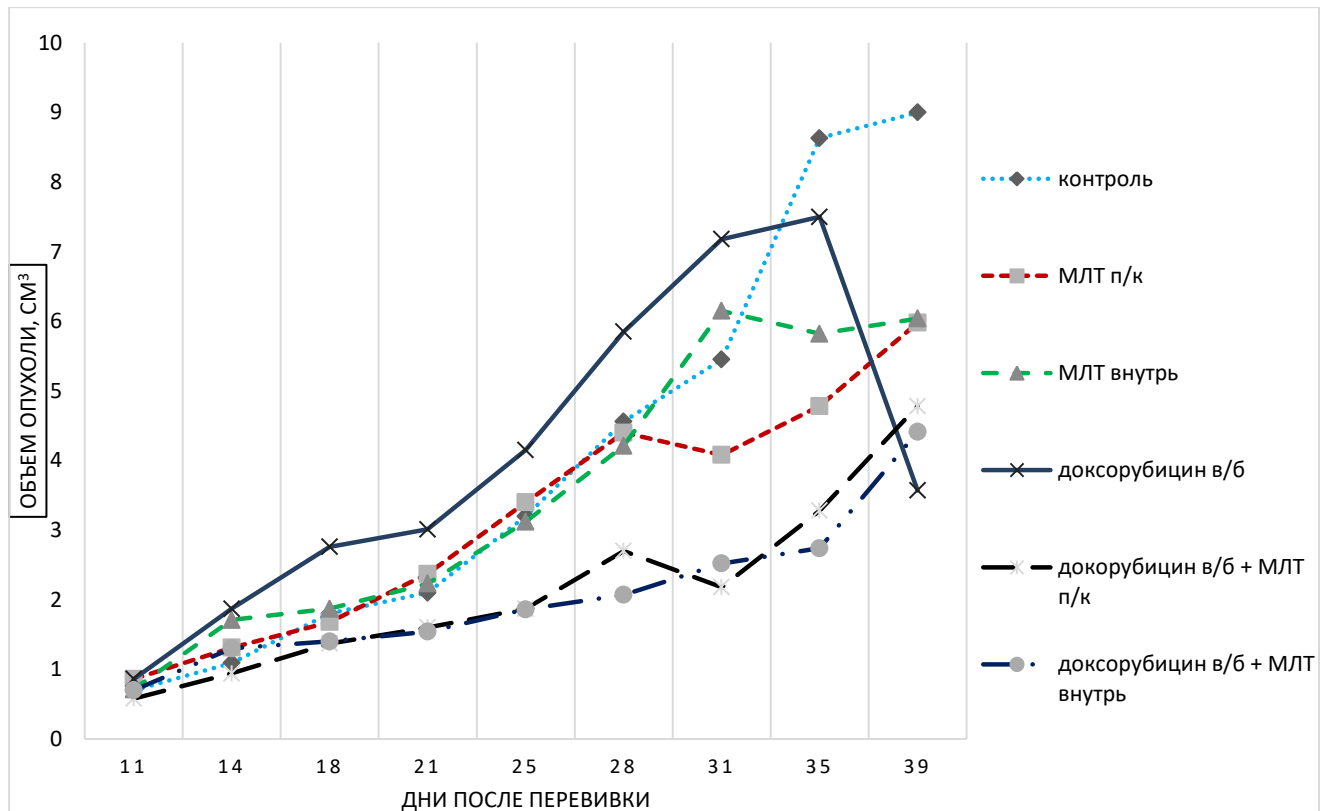
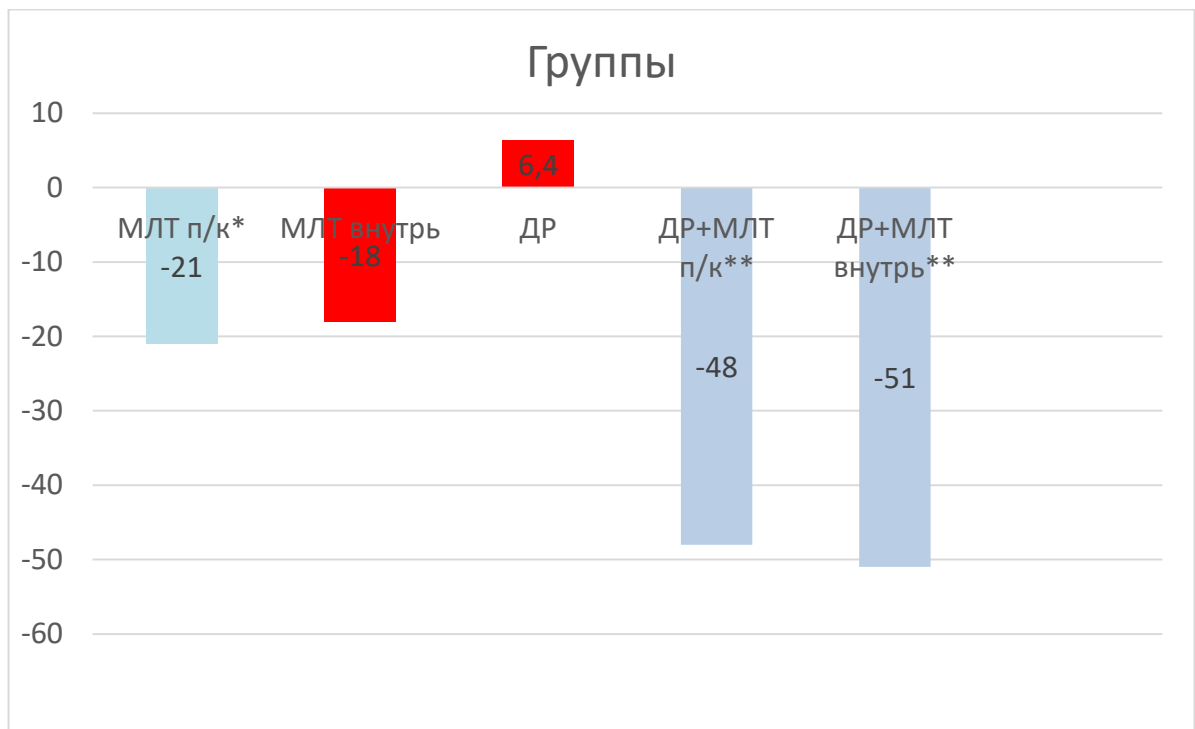


Рисунок 4 – Динамика уменьшения объема опухоли в см^3 у мышей с перевитой опухолью Эрлиха при воздействии доксорубицина и МЛТ.

Таблица 15 – Индекс роста опухоли в группах мышей, %

Воздействие	Площадь под кинетической кривой роста опухоли, см ³	T, % – индекс роста опухоли по сравнению с контролем
Контроль	114,9±18,9	–
МЛТ п/к	90,5±26,2	78,7%*
МЛТ внутрь	101,2±30,0	88,0%
ДР	122,4±28,8	106,4%
ДР +МЛТ п/к	60,1±18,6	52,3%**
ДР + МЛТ внутрь	57,2±22,6	49,8%**

Примечание – ДР – доксорубицин; *– p<0,05; ** p<0,001 (по сравнению с контролем).



Контроль обозначен за 0.

Рисунок 5 – Индекс роста опухоли у мышей по сравнению с контролем, %.

Таким образом, в эксперименте было показано усиление противоопухолевого эффекта доксорубицина при добавлении МЛТ как в подкожных инъекциях, так и с питьевой водой.

3.1.2 Опыт 2. Влияние паклитаксела в сочетании с мелатонином и метформинном на рост перевиваемой опухоли молочной железы HER2 у самок мышей линии FBV/N

Перевивка опухоли у всех мышей прошла успешно. Измерение размеров опухоли начинали с 10-го дня после перевивки опухоли, когда с надежностью можно было убедиться в развитии опухолевых узелков на месте перевивки. К этому сроку опухоли развились у всех животных. Введение МЛТ с питьевой водой (группа № 2) приводило к торможению роста опухоли по сравнению с контрольной группой только на 10-й день после перевивки опухоли ($p=0,1$). Начиная с 20-го дня после перевивки опухоли ($p=0,5$), отмечается стимуляция роста опухоли. Однако, данные показатели не являются статистически достоверными. При введении МТФ (группа № 3) с питьевой водой наблюдалась тенденция к торможению роста опухоли на 10-й ($p=0,03$) и 38-й ($p=0,03$) дни после перевивки опухоли по сравнению с контрольной группой. В остальные дни также имело место торможение опухолевого роста, однако, оно не было статистически достоверным. Индекс роста опухоли был на 32,6% меньше по сравнению с контролем, что является статистически достоверным ($p<0,05$). Внутривентральное введение мышам паклитаксела (группа № 4) приводило к торможению роста опухоли на 35-й ($p=0,04$) день ППО на 32% по сравнению с контрольной группой. В остальное время наблюдалась стимуляция роста опухоли, которая не имела статистически достоверного различия по сравнению с контрольной группой. Индекс роста опухоли был на 34,9% меньшим по сравнению с контролем, что является статистически достоверным ($p<0,05$). При введении паклитаксела и мелатонина (группа № 5) наблюдалось торможение роста опухоли на всём протяжении опыта по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что статистически достоверные показатели определялись на 14-й ($p=0,04$), 20-й ($p=0,04$), 28-й ($p=0,02$) и 35-й ($p=0,002$) дни после перевивки опухоли (53-72%). По сравнению с гр. 2 было выявлено торможение роста опухоли, начиная с 17-го ($p=0,02$) по 35-й ($p=0,01$) дни после перевивки опухоли, средний объем опухоли

уменьшился на 57-72%. Комбинация паклитаксела и МЛТ усиливала торможение роста опухоли на 28-й день ($p=0,05$) на 63% по сравнению с группой №4. Индекс роста опухоли был на 55,3% меньше по сравнению с контролем, что является статистически достоверным ($p<0,001$). Комбинация введения паклитаксела и МТФ (группа № 6) приводила к торможению роста опухоли на 38-й ($p=0,03$) день после перевивки опухоли на 47% по сравнению с контрольной группой. При сравнении с группой животных, получавших паклитаксел и МТФ (группа № 6), не было отмечено статистически достоверного торможения роста опухоли. Индекс роста опухоли был на 39% меньше по сравнению с контролем, что является статистически достоверным ($p<0,001$). Комбинация ПКЛ, МЛТ и МТФ (группа № 7) по сравнению с контрольной группой угнетала рост опухоли на 14-й ($p=0,04$), 31-й ($p=0,03$) и 35-й ($p=0,05$) день после перевивки опухоли на 74%, 48% и 38% соответственно. По сравнению с группой № 2, наблюдалось достоверное торможения роста опухоли на 20-й ($p=0,01$) и 24-й ($p=0,01$) день на 49% и 42% соответственно. Индекс роста опухоли был на 44,3% меньше по сравнению с контролем, что является статистически достоверным ($p<0,001$). Результаты опыта представлены в таблицах 16, 17 и на рисунках 6, 7.

Таблица 16 – Динамика объема опухолей у мышей FBV/N с перевитой опухолью HER2 (см³), подвергнутых воздействию паклитаксела, МТФ и МЛТ

Группа	Время после перевивки опухоли, сут					
	14	20	28	31	35	39
	Объем опухоли, см ³					
Контроль	2,±0,6	3,7±0,9	9,8±2,2	12,6±2,2	13,5±1,4	17,4±2,4
МЛТ	1,7±0,6	4,4±0,7	10,3±1,6	11,9±2,4	15,1±2,5	14,6±1,2
МТФ	0,6±0,1	2,78±0,8	7,6±1,8	9±2,1	10,8±2,1	10,3±1,7*
ПКЛ	0,6±0,2	2,1±0,7	6,4±2,2	9,6±1,3	9,2±1,9*	12,7±2,6
ПКЛ+МЛТ	0,6±0,1*	1,5±0,3*	3,6±0,7*	6,4±1,3*	6,4±1,3*	8,7±1,6
ПКЛ+МТФ	0,5±0,1	1,7±0,3	6,3±1	7,8±1,2	10,1±2,1	9,3±2,4*
ПКЛ+МЛТ+ МТФ	0,5±0,1	1,9±0,5	5,91±1	6,5±1,3*	8,4±1,8*	11,5±2,5
Примечание – ПКЛ – паклитаксел; * $p<0,05$.						

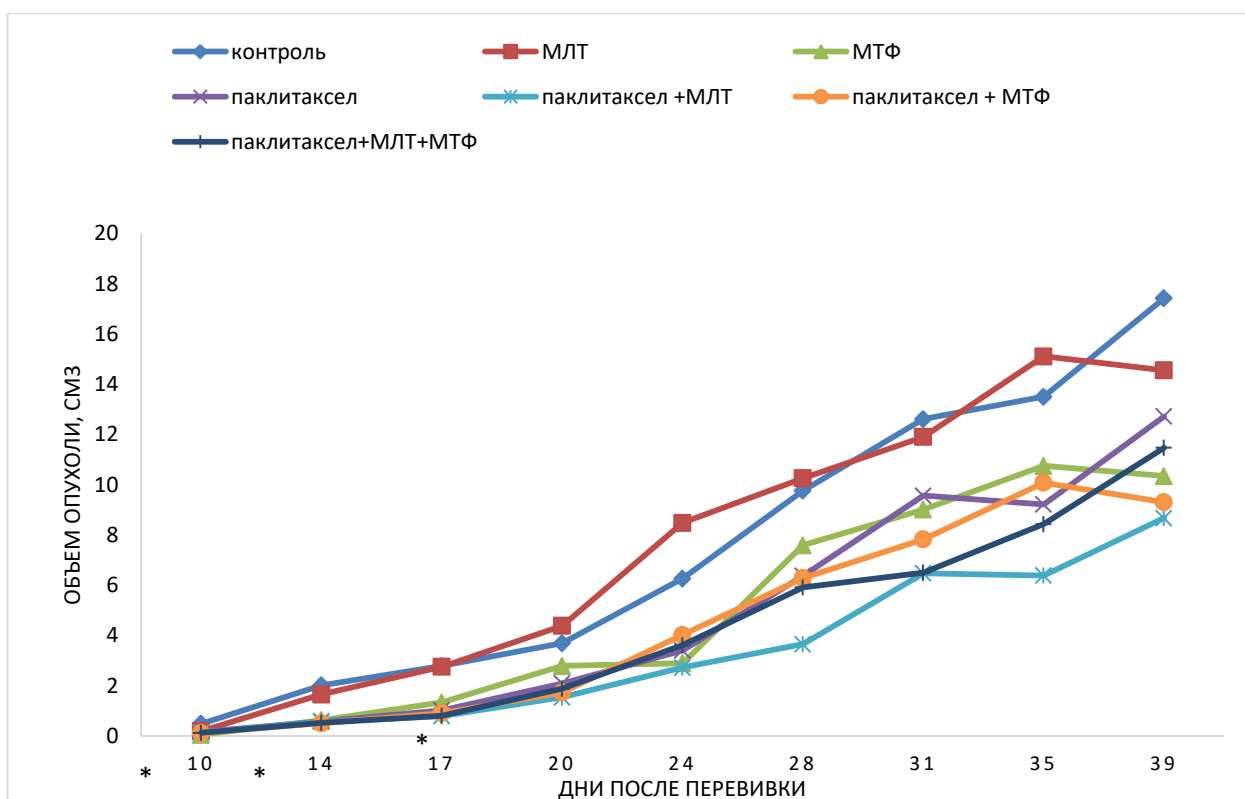
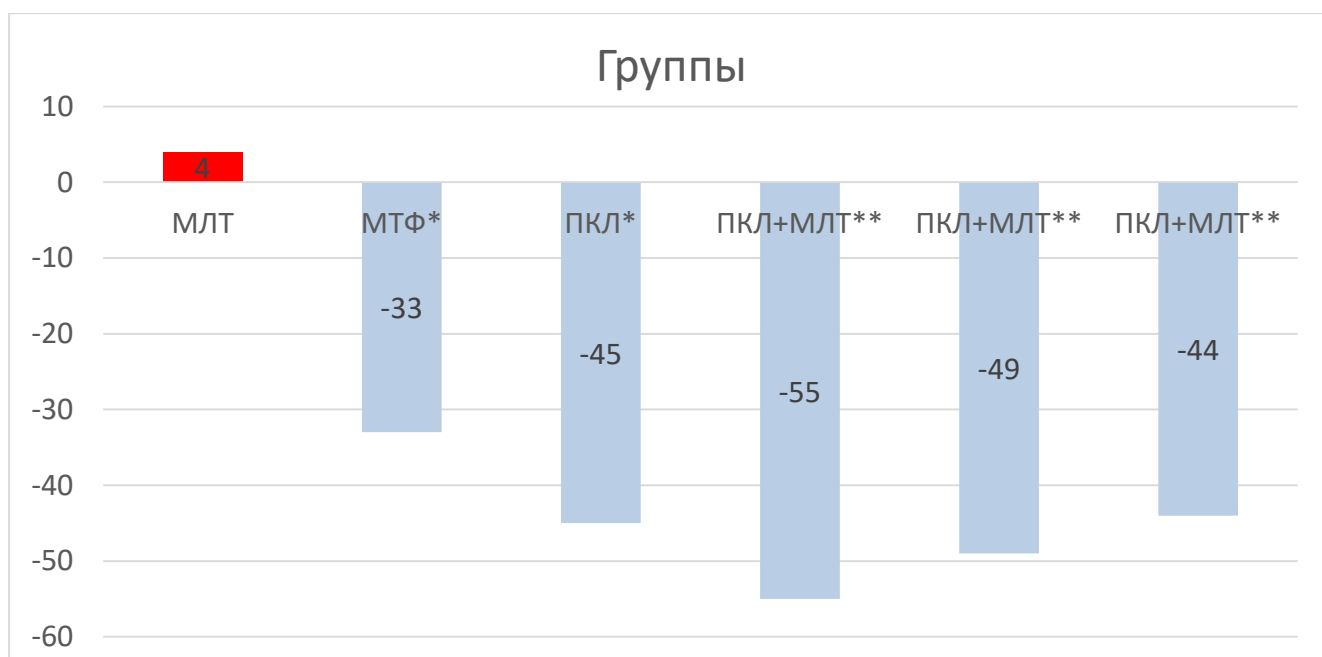


Рисунок 6 – Динамика изменения объема опухоли в см³ у мышей с перевитой HER2-положительной опухолью при воздействии паклитаксела, метформина и мелатонина.

Таблица 17 – индекс роста опухоли у мышей по группам, %

Группы	Площадь под кинетической кривой роста опухоли, мм ³	Индекс роста опухоли, %
Контроль	221,4±33,3	—
Мелатонин	230,7±38,1	104,0%
Метформин	149,3±32,6	67,4%*
Паклитаксел	144,3±33,9	65,1%*
Паклитаксел + мелатонин	99,1±17,4	44,7%**
Паклитаксел + метформин	135,2±18,7	61,0%**
Паклитаксел + метформин + мелатонин	125,6±27,7	56,7%**

Примечание – * – p<0,05; ** – p<0,001.



Контроль обозначен за 0.

Рисунок 7 – Индекс роста опухоли у мышей по сравнению с контролем, %.

Результаты исследования влияния препаратов на продолжительность жизни мышей-самок HER2 с перевиваемой опухолью молочной железы представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Продолжительность жизни мышей SBV/N с перевитой HER-2 положительной опухолью при воздействии паклитаксела, метформина и мелатонина

Группы	СПЖ, дни	УПЖ, %
Контроль	42,4±4,71	0,0%
Мелатонин	44,7±3,7	5,3%
Метформин	48,9±4,78	15,2%
Паклитаксел	55,6±5,44	31,0%
Паклитаксел+мелатонин	57,5±5,15	35,5%*
Паклитаксел+метформин	48,3±4,72	13,8%
Паклитаксел+мелатонин+метформин	43,4±2,33	2,3%

Примечание – * – $p < 0,05$; СПЖ – средняя продолжительность жизни, УПЖ – увеличение продолжительности жизни

Как видно из таблицы, статистически значимое увеличение продолжительности жизни проявляется при введении паклитаксела в комбинации с МЛТ (35,5%).

3.1.3 Опыт 3. Изучение действия торемифена и метформина у трансгенных мышей FBV/N с HER2-положительным РМЖ

Наблюдения показали, что МТФ в монотерапии и торемифен в монотерапии оказывали тормозящий эффект на рост опухоли, однако, статистически значимые различия по сравнению с контролем были отмечены лишь в начале опыта. Добавление же МТФ к торемифену способствовало усилению противоопухолевого действия и привело к статистически значимому торможению роста опухоли на протяжении всего эксперимента, а также к снижению ИРО.

На рисунке 8 показано торможение роста опухоли по группам в зависимости от дня эксперимента. Индекс роста опухоли на фоне терапии торемифеном и метформином представлен в таблице 19 и на рисунке 9.

Таблица 19 – Влияние торемифена и метформина на площади под кинетической кривой роста опухоли (S) и индексы роста опухоли (ИРО) у мышей FBV/N с трансплантированным внутримышечно HER2-положительным раком молочной железы

Группа	Число мышей	S	ИРО, %	p
I. Контроль	12	3932 \pm 896	100%	–
II. Торемифен (30 мг/кг)	10	2388 \pm 1046	59%	>0,05(I)
III. Метформин (100 мг/кг)	10	2612 \pm 570	66%	>0,05(I)
IV. Торемифен (30 мг/кг) + метформин (100 мг/кг)	10	1268 \pm 292	32%	<0,05(I)
Примечание – (I) – p к I группе.				

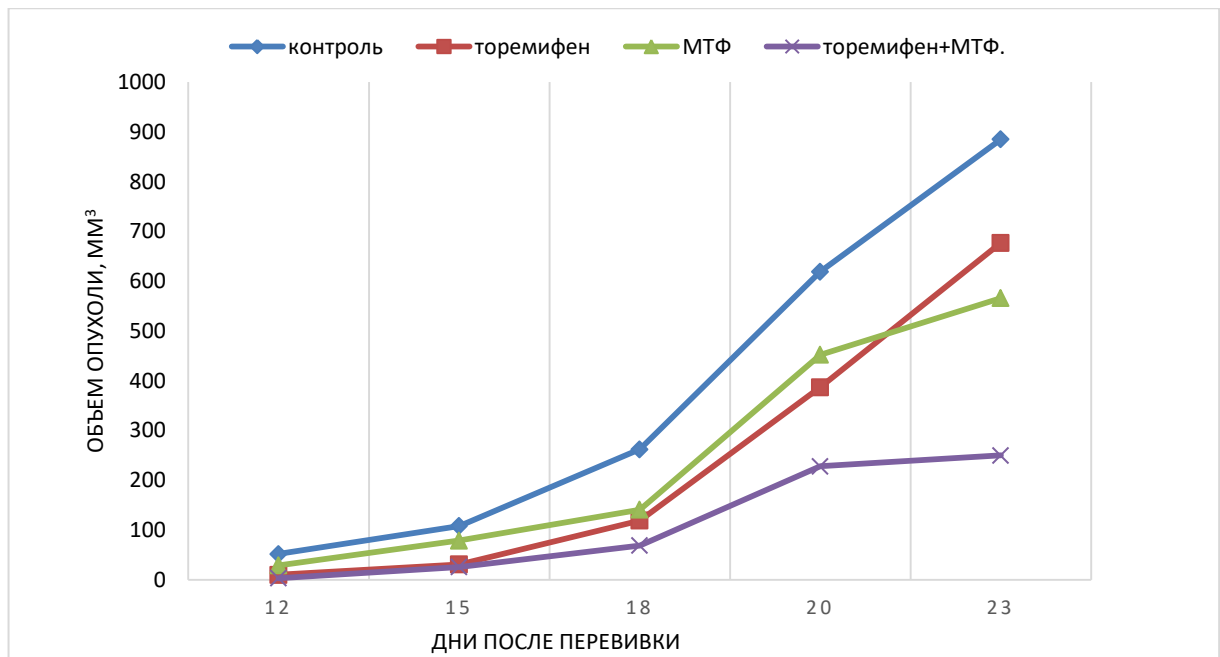
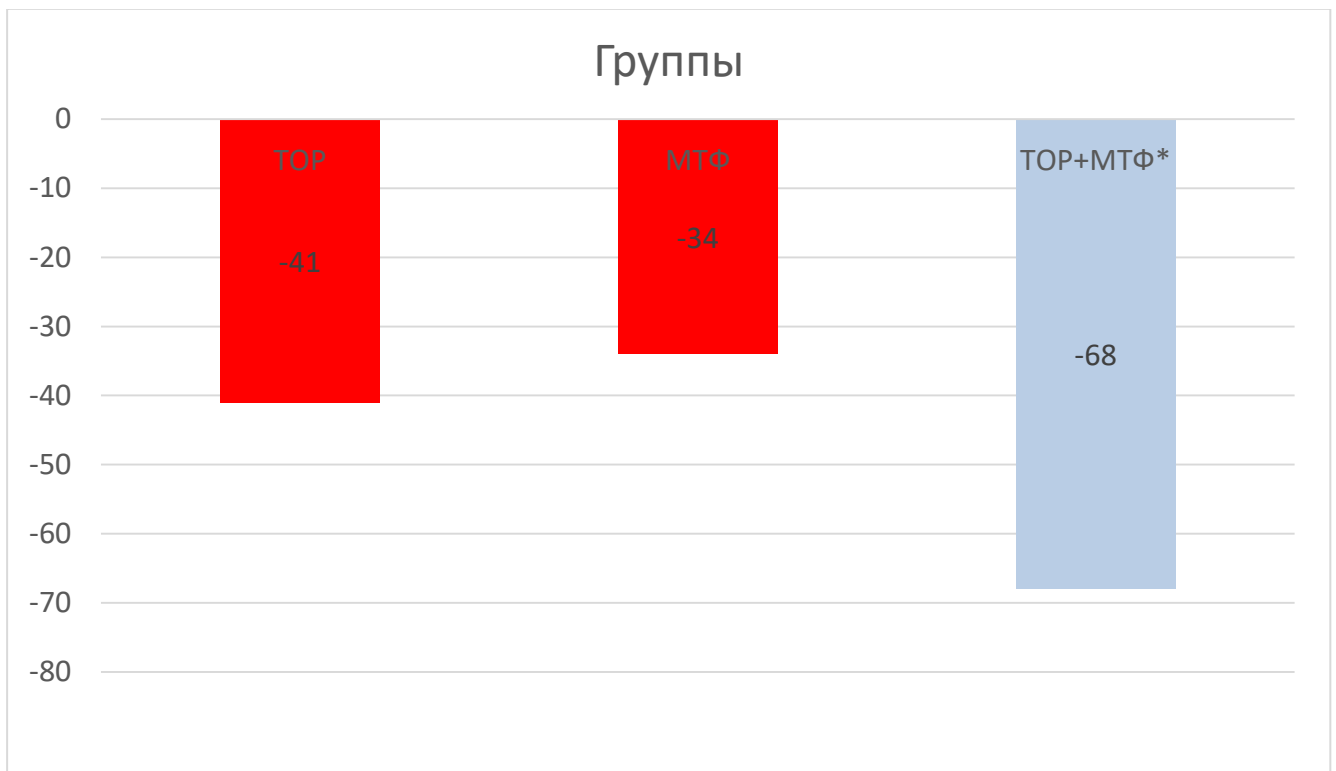


Рисунок 8 – Динамика изменения объема опухолей у мышей FBV/N с перевитой опухолью HER-2/neu (мм³), подвергнутых воздействию торемифена и МФТ.



Контроль обозначен за 0.

Рисунок 9 – Индекс роста опухоли у мышей по сравнению с контролем, %.

3.1.4 Опыт 4. Влияние метформина на острую токсичность доксорубицина и паклитаксела у мышей – самцов линии SHR

Ни по продолжительности жизни, ни по снижению массы тела между группами животных, получивших цитостатики в монорежиме или в комбинации с МТФ, не было получено статистически значимых различий. В группе № 1 погибли 6 животных, снижение массы тела от исходного на 5 день эксперимента составило 13,4%, в группе № 2 погибли 8 животных, снижение массы тела 21,2%. В группах 3 и 4 пало по одному животному, а снижение массы тела составило 4,1% и 2,3% соответственно. В группах № 5 и № 6 погибло по 9 мышей, снижение массы тела составило 21% и 23,8%. Статистически достоверных различий в уровне глюкозы между контрольными животными, мышами, получавшими доксорубицин, метформин и их комбинацию, установлено не было. В таблицах 20-22 представлены данные по изменению веса мышей и летальности в зависимости от группы, а также уровни гликемии у мышей, получавших цитостатики в монорежиме и в комбинации с метформином.

Таблица 20 – Влияние метформина на выживаемость мышей-самцов, получивших токсические дозы доксорубицина и паклитаксела

Группа	Число мышей		Летальность, %	р к I гр.
	Всего	Пали		
ДР 15 мг/кг	10	6	60±4,9%	р>0,1
ДР 15 мг/кг + МТФ 100 мг/кг	10	8	80±4,0%	
ПКЛ 30 мг/кг	10	1	10±9,5%	р>0,1
ПКЛ 30 мг/кг + МТФ 100 мг/кг	10	1	10±9,5%	

Таблица 21 – Влияние метформина на изменение массы тела мышей-самцов, получивших токсические дозы доксорубина и паклитаксела

Группа	Число мышей	Масса тела, г		Масса тела в % к исходному, р к I гр.
		0 день	5 день	
ДР 15 мг/кг	10	26,2±0,27	22,7±0,50	86,6±45,02%
ДР15 мг/кг + МТФ 100 мг/кг	10	26,9±0,19	21,0±0,57	78,8±40,87% p>0,1
ПКЛ 30 мг/кг	10	29,5±0,22	28,3±0,22	95,9±19,82%
ПКЛ30 мг/кг + МТФ 100 мг/кг	10	30,7±0,23	30,0±0,25	97,7±14,99%; p>0,1

Таблица 22 – Влияние метформина и доксорубина на уровень глюкозы в крови у мышей

Группа	Число мышей	Уровень глюкозы	% к контролю
Контроль	3	7,4±0,02	100%
ДР 15 мг/кг	3	6,6±0,2	89%; p=0,2215 (I)
МТФ 100 мг/кг	3	7,9±0,3	107%; p=0,5658(I) p=0,2088 (II)
ДР 15 мг/кг + МТФ 100 мг/кг	3	5,9±0,4	80%; p=0,0942(I) p=0,3773(II) p=0,0900 (III)
Примечание – (I) – р к I группе; (II) – ко II группе; (III) – р к III группе.			

В данном опыте было показано, что МТФ не усиливает токсичность доксорубина и паклитаксела а также, что не менее важно, не влияет на уровень гликемии при его совместном применении с цитостатиками.

3.2 Клиническое обоснование применения мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией больных РМЖ

3.2.1 Влияние мелатонина и метформина на эффективность неoadъювантной химиотерапии больных РМЖ

Для оценки эффективности неoadъювантной химиотерапии и ее применения в сочетании с МЛТ и МТФ использовался показатель полного патоморфологического ответа, который был включен в бинарный логистический регрессионный анализ в качестве зависимой переменной. Результаты бинарного регрессионного анализа, в котором в качестве ожидаемого благоприятного исхода лечения рассматривалось достижение полного патоморфологического ответа, представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Оценка эффективности химиотерапии по результатам однофакторного и многофакторного бинарного регрессионного анализа (критерий эффективности – полный патоморфологический ответ)

Показатель	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ*		
	ОШ _{нескорр.}	95% ДИ	p	ОШ _{скорр.}	95% ДИ	p
Терапия						
Только химиотерапия	Референтная группа					
Химиотерапия + мелатонин	0,529	0,108-2,598	0,433	0,482	0,083-2,792	0,416
Химиотерапия + метформин	0,583	0,097-3,720	0,600	0,602	0,085-4,284	0,612
Биологический тип рака молочной железы						
Люминальный А и люминальный В	Референтная группа					
HER2	4,833	1,112-21,014	0,036	5,318	1,118-25,290	0,036
Трижды негативный	0	0	0,999	0	0	0,999
Примечание – * – в модель были включены следующие предикторы: вариант проведения химиотерапии, биологический подтип опухоли, возраст пациента.						

У пациентов, получавших химиотерапию, дополнение терапии МЛТ или МТФ не влияло на достижение полного патоморфологического ответа, в то время как определяющим фактором, влияющих на исход, было наличие HER2-положительного биологического подтипа, при котором шансы достижения pCR были в 5,3 раза ожидаемо больше (95% ДИ 1,1-25,3) по сравнению с А и В подтипами люминального рака. Частота достижения pCR в группах химиотерапии, химиотерапии в сочетании с мелатонином и химиотерапии с метформином была 25%, 14,2% и 16,6% соответственно.

Так как достижение pCR наблюдалось всего у 10 (18,9%) пациентов, переменная исхода была дополнена также достижением патоморфологического ответа IV степени, и в качестве благоприятного исхода химиотерапии был также использован патоморфологический ответ IV+V степени. Как и в предыдущем случае, когда благоприятным исходом был выбрано достижение pCR, в данном случае наблюдались те же тенденции. В результате многофакторного анализа было установлено, что дополнение химиотерапии МЛТ или МТФ не влияет на достижение патоморфологического ответа IV + V степеней, и данный результат определяется биологическим подтипом опухоли: ОШ для достижения патоморфологического ответа IV + V степеней было равным 6,5 (95% ДИ 1,54-27,3) для HER2 подтипа рака по сравнению с люминальным А и В подтипами рака. Частота достижения pCR 4+5 степени в группах химиотерапии, химиотерапии в сочетании с мелатонином и химиотерапии с метформином была 35%, 23,8% и 33,3% соответственно.

Результаты бинарного регрессионного анализа при данном определении благоприятного исхода представлены в таблице 24.

Объективный клинический ответ оценивался по критериям RECIST 1.1. Частота достижения объективного клинического ответа в данных группах различалась незначительно, что не позволяет сделать вывод о присутствии различий между группами (85% для группы химиотерапии, 86% для группы химиотерапии в сочетании с МЛТ, 75 % для группы химиотерапии с МТФ).

Таблица 24 – Оценка эффективности химиотерапии по результатам однофакторного и многофакторного бинарного регрессионного анализа (критерий эффективности – достижение патоморфологического ответа IV+V степеней)

Показатель	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ*		
	ОШ _{нескорр.}	95% ДИ	p	ОШ _{скорр.}	95% ДИ	p
Терапия						
Только химиотерапия	Референтная группа					
Химиотерапия + мелатонин	0,619	0,158-2,429	0,492	0,545	0,112-2,653	0,452
Химиотерапия + метформин	0,929	0,205-4,210	0,923	0,981	0,180-5,342	0,983
Биологический подтип рака молочной железы						
Люминальный А и люминальный В	Референтная группа					
HER2	5,571	1,476-21,024	0,011	6,486	1,544-27,254	0,011
Трижды негативный	0	0	0,999	0	0	0,999
Примечание – * – в модель были включены следующие предикторы: вариант проведения химиотерапии, биологический подтип опухоли, возраст пациента.						

При расчете коэффициента корреляции Спирмена также не было выявлено связи между ИМТ и степенью объективного ответа на терапию ($p=0,443$ для химиотерапии, $p=0,476$ для группы химиотерапии +МЛТ, $p=0,207$ для группы химиотерапии + МТФ)

В таблице 25 представлены, суммированы результаты оценки эффективности терапии в группах лечения.

Таким образом, было показано, что при добавлении к стандартной антрациклин- и таксансодержащей химиотерапии МЛТ или МТФ не приводит к увеличению частоты достижения патоморфологического ответа IV+V степеней и не увеличивает частоту объективных ответов на лечение. Наилучший ответ на лечение наблюдался у пациенток с HER2 – положительным подтипом РМЖ.

Таблица 25 – Оценка эффективности химиотерапии (достижение патоморфологического ответа 5 и 4+5 степени, объективный ответ) в зависимости от группы

Критерии эффективности	Общая группа n=53		«Химиотерапия» n=20		«Химиотерапия +МЛТ» n=21		«Химиотерапия+ МТФ» n=12	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Объективный ответ	44	83	17	85	18	85,7	9	75
Стабилизация	9	17	3	15	3	14,3	3	25
pCR 5	10	18,8	5	25	3	14,2	2	16,6
	НП		Референтная группа		ОШ 0,482, 95% ДИ 0,083-2,792, p=0,416		ОШ 0,602, 95% ДИ 0,085-4,284, p=0,612	
pCR 4+5	16	30,1	7	35	5	23,8	4	33,3
	НП		Референтная группа		ОШ 0,545, 95% ДИ 0,112-2,653, p=0,452		ОШ 0,981, 95% ДИ 0,180-5,342, p=0,983	

3.2.2 Влияние мелатонина и метформина на эффективность неoadъювантной гормонотерапии больных РМЖ

В отношении гормональной терапии показателем эффективности лечения являлось снижение индекса Ki-67. Так как группа пациентов, получавших в неoadъювантном режиме гормональную терапию, была гомогенной в отношении биологического подтипа опухоли (в 100 % случаев у пациентов были выявлены люминальный А и люминальный В подтипы ЭР+ РМЖ), в многомерный анализ был включен только возраст пациентов.

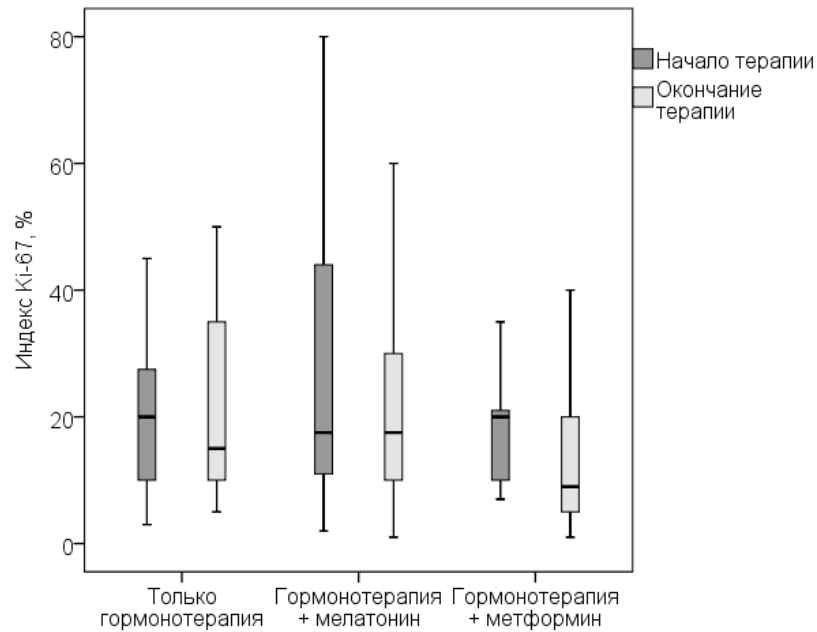
В однофакторной модели данные 3 варианта гормональной терапии не продемонстрировали статистически значимого влияния на снижение индекса Ki-67, но корректировка модели после включения в нее возраста пациентов выявила статистически значимое влияние на снижение индекса Ki-67 гормональной терапии в сочетании с МТФ. При использовании данного варианта неoadьювантной терапии шансы благоприятного исхода (снижения индекса Ki-67) были в 4,2 раза выше (95% ДИ 1,04-17,1) по сравнению с использованием только гормонотерапии. При этом целесообразность включения в модель в качестве переменной-предиктора возраста пациента была подтверждена повышением объясняющей способности модели ($R^2=0,109$ для 1-го предиктора, $R^2=0,130$ для 2-х предикторов).

Таким образом, в результате проведения многомерного анализа было выявлено, что дополнение гормональной терапии МТФ оказывает статистически значимое благоприятное влияние на динамику индекса Ki-67.

Результаты бинарного логистического регрессионного анализа для оценки эффективности гормональной терапии представлены в таблице 26. Медиана индекса Ki-67 по группам до и после лечения изображена на рисунке 10.

Таблица 26 – Оценка эффективности гормональной терапии по результатам однофакторного и многофакторного бинарного регрессионного анализа (критерий эффективности – положительная динамика индекса пролиферации опухоли Ki-67)

Показатель	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ*		
	ОШ _{нескорр.}	95% ДИ	p	ОШ _{скорр.}	95% ДИ	p
Терапия						
Гормонотерапия	Референтная группа					
Гормонотерапия + мелатонин	3,025	0,749-12,210	0,120	3,137	0,763-12,892	0,113
Гормонотерапия + метформин	3,850	0,980-15,124	0,053	4,230	1,044-17,139	0,043
Примечание – * – в модель были включены следующие предикторы: вариант проведения гормонотерапии, возраст пациента.						



Медиана, первый и третий квартили:

- в группе «торемифена» до 20,0% (10,0; 30,0) / после 15,0% (10,0; 36,5);
- в группе «торемифен+МЛТ» до 17,5% (10,5; 47,0) / после 17,5% (8,7; 35,0);
- в группе «торемифен + МТФ» до 20,0% (10,0; 22,0) / после 9,0% (5,0; 20,0).

Рисунок 10 – Квартильные диаграммы (медиана, первый и третий квартили) динамики индекса Ki-67 в группах больных местно-распространенным ЭР+РМЖ до начала и после окончания неoadьювантной гормонотерапии.

В качестве дополнительного критерия оценивалось достижение объективного ответа на терапию. Между тремя рассматриваемыми группами были выявлены статистически значимые различия ($p=0,006$). Попарное сравнение групп пациентов, получавших в дополнение к гормонотерапии МЛТ и МТФ с группой пациентов, получавших только гормонотерапию, выявило статистически значимое влияние использования МЛТ на объективный ответ ($\chi^2=10,32$, $p<0,001$), в то время как использование метформина не влияло на частоту объективного ответа ($\chi^2=1,30$, $p=0,254$). Число объективных ответов в группе гормонотерапии составило 31,6%, в группе гормонотерапии с МЛТ 86,7%, в группе гормонотерапии с МТФ – 47,3%. Частота органосохранных операций в группах была сопоставима: 10,5%, 12,5% и 15,7% соответственно. В таблице 27 представлены данные по частоте объективного ответа в группах гормонотерапии и динамики индекса Ki-67.

Таким образом, использование МТФ совместно с гормонотерапией привело к статистически значимому снижению индекса Ki-67, а дополнение гормонотерапии МЛТ позволило статистически значимо повысить частоту объективного ответа на неoadьювантное лечение.

Таблица 27 – Эффективность неoadьювантной гормонотерапии торемифеном в исследуемых группах больных местно-распространенным ЭР+РМЖ

Критерии эффективности	Общая группа n=54		«Торемифен» n=19		«Торемифен+МЛТ» n=16		«Торемифен+МТФ» n=19	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Объективный ответ	28	51,8	6	31,6	13	86,7*	9	47,3**
Полный регресс	1	1,7	0	0	0	0	1	5,2
Частичный регресс	28	51,7	6	31,6	13	86,7	9	47,3
Стабилизация	25	46,6	13	68,4	3	13,3	9	47,3
Снижение индекса пролиферации Ki-67	31	57	8	42	9	56	14	74
Медиана индекса Ki-67 до/после, %	19,1/17,5		20/15		17,5/17,5		20/9	
Динамика изменения индекса пролиферации Ki-67 по результатам многофакторного анализа***	НП		Референтная группа		ОШ 3,137 95% ДИ 0,763-12,892 p=0,113		ОШ 4,230 95% ДИ 1,044-17,139 p=0,043	
Примечания – НП – не применимо; * – $\chi^2 = 10,32$, $p < 0,001$; ** – $\chi^2 = 1,30$, $p = 0,254$; *** – в модель были включены следующие предикторы: вариант проведения гормонотерапии, возраст пациента.								

3.2.3 Влияние мелатонина и метформина на качество жизни больных РМЖ на фоне неoadьювантного лечения

Качество жизни пациентов оценивалось на основании данных опросника EORTC QLQ C30. Динамика показателей качества жизни в группе пациентов, получавших химиотерапию, представлена в таблице 28.

Таблица 28 – Оценка динамики показателей качества жизни в выборке пациентов, получавших химиотерапию

Шкала	Момент наблюдения	Медиана показателя качества жизни, баллы			p**
		Только химиотерапия	Химиотерапия + мелатонин	Химиотерапия + метформин	
QL	Начало	10,0	8,0	11,5	0,964
	Окончание	8,0	8,0	10,0	
	p*	0,150	0,112	0,506	
PF	Начало	6,0	8,0	7,0	0,735
	Окончание	7,0	8,0	6,5	
	p*	0,659	0,951	0,835	
RF	Начало	2,0	3,0	2,0	0,025
	Окончание	4,0	3,0	2,0	
	p*	0,008	0,492	0,480	
EF	Начало	6,0	8,0	7,5	0,509
	Окончание	6,5	8,0	6,0	
	p*	0,775	0,086	0,350	
CF	Начало	3,0	3,0	3,0	0,414
	Окончание	2,5	3,0	2,0	
	p*	0,581	1,000	0,722	
SF	Начало	2,0	3,0	2,5	0,111
	Окончание	3,0	3,0	2,0	
	p*	0,038	1,000	0,831	
FA	Начало	4,5	6,0	5,0	0,011
	Окончание	6,0	6,0	5,0	
	p*	0,001	0,590	0,161	
NV	Начало	2,0	2,0	2,0	0,210
	Окончание	3,0	2,0	2,5	
	p*	0,004	0,103	0,048	
PA	Начало	2,0	3,0	2,0	0,095
	Окончание	2,0	3,0	2,0	
	p*	0,201	0,233	0,102	
DY	Начало	1,0	1,0	1,0	0,381
	Окончание	1,0	1,0	1,0	
	p*	0,735	0,512	0,046	
SL	Начало	1,5	2,0	2,0	0,037
	Окончание	2,0	1,0	1,5	
	p*	0,101	0,041	0,317	

Продолжение таблицы 28

Шкала	Момент наблюдения	Медиана показателя качества жизни, баллы			p**
		Только химиотерапия	Химиотерапия + мелатонин	Химиотерапия + метформин	
AP	Начало	1,0	1,0	1,0	0,255
	Окончание	2,0	2,0	2,0	
	p*	0,023	0,477	0,102	
CO	Начало	1,0	1,0	1,0	0,239
	Окончание	1,0	2,0	1,5	
	p*	0,021	0,414	0,046	
DI	Начало	1,0	1,0	1,0	0,959
	Окончание	1,0	1,0	1,0	
	p*	0,157	0,234	0,317	
FI	Начало	2,0	2,0	2,0	0,184
	Окончание	2,0	2,0	2,0	
	p*	0,368	0,518	0,248	
Примечание – * – статистическая значимость для парного критерия Вилкоксона (сравнение значений показателей до и после неoadьюватной терапии); ** – статистическая значимость для критерия Краскела-Уоллиса (сравнение динамики показателя в трех группах).					

Следует отметить, что по всем шкалам опросника EORTC QLQ C30 высокие значения показателей соответствовали низкому качеству жизни, за исключением шкалы QL, высокие показатели которой, напротив, соответствовали высокому качеству жизни.

Различия в динамике значений по шкалам между 3-мя исследуемыми группами были выявлены в отношении шкал RF (шкала нарушения сна), FA (шкала утомляемости) и SL (шкала ролевого функционирования). Парные сравнения групп пациентов продемонстрировали, что в группе пациентов, получавших химиотерапию с МЛТ, в отличие от группы пациентов, получавших только химиотерапию, показатели по шкалам RF, FA и SL не снижались ($p=0,008$, $p=0,004$, $p=0,014$ соответственно). При этом динамика показателей по данным 3-ем шкалам RF, FA и SL в группе пациентов, получавших химиотерапию с МТФ не отличалась от таковой в группе пациентов, получавших только химиотерапию ($p=0,195$, $p=0,070$, $p=0,146$ соответственно).

Таким образом, использование МЛТ и МТФ в дополнение к химиотерапии позволило предупредить снижение показателей качества жизни, при этом статистически значимое влияние оказал прием МЛТ, позволивший не допустить снижения показателей по шкалам нарушения сна, утомляемости и ролевого функционирования.

В выборке пациентов, получавших гормонотерапию, статистически значимых различий в динамике показателей качества жизни выявлено не было. При этом, в отличие от пациентов, получавших химиотерапию, в выборке пациентов, получавших гормонотерапию, после курса лечения снижения качества жизни отмечено не было. Данный факт может быть объяснен закономерно худшей переносимостью химиотерапии по сравнению с гормонотерапией.

Динамика показателей качества жизни в группе пациентов, получавших гормонотерапию, представлена в таблице 29.

Таблица 29 – Оценка динамики показателей качества жизни в выборке пациентов, получавших гормонотерапию

Шкала	Момент наблюдения	Медиана показателя качества жизни, баллы			p**
		Только гормонотерапия	Гормонотерапия + мелатонин	Гормонотерапия + метформин	
QL	Начало	9,0	9,0	9,0	0,838
	Окончание	10,0	10,0	9,0	
	p*	0,501	0,451	0,638	
PF	Начало	7,0	7,0	8,0	0,525
	Окончание	7,0	7,0	8,0	
	p*	0,622	0,085	0,972	
RF	Начало	2,0	2,0	2,0	0,841
	Окончание	2,0	2,0	2,0	
	p*	0,160	0,234	1,000	
EF	Начало	6,0	7,0	7,0	0,260
	Окончание	7,0	7,0	6,0	
	p*	0,587	0,541	0,108	
CF	Начало	2,0	2,0	2,0	0,867
	Окончание	3,0	3,0	3,0	
	p*	0,265	0,527	0,878	

Продолжение таблицы 29

Шкала	Момент наблюдения	Медиана показателя качества жизни, баллы			p**
		Только гормонотерапия	Гормонотерапия + мелатонин	Гормонотерапия + метформин	
SF	Начало	2,0	2,5	2,0	0,736
	Окончание	2,0	2,0	2,0	
	p*	0,414	0,334	0,792	
FA	Начало	5,0	5,5	6,0	0,679
	Окончание	5,0	5,0	5,0	
	p*	0,315	0,261	0,101	
NV	Начало	2,0	2,0	2,0	0,571
	Окончание	2,0	2,0	2,0	
	p*	1,000	0,564	0,366	
PA	Начало	2,0	3,0	3,0	0,739
	Окончание	2,0	2,5	2,0	
	p*	0,317	0,161	0,236	
DY	Начало	2,0	1,5	2,0	0,746
	Окончание	1,0	1,0	2,0	
	p*	0,527	0,059	0,480	
SL	Начало	2,0	2,0	2,0	0,243
	Окончание	2,0	1,0	2,0	
	p*	0,782	0,046	0,963	
AP	Начало	1,0	1,0	1,0	0,339
	Окончание	1,0	1,0	1,0	
	p*	0,180	0,564	0,942	
CO	Начало	1,0	1,0	1,0	0,744
	Окончание	1,0	1,0	1,0	
	p*	1,000	0,234	0,317	
DI	Начало	1,0	1,0	1,0	0,769
	Окончание	1,0	1,0	1,0	
	p*	0,157	1,000	0,739	
FI	Начало	2,0	2,0	1,0	0,253
	Окончание	1,0	2,0	1,0	
	p*	0,340	0,130	0,773	

Примечание – * – статистическая значимость для парного критерия Вилкоксона (сравнение значений показателей до и после неoadьюватной терапии); ** – статистическая значимость для критерия Краскела-Уоллиса (сравнение динамики показателя в трех группах).

Отмечено, что как на фоне химиотерапии, так и на фоне гормонотерапии в группе пациентов, получавших МЛТ, наблюдалось улучшение качества жизни по шкале SL, определяющей нарушения сна.

Динамика показателей качества жизни по шкалам представлена на рисунках 11-16. Так как в отличие от остальных шкал качества жизни, высокие значения по шкале QL соответствуют высокому качеству жизни, динамика показателей качества жизни по данной шкале на рисунках представлялась отдельно от остальных шкал.

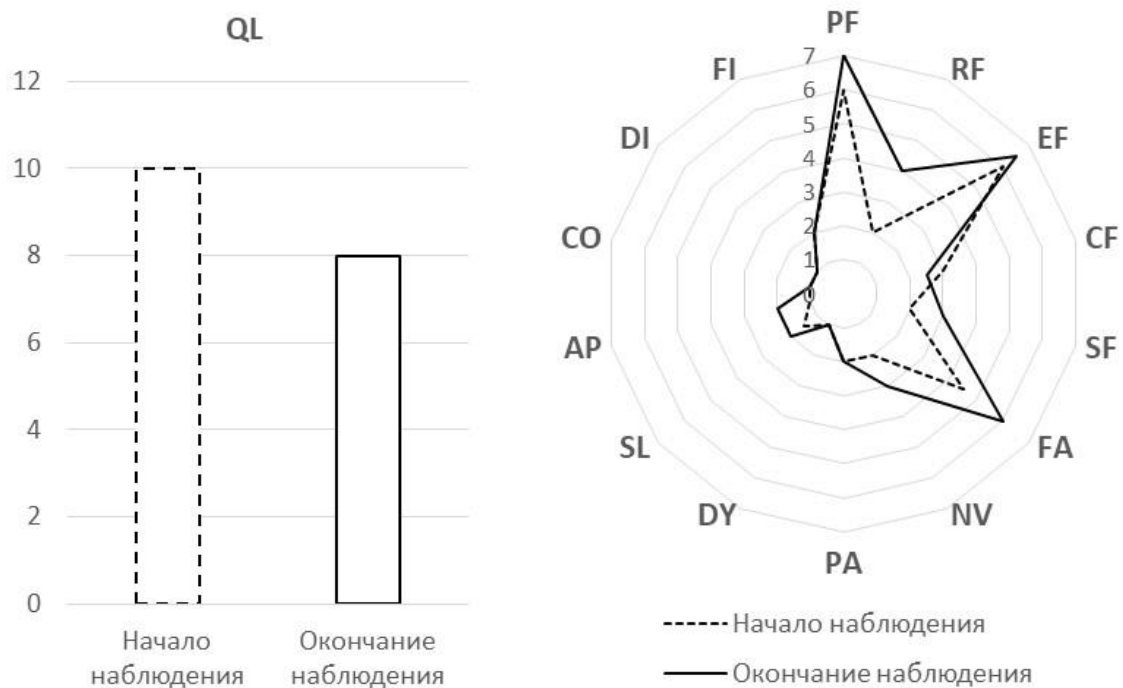


Рисунок 11 – Динамика качества жизни по шкалам QL (слева) и PF, RF, EF, CF, SF, FA, NV, PA, DY, SL, AP, CO, DI, FI (справа) в группе пациентов, получавших только химиотерапию.

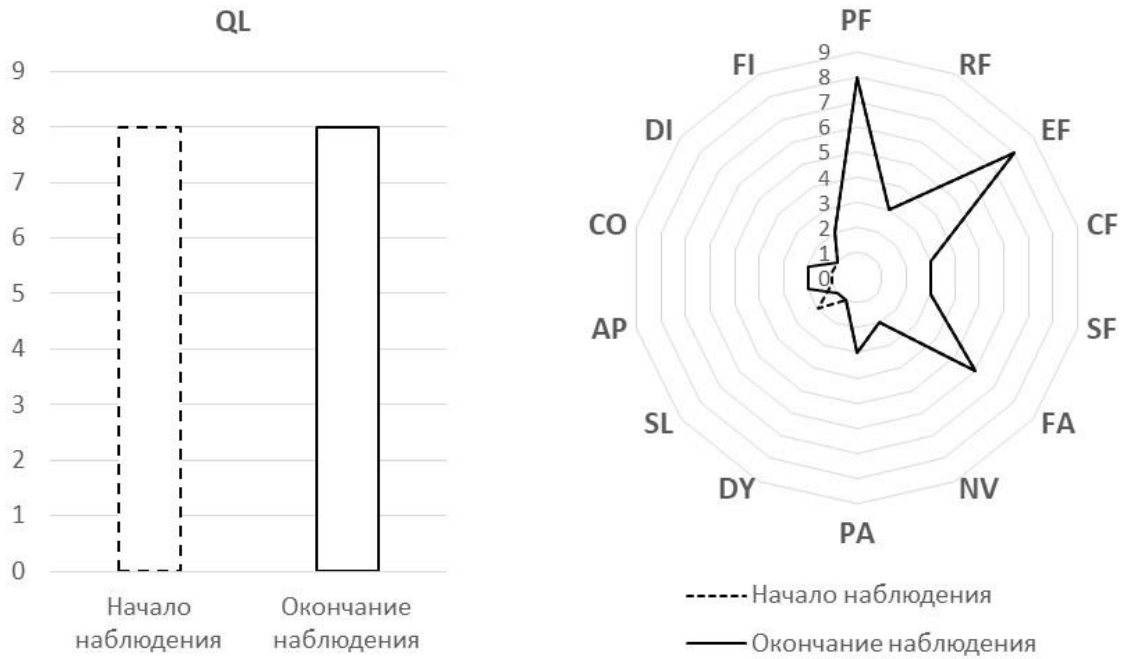


Рисунок 12 – Динамика качества жизни по шкалам QL (слева) и PF, RF, EF, CF, SF, FA, NV, PA, DY, SL, AP, CO, DI, FI (справа) в группе пациентов, получавших химиотерапию в сочетании с мелатонином.

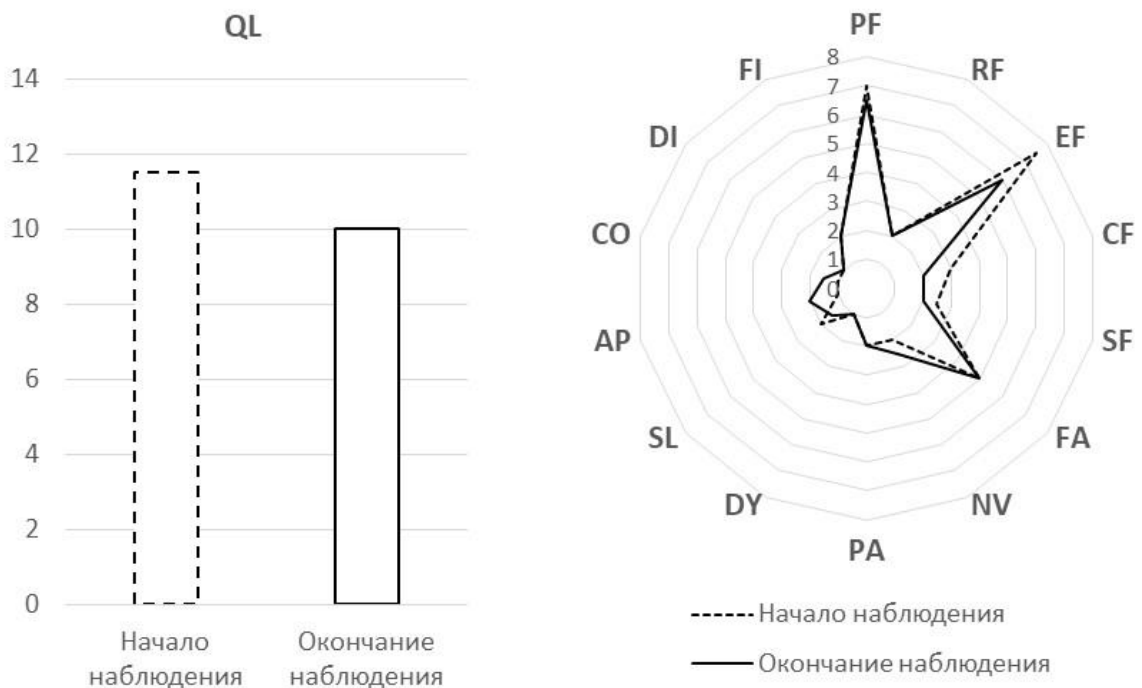


Рисунок 13 – Динамика качества жизни по шкалам QL (слева) и PF, RF, EF, CF, SF, FA, NV, PA, DY, SL, AP, CO, DI, FI (справа) в группе пациентов, получавших химиотерапию в сочетании с метформином.

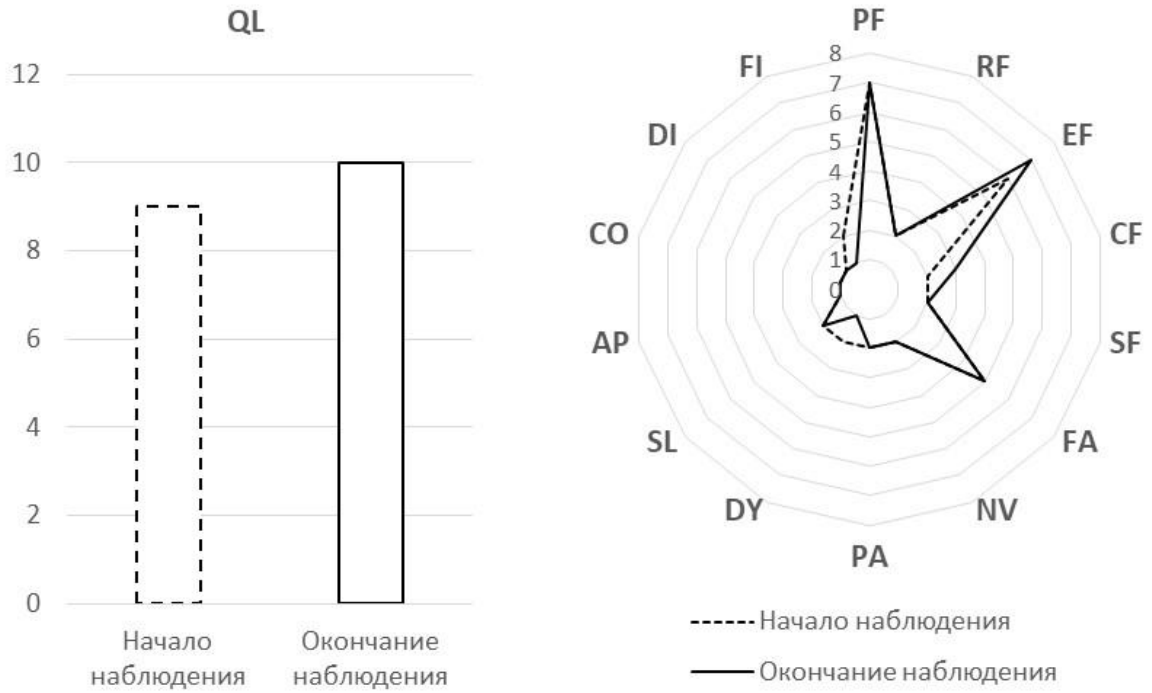


Рисунок 14 – Динамика качества жизни по шкалам QL (слева) и PF, RF, EF, CF, SF, FA, NV, PA, DY, SL, AP, CO, DI, FI (справа) в группе пациентов, получавших только гормонотерапию.

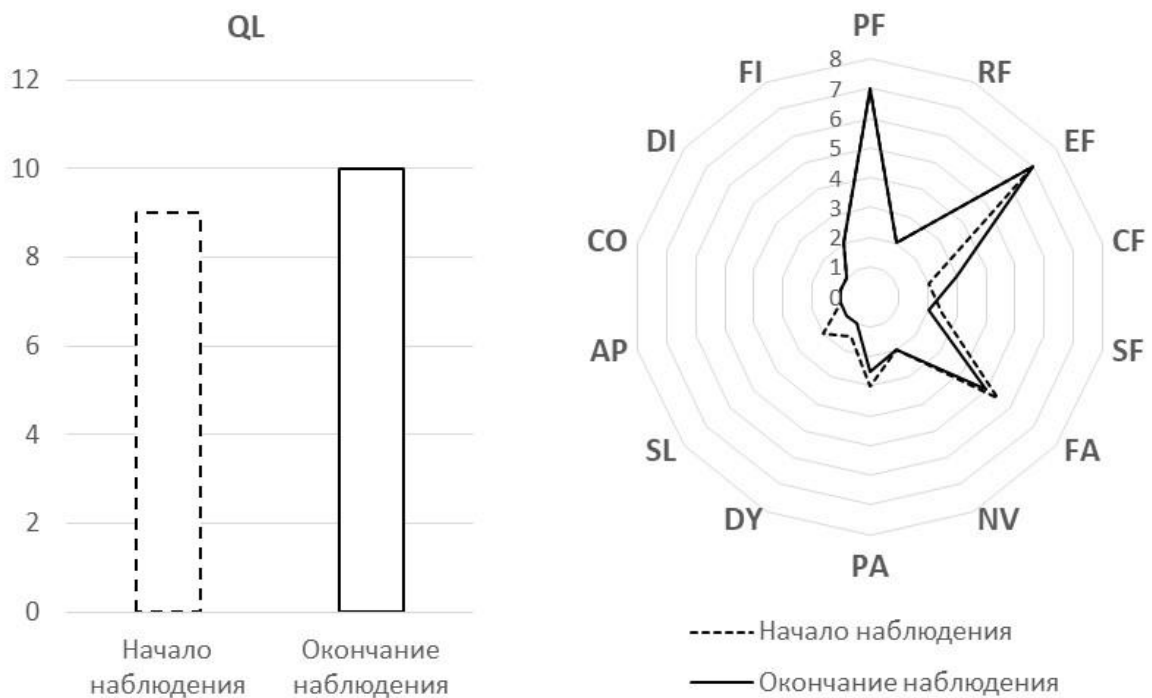


Рисунок 15 – Динамика качества жизни по шкалам QL (слева) и PF, RF, EF, CF, SF, FA, NV, PA, DY, SL, AP, CO, DI, FI (справа) в группе пациентов, получавших гормонотерапию в сочетании с мелатонином.

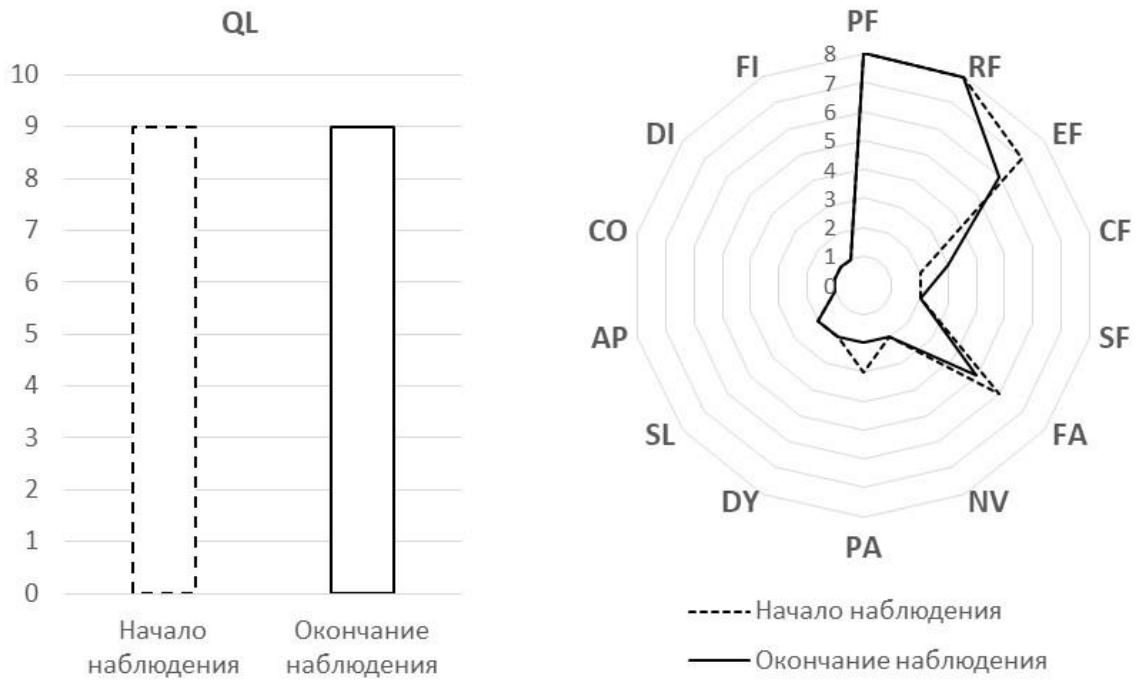


Рисунок 16 – Динамика качества жизни по шкалам QL (слева) и PF, RF, EF, CF, SF, FA, NV, PA, DY, SL, AP, CO, DI, FI (справа) в группе пациентов, получавших гормонотерапию в сочетании с метформином.

Таким образом, в результате анализа динамики качества жизни выявлено благоприятное влияние МЛТ на фоне использования химиотерапии, которое позволило предупредить снижение качества жизни по шкалам нарушения сна, утомляемости и ролевого функционирования у больных местнораспространенным раком молочной железы.

Глава 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментального обоснования применения мелатонина и метформина в комбинации с системной терапией рака молочной железы было проведено 4 опыта, на моделях перевиваемых опухолей у 211 мышей, из них 3 опыта – по оценке эффективности химиотерапии или гормонотерапии в сочетании с МЛТ и МТФ и 1 опыт – по изучению влияния МТФ на острую токсичность цитостатиков. Все исследования с лабораторными животными выполнялись в соответствии с правилами Европейской Конвенции о защите позвоночных животных (СДСЕ №123) и нормами биоэтики (CIOMS, ICLAS, 2012).

В опыте № 1 впервые выявлено, что сочетанное введение доксорубина и МЛТ, как при подкожном его введении, так и с питьевой водой приводит к статистически значимому торможению роста опухоли Эрлиха по сравнению с контролем и введением доксорубина.

По литературным данным нет ни одного исследования, в котором изучалась противоопухолевая активность МЛТ совместно с паклитакселом в эксперименте. Однако, опубликованы результаты об отсутствии усиления противоопухолевого эффекта комбинации МЛТ с доцетакселом, препаратом схожим по механизму действия из группы таксанов, также на модели перевиваемой опухоли молочной железы с инкорпорированным геном HER2 у самок мышей FBV [5]. В работе американских авторов было исследовано влияние МТФ совместно с цитостатиками (включая паклитаксел) на опухолевый рост. Мышам перевивались различные опухолевые штаммы РМЖ (BT 474, MDA-MB-231), далее выполнялось 4 внутриопухолевые инъекции паклитаксела 10 мг/кг. Инъекции назначались на 10-й, 15-й, 20-й и 25-й дни после перевивки опухоли. Противоопухолевые препараты вводились либо самостоятельно, либо в комбинации с МТФ внутрь с питьевой водой в дозе 200 µg/ml. Комбинация МТФ

с паклитакселом и паклитаксел в монорежиме статистически значимо тормозили опухолевый рост по сравнению с контролем, однако, в отличие от опыта № 2, выраженного усиления эффекта при добавлении МТФ к паклитакселу отмечено не было. Обращает на себя внимание способ введения паклитаксела – внутриопухолевые инъекции, высокая доза противоопухолевого препарата, и кратность введения [89].

Влияние МТФ на противоопухолевый эффект доксорубицина в опыте №2 исследовано не было, учитывая имеющиеся литературные данные о способности МТФ усиливать эффект этого цитостатика [89]. Необходимо подчеркнуть, что противоопухолевый эффект монотерапии МТФ в опыте №2 был сопоставим с эффектом паклитаксела, а индекс роста опухоли в группе МТФ был статистически значимо меньше, чем в группе контроля. МЛТ в монорежиме, напротив, не оказывал цитостатического эффекта, но в комбинации усиливал противоопухолевое действие паклитаксела и продолжительность жизни мышей.

В опыте №3 впервые показано потенцирование противоопухолевого эффекта антиэстрогена торемифена при добавлении к терапии МТФ. Следует отметить, что содержание рецепторов эстрогенов в перевиваемой HER 2 положительной опухоли не превышает 10 фМ/мг белка, а содержание рецепторов прогестерона ниже этого уровня [3]. Несмотря на низкий рецепторный статус опухоли, терапия торемифеном в сочетании МТФ статистически достоверно тормозила рост опухоли.

Результаты опыта №4 свидетельствуют об отсутствии усиления токсичности при добавлении МТФ к доксорубину и паклитакселу.

Таким образом, согласно литературным данным и полученных экспериментальных данных, как МЛТ, так и МТФ обладают противоопухолевой активностью в отношении перевиваемых опухолей (РМЖ) как в монотерапии, так и в комбинации со стандартным противоопухолевым лечением.

В связи с полученными положительными результатами в доклинической части работы и после оценки всех данных литературы была выдвинута гипотеза о возможной активности МЛТ и МТФ в клинике в качестве комбинаторных агентов стандартной противоопухолевой терапии.

Клиническая часть работы «Влияние мелатонина и метформина на эффективность противоопухолевого лечения (химиотерапии и гормонотерапии) у больных с местно-распространенным раком молочной железы» была выполнена 2015-2017 гг. в научном отделе инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Научно-исследовательская работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Все больные до включения в научно-исследовательскую работу подписывали информированное согласие в двух экземплярах на основе ознакомления.

Известно, что оценка степени достижения полного патоморфологического ответа (pCR; ypT0 pN0) за короткий срок позволяет определить эффективность новых лекарственных препаратов и их схем [13]. Наиболее значимая корреляционная связь наблюдается между pCR и показателями ОВ и БРВ при агрессивных подтипах РМЖ: трижды негативном, люминальном В (HER2-негативном III степени злокачественности) и HER2-позитивном подтипе, особенно при добавлении анти-HER2 препарата – трастузумаба. Напротив, во время проведения неoadьювантной гормонотерапии крайне редко имеет место достижение pCR и, согласно данным последнего метаанализа не превышает 10% [98]. Таким образом, в отсутствии достижения pCR, критерием эффективности неoadьювантной гормонотерапии можно считать снижение маркера пролиферации Ki-67 на фоне лечения. Прогностическая значимость Ki-67 уже была описана в литературе. Выявлено, что чем выше значение этого показателя перед началом терапии, тем хуже отдаленные результаты лечения [62]. Более того, продемонстрирована прогностическая значимость динамики изменения Ki-67 на фоне гормонотерапии и химиотерапии. В исследовании ROETIS пациентки (n=4 480) с ранним РМЖ рандомизировались 2:1 – 1-я группа получала летрозол 2,5 мг в течение 14-ти дней до операции и 14-ти дней после, 2-я группа не получала лечения. Первичной конечной точкой была общая выживаемость, которая при анализе данных оказалась равной в двух группах. Однако, было

выявлено, что снижение индекса Ki 67 на фоне лечения влияет на безрецидивную выживаемость и снижает риск смерти от прогрессирования. Индекс Ki 67 условно разделили на низкий (<10%) и высокий (>10%). Выяснилось, что при изменении на фоне лечения значения Ki 67 с высокого на низкий ведет к снижению риска 5-летней БРВ на 10,7% [104]. В другом исследовании оценивались отдаленные результаты лечения 435 пациенток, получивших неoadьювантную химиотерапию по поводу РМЖ. Пациентки, у которых не был достигнут pCR были ретроспективно разделены на 2 группы: со снижением индекса Ki-67 в опухоли и без снижения индекса Ki 67 на фоне терапии. При анализе была выявлена более длительная БРВ и ОВ у пациенток из группы, где Ki-67 в опухоли снижался на фоне лечения [61].

Учитывая предикторы более длительной ОВ и БРВ статистический анализ был нацелен на оценку этих параметров, а именно на выявление преимуществ при добавлении к стандартной терапии МЛТ или МТФ. Так, среди пациентов, получавших химиотерапию оценивалось достижение pCR в разных группах, в то время как у пациентов, получавших гормонотерапию критерием ее эффективности и улучшения отдаленных результатов лечения было снижение Ki-67 на фоне лечения.

Исследование было рандомизированным, в связи, с чем группы пациенток достаточно однородны. В группе пациентов, получавших химиотерапию, встречались как люминальный А и В подтипы рака (64,2% наблюдений), так и HER2 (28,3% наблюдений) и трижды негативный рак (7,5% наблюдений), то в выборке пациентов, получавших гормональную терапию, в 100% случаев встречались люминальный А и В типы рака. Возраст пациентов, получавших химиотерапию, был статистически значимо ниже, чем возраст пациентов, получавших гормональную терапию ($z=-6,211$, $p<0,001$).

Для неoadьювантного лечения в группах химиотерапии использовались стандартные антрациклин – и таксансодержащие режимы химиотерапии. Данные схемы лечения уже прочно вошли в рутинную практику и доказали свою эффективность. В группах неoadьювантной гормонотерапии пациентки получали

торемифен. Несмотря на то, что неоадьювантная гормонотерапия не входит в стандарты лечения РМЖ, допустимо ее использование у отдельных групп пациентов. Проведенные международные многоцентровые исследования и многолетний опыт ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России позволяют рассматривать неоадьювантную эндокринотерапию как предпочтительную опцию в лечении старшей возрастной группы больных местнораспространенным люминальным подтипом РМЖ [17, 109]. Последний метаанализ, оценивающий результаты 20 исследований (3 490 пациентов) выявил, что неоадьювантная гормонотерапия различными ингибиторами ароматазы имеет сравнимые показатели по частоте объективного ответа с химиотерапией и при этом более низкий профиль токсичности [98]. Также показано, что неоадьювантная гормонотерапия ингибиторами ароматазы является более эффективной, чем тамоксифен [15, 105, 124]. В нашем исследовании в качестве неоадьювантной гормонотерапии был использован торемифен, который, по результатам одного из рандомизированных исследований приводит к большему числу объективных ответов, чем летрозол (результаты близки к статистически значимым – 65% объективных ответов в группе торемифена против 54% в группе летрозола, $p=0,054$) [100]. Препарат, как и тамоксифен, является антиэстрогеном, однако, обладает более низким профилем токсичности.

По результатам многомерного статистического анализа данных было выявлено, что добавление к стандартной химиотерапии МЛТ или МТФ не влияет на достижение патоморфологического ответа IV и V степеней, и, что ожидаемо, данный результат определяется только биологическим типом опухоли (HER2), что подтверждается данными литературы. Прямого сравнения эффективности неоадьювантного лечения с включением в схему терапии МТФ в рамках проспективного рандомизированного исследования до настоящего времени не проводилось. Можно лишь упомянуть, что в двух работах МТФ назначался с момента биопсии до операции и приводил к снижению индекса Ki 67 на 3-4%, что не является статистически достоверным [36, 92]. Более частое достижение pCR, выявленное у пациенток с СД, принимавших МТФ на фоне неоадьювантной

химиотерапии было продемонстрировано в 2-х исследованиях. Однако, эти данные получены в результате ретроспективного анализа, тем самым обладают более низким уровнем доказательности [45, 128].

Напротив, при анализе результатов лечения в группах гормонотерапии посредством многомерного анализа показано, что дополнение гормонотерапии торемифеном МЛТ способствует статистически значимому снижению индекса Ki-67. Более того, это является клинически значимым, учитывая небольшое число наблюдений в группах. Использование МЛТ не влияло на динамику Ki-67, однако, позволило статистически достоверно повысить частоту объективных ответов. Согласно литературным данным, использование МЛТ может приводить к увеличению частоты объективных ответов при РМЖ [68-71, 97]. Однако, существует два принципиальных различия: эти исследования были проведены у пациентов с метастатическим процессом, и доза МЛТ была гораздо более высокой – 20 мг в сутки. Непременно следует подчеркнуть, что степень объективного ответа при неoadьювантной гормонотерапии не коррелирует с улучшением отдаленных результатов лечения. Исходя из этого, статистически достоверное повышение частоты объективных ответов в группе гормонотерапии торемифеном в сочетании с МЛТ не является клинически значимым, так как не влияет на прогноз заболевания. Процент орган сохранных операций не был выше в данной группе, что может быть объяснено пожилым возрастом пациенток

Снижение качества жизни на фоне проведения химиотерапии по результатам данных опросников EORTC QLQ 30 было ожидаемым событием. При сравнении групп, получавших химиотерапию между собой было выявлено отсутствие ухудшения качества жизни по 3-м показателям в группе пациентов, получавших химиотерапию совместно с МЛТ (шкалы ролевого функционирование, усталости, сна: $p=0,008$, $p=0,004$, $p=0,014$ соответственно). Это можно объяснить улучшением сна на фоне приема МЛТ, тем самым пациентки меньше уставали днем и вели более активный образ жизни. Напротив, фоне неoadьювантной гормонотерапии ни в одной из групп не было выявлено ухудшения качества жизни, что в целом и ожидалось, учитывая низкий профиль токсичности торемифена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные литературы и полученные результаты свидетельствуют о несомненном интересе, в особенности с учетом механизма действия, дальнейшего изучения таких хорошо известных препаратов как мелатонин и метформин, которые, влияя на клинико-метаболические обменные процессы, оказывают противоопухолевый ответ, по крайней мере, у части больных раком молочной железы. Необходимо продолжить изучение и совершенствование методов патогенетически обоснованной корригирующей терапии метаболических нарушений на разных этапах лекарственного лечения рака молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. Мелатонин потенцирует противоопухолевый эффект доксорубицина на модели перевиваемой солидной опухоли Эрлиха у мышей – самок линии SHR. Индекс роста опухоли равнялся 106,4% в группе мышей, получавших доксорубицин в монорежиме, в то время как при добавлении к доксорубицину мелатонина в подкожных инъекциях и внутрь индекс роста опухоли составил 52,3% ($p < 0,001$) и 49,8% ($p < 0,001$) соответственно.
2. Учитывая, что мелатонин в эксперименте на мышах потенцирует противоопухолевый эффект химиотерапии, необходимо продолжить изучение препарата в комбинации с химиотерапией, но уже в рамках многоцентрового рандомизированного исследования.
3. На модели перевиваемой HER2-положительной опухоли молочной железы у мышей - самок линии FBV/N установлена противоопухолевая эффективность и паклитаксела и метформина, а также комбинаций паклитаксела с мелатонином и метформином по сравнению с контролем. Индекс роста опухоли при назначении метформина в монорежиме равнялся 67,4% ($p < 0,05$), что сопоставимо с действием монокимиотерапии паклитакселом (65,1%).
4. Метформин усиливает противоопухолевое действие торемифена на модели HER2-положительного рака молочной железы у самцов мышей линии FBV/N по сравнению с контролем (индекс роста опухоли составил 32%, $p < 0,05$).
5. Прием мелатонина больными местно-распространенным раком молочной железы на фоне проведения неoadьювантной антрациклин – и таксансодержащей химиотерапии благоприятно воздействует на качество жизни, в соответствии со шкалами сна ($p = 0,014$), ролевого функционирования ($p = 0,008$) и утомляемости ($p = 0,004$).
6. Многофакторный анализ показал, что использование метформина в сочетании с неoadьювантной гормонотерапией торемифеном оказывает статистически значимое влияние на динамику индекса Ki-67 (шансы снижения Ki-67 были в

4,2 раза выше по сравнению с гормонотерапией торемифеном [95% ДИ, 1,04-17,1, $p=0,043$]). Выявлена значимая корреляция между динамикой снижения индекса Ki-67 в опухоли и индексом массы тела выше нормы ($p=0,015$).

7. Применение мелатонина в сочетании с неoadъювантной гормонотерапией торемифеном позволяет статистически значимо повысить частоту объективных клинических ответов по сравнению с гормонотерапией торемифеном у больных местно-распространенным люминальным раком молочной железы (87% против 32% соответственно, $p<0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Добавление метформина (в дозе 850 мг два раза в день) к неоадьювантной гормонотерапии торемифеном (в дозе 120 мг в день) на протяжении 4-х месяцев снижает пролиферативную активность опухоли – суррогатного маркера улучшения показателей выживаемости больных местно-распространенным люминальным раком молочной железы. Выявлена значимая корреляция между динамикой снижения индекса Ki-67 в опухоли и индексом массы тела выше нормы.
2. В эксперименте мелатонин потенцирует эффект доксорубицина и паклитаксела, что свидетельствует о перспективе его применения в комбинации с химиотерапией у больных раком молочной железы.
3. Прием мелатонина (в дозе 3 мг на ночь ежедневно) во время проведения неоадьювантной антрациклин – и таксансодержащей химиотерапии у больных местно-распространенным раком молочной железы благоприятно воздействует на качество жизни, включая такие показатели как сон, ролевое функционирование и утомляемость.
4. Мелатонин (в дозе 3 мг на ночь ежедневно) в сочетании с неоадьювантной гормонотерапией (торемифен 120 мг в день ежедневно) увеличивает частоту объективных клинических ответов опухоли и последующего выполнения хирургического лечения местно-распространенного рака молочной железы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМФК – аденозин-монофосфатзависимая протеинкиназа
- БРВ – безрецидивная выживаемость
- В/Б – внутрибрюшинно
- ДМБА – диметилбензантрацен
- ДР – доксорубицин
- Л/У – лимфатические узлы
- МЛТ – мелатонин
- МТФ – метформин
- ННМ – нитрозметилмочевина
- ОВ – общая выживаемость
- ОШ – отношение шансов
- ПКЛ – паклитаксел
- П/К – подкожно
- РМЖ – рак молочной железы
- СД – сахарный диабет
- ЭР – рецепторы эстрогенов
- СОХ-2 – циклоксигеназа второго типа
- ER – рецепторы эстрогенов
- HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2 типа
- IL-2 – интерлейкин 2
- mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих
- NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би»
- pCR – полный патоморфологический ответ
- PR – рецепторы прогестерона
- TNF α – фактор некроза опухоли альфа
- VEGFR – рецептор к фактору роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов, В.Н. Физиологические функции эпифиза / В.Н. Анисимов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1997. – Т. 83, № 8. – С. 1-13.
2. Берштейн, Л.М. Антидиабетический бигуанид метформин и онкологическая заболеваемость / Л.М. Берштейн // Сахарный диабет. – 2010. – № 3. – С. 45-48.
3. Берштейн, Л.М. Неоднозначность данных об эффективности метформина как средства, снижающего массу тела и предотвращающего опухолевый рост: причины и следствия / Л.М. Берштейн // Ожирение и метаболизм. – 2012. – № 2. – С. 10-15.
4. Влияние мелатонина на мутагенность и противоопухолевый эффект цитостатиков у мышей / С.А. Мусатов [и др.] // Вопр. онкологии. – 1997. – № 6. – С. 623-626.
5. Влияние противоопухолевых препаратов и их комбинаций с мелатонином на рост перевиваемой опухоли молочной железы с инкорпорированным геном HER 2/ neu у самок мышей FBV / И.Г. Попович [и др.] // Материалы VII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии. – Казань, 2014. – С. 116.
6. Гржибовский, А.М. Анализ номинальных и ранговых переменных данных с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 6. – С. 5-39.
7. Гржибовский, А.М. Описательная статистика с использованием пакетов статистических программ Statistica и SPSS / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 1. – С. 7-23.
8. Гржибовский, А.М. Сравнение количественных данных двух независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии / А.М. Гржибовский,

- С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 2. – С. 5-28.
9. Гржибовский, А.М. Сравнение количественных данных двух парных выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 3. – С. 5-25.
10. Гржибовский, А.М. Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 4. – С. 5-37.
11. Использование псевдорандомизации (propensity score matching) для устранения систематических различий между сравниваемыми группами в наблюдательных исследованиях с дихотомическим исходом / А.М. Гржибовский, С.В. Иванов, М.А. Горбатова, А.А. Дюсупов // Экология человека. – 2016. – № 5. – С. 50-64.
12. Кветной, И. Суточная экскреция мелатонина у больных раком желудка и толстой кишки / И. Кветной, И. Левин // Вопр. онкологии. – 1987. – № 33. – С. 23-32.
13. Маркеры эффективности предоперационной таксансодержащей химиотерапии местнораспространенного рака молочной железы / Т.Ю. Семиглазова [и др.] // Вопр. онкологии. – 2013. – Т. 59, № 3. – С. 363-368.
14. Наследов, А. SPSS 19: профессиональный статистический анализ данных / А. Наследов. – СПб.: Питер, 2011. – 400 с.
15. Неoadьювантная эндокринотерапия пациентов с эстроген-рецептор-положительным раком молочной железы / В.Ф. Семиглазов [и др.] // Сиб. онкол. журн. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 11-19.

16. Применение множественного логистического регрессионного анализа в здравоохранении с использованием пакета статистических программ SPSS / Е.Е. Шарашова, К.К. Холматова, М.А. Горбатова, А.М. Гржибовский // Наука и здравоохранение. – 2017. – № 4. – С. 5-26.
17. Рекомендации по лечению рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов [и др.]. – М.: Мегapolis, 2017. – 168 с.
18. Сопоставление противоопухолевой активности экстрактов эпифиза, гипоталамуса, мелатонина и сигетина у мышей с перевитым раком молочной железы / В.Н. Анисимов, В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон, В.М. Дильман // Вопр. онкологии. – 1973. – № 10. – С. 99-101.
19. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases / J. Stehle [et al.] // J. Pineal Res. – 2011. – Vol. 51. – P. 17-43.
20. Adjuvant lapatinib and trastuzumab for early human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: Results from the randomized phase III Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization Trial / M. Piccart-Gebhart [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2016. – Vol. 34. – P. 1034-1042.
21. Anisimov, V.N. Metformin: do we finally have an anti-aging drug? / V.N. Anisimov // Cell Cycle. – 2013. – Vol. 12, № 22. – P. 3483-3489.
22. Anisimov, V.N. Metformin for cancer and aging prevention: is it a time to make the long story short? / V.N. Anisimov // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, № 37. – P. 39398-39407.
23. Anisimov, V.N. The solar clock of aging / V.N. Anisimov // Acta Geront. – 1994. – Vol. 45. – P. 10-18.
24. Association between metformin therapy and mortality after breast cancer: a population-based study / I. Lega [et al.] // Diabetes Care. – 2013. – Vol. 36. – P. 3018-3026.
25. Blask, D. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture / D. Blask, S. Hill // J. Neural. Transm. Suppl. – 1986. – Vol. 21. – P. 433-449.

26. Bosco, J. Metformin and incident breast cancer among diabetic women: a population-based case-control study in Denmark / J. Bosco, S. Antonsen, H. Sørensen // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2011. – Vol. 20, № 1. – P. 101-111.
27. Bulterijs, S. Metformin as a geroprotector / S. Bulterijs // *S. Rejuvenation Res.* – 2011. – Vol. 14, № 5. – P. 469-482.
28. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis / H. Noto [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e33411.
29. Cheong, J. Dual Inhibition of Tumor Energy Pathway by 2-Deoxyglucose and Metformin Is Effective against a Broad Spectrum of Preclinical Cancer Models / J. Cheong // *Molecular Cancer Therapeutics.* – 2011. – Vol. 10, № 12. – P. 2350-2362.
30. Combined Use of Metformin and Everolimus Is Synergistic in the Treatment of Breast Cancer Cells / Y. Wang [et al.] // *Oncol. Res.* – 2015. – Vol. 22, № 4. – P. 193-201.
31. Comparison of metformin, pheformin and buformin in mammary carcinogenesis in non-obese, non-diabetic rats / Z. Zhu, W. Jiang, J. McGinley, H. Thompson // *Proc of the 104th Annual Meeting of the AACR.* – Washington DC, 2013. – Abst. 2272.
32. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer / L. Tamarkin [et al.] // *Science.* – 1982. – Vol. 216. – P. 1003-1005.
33. Degeneration of the pineal gland in patients with cancer / S. Hajdu, R. Porro, P. Lieberman, F. Foote // *Cancer.* – 1972. – Vol. 29. – P. 706-709.
34. Depression of Serum Melatonin in Patients With Primary Breast Cancer Is Not Due to an Increased Peripheral Metabolism / C. Bartsch [et al.] // *Cancer.* – 1991. – Vol. 67. – P. 1681-1684.
35. Drexler, J. The calcified pineal body and carcinoma / J. Drexler, T. Meaney, L. McCormack // *Clew. Clin. Q.* – 1957. – Vol. 24. – P. 242-247.

36. Dual Effect of Metformin on Breast Cancer Proliferation in a Randomized Presurgical Trial / B. Bonanni [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, № 21. – P. 2593-600.
37. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer / B. Jardim-Perassi [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. e85311.
38. Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer / S. Bayraktar [et al.] // *Cancer.* – 2012. – Vol. 118. – P. 1202-1211.
39. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture / S. Cos [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 1996. – Vol. 216. – P. 113-116.
40. Effects of metformin, buformin, and phenformin on the post-initiation stage of chemically induced mammary carcinogenesis in the rat / Z. Zhu [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila).* – 2015. – Vol. 8. – P. 518-257.
41. Effects of metformin on breast cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle / S. Hadad, D. Hardie, V. Appleyard, A. Thompson // *Clin. Transl. Oncol.* – 2014. – Vol. 16, № 8. – P. 746-752.
42. Espino, J. The inhibition of tnf-alpha-induced leucocyteapoptosis by melatonin involves membrane receptor mt1/mt2 interaction / J. Espino, A. Rodriguez, J. Pariente // *J. Pineal Res.* – 2013. – Vol. 54, № 4. – P. 442-452.
43. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial / S. Hadad [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2011. – Vol. 128, № 3. – P. 783-794.
44. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: biomarker analysis in a pre-operative window of opportunity randomized trial / S. Hadad [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2015. – Vol. 150, № 1. – P. 149-155.
45. Giordano Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients with Breast Cancer / S. Jiralerspong [et al.] // *J. Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27, № 20. – P. 3297-3302.

46. Giudice, A. The Effect of Light Exposure at Night (LAN) on Carcinogenesis via Decreased Nocturnal Melatonin Synthesis / A. Giudice, A. Crispo, M. Grimaldi // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, № 6. – P. E1308.
47. Gupta, S. Physiological crosstalk between melatonin and glucocorticoid receptor modulates t-cell mediated immune responses in a wild tropical rodent, *funambulus pennanti* / S. Gupta, C. Haldar // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 134. – P. 23-36.
48. Haldar, C. Melatonin blocks dexamethasone-induced immunosuppression in a seasonally breeding rodent indian palm squirrel, *funambulus pennant* / C. Haldar, S. Rai, R. Singh // *Steroids*. – 2004. – Vol. 69. – P. 367-377.
49. Hernan, M.A. A structural approach to selection bias / M.A. Hernan, S. Hernandez-Diaz, J.M. Robins // *Epidemiology*. – 2004. – Vol. 15, № 5. – P. 615-625.
50. Hill, S. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture / S. Hill, D. Blask // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 48. – P. 6121-6126.
51. Hirsch, H. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth / H. Hirsch, D. Iliopoulos, K. Struhl // *Proc Nat Acad Sci.* – 2013. – Vol. 110, № 3. – P. 972-977.
52. Impact of Diabetes, Insulin, and Metformin Use on the Outcome of Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Primary Breast Cancer: Analysis From the ALTTO Phase III Randomized Trial [Electronic resource] / A. Sonnenblick [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Available at: doi: 10.1200/JCO.2016.69.7722.
53. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin / S. Bowker, S. Majumdar, P. Veugelers, J.A. Johnson // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29, № 2. – P. 254-258.
54. Influence of agents which modulate thromboxane A2 synthesis or action on R3230AC mammary carcinoma / R. Karmali [et al.] // *Cancer Lett.* – 1978. – Vol. 5, № 4. – P. 205-208.

55. Influence of Melatonin on Invasive and Metastatic Properties of MCF-7 Human Breast Cancer Cells / S. Cos, R. Fernandez, A. Guezmes, E. Sanchez-Barcelo // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 4383-4390.
56. Insulin-lowering effects of metformin in women with early breast cancer / P. Goodwin [et al.] // *Clin. Breast Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 501-505.
57. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors / M. Dubocovich [et al.] // *Pharmacol Rev.* – 2010. – Vol. 62. – P. 343-380.
58. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes / A. Lerner [et al.] // *J. Am Chem Soc.* – 1958. – Vol. 80, № 10. – P. 2587-2587.
59. Karasek, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases / M. Karasek // *Exp Gerontol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 1723-1729.
60. Kim, H. Metformin increases survival in hormone receptor-positive, HER2-positive breast cancer patients with diabetes / H. Kim, H. Kwon, J. Lee // *Breast Cancer Res.* – 2015. – Vol. 17. – P. 64.
61. Ki67 Changes Identify Worse Outcomes in Residual Breast Cancer Tumors After Neoadjuvant Chemotherapy / P. Cabrera [et al.] // *Oncologist.* – 2018. – Vol. 23, № 6. – P. 670-678.
62. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry / E. Inwald [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* – 2013. – Vol. 139, № 2. – P. 539-552.
63. Kothari L. Influence of chronic melatonin on 9,10-dimethyl-1,2- benzanthrazene-induced mammary tumors in female Holtzman rats exposed to continuous light / L. Kothari // *Oncology.* – 1987. – Vol. 44. – P. 64-66.
64. Kutcherenko, B. On the changes in cases of malignant neoformations / B. Kutcherenko // *Probl. Endokrinol. (Mosk).* – 1941. – Vol. 1. – P. 131-135.
65. Lack of effect of metformin on mammary carcinogenesis in nondiabetic rat and mouse models / M. Thompson [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila).* – 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 231-239.

66. Lack of metformin effects on different molecular subtypes of breast cancer under normoglycemic conditions: an in vitro study / S. Sadighi [et al.] // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 2287-2290.
67. Lapin, V. Effect of some low molecular weight sheep pineal fractions and melatonin on different tumors in rats and mice / V. Lapin, I. Ebels // *Oncology.* – 1976. – Vol. 33. – P. 11-113.
68. Lissoni, P. A randomized study of tamoxifen plus melatonin in estrogen receptor – negative heavily pretreated metastatic breast cancer patients / P. Lissoni, S. Barni // *Oncol. Rep.* – 1995. – Vol. 2. – P. 871-873.
69. Lissoni, P. A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastases due to solid neoplasms / P. Lissoni, S. Barni, A. Ardizzioia // *Cancer.* – 1994. – Vol. 73, № 3. – P. 699-701.
70. Lissoni, P. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status / P. Lissoni, S. Barni, M. Mandalà // *Eur. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 35, № 12. – P. 1688-1692.
71. Lissoni, P. Is there a role for melatonin in supportive care? / P. Lissoni // *Support. Care Cancer* – 2002. – Vol. 10, № 2. – P. 110-116.
72. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer / M. Bodmer [et al.] // *Diabetes Care.* – 2010. – Vol. 33. – P. 1304-1308.
73. Mao, L. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway / L. Mao // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12, № 6. – P. 107.
74. Mao, L. Molecular deficiency (ies) in MT1 melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells / L. Mao, L. Yuan, S. Xoang // *J. Pineal Res.* – 2014. – Vol. 56, № 3. – P. 246-253.
75. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis / R.J. Reiter [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 4. – P. 843.

76. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies / P. Kubatka [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2018. – Vol. 122. – P. 133-143.
77. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: a systematic review an meta-analysis of randomized trials / D. Seely [et al.] // *Integr. Cancer Ther.* – 2012. – Vol. 11, № 4. – P. 293-303.
78. Melatonin: buffering the immune system / A. Carrillo-Vico [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 8638-8683.
79. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression / T. Borin [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2016. – Vol. 60, № 1. – P. 3-15.
80. Melatonin for the prevention and treatment of cancer / Y. Li [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol .8, № 24. – P. 39896-39921.
81. Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CMBA mice / V.N. Anisimov [et al.] // *J. Gerontol. Biol. Sci.* – 2001. – Vol. 56A. – P. 311-323.
82. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz[a]anthraceneinduced mammary tumors in the rat / L. Tamarkin [et al.] // *Cancer Res.* – 1981. – Vol. 41. – P. 4432-4436.
83. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro / M. Leon Blanco [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2003. – Vol. 35. – P. 204-211.
84. Melatonin repressed metastasis in Her2- positive human breast cancer cells by suppressing RSK2 expression / L. Mao [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 14, № 11. – P. 1159-1169.
85. Metformin and melatonin inhibit DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats fed a high-fat diet [Electronic resource] / B. Bojkova [et al.] // *Anticancer drug.* – 2017. – Dec. 1. – Available at: doi: 10.1097/CAD.0000000000000576.
86. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients / J. Evans [et al.] // *BMJ.* – 2005. – Vol. 330, № 7503. – P. 1304-1305.

87. Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer / X. He [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23. – P. 1771-1780.
88. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16 / G. Landman [et al.] // *Diabetes Care.* – 2010. – Vol. 33, № 2. – P. 322-326.
89. Metformin decreases the doses of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types / D. Ilipoulos [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71, № 9. – P. 3196-3201.
90. Metformin exerts anticancer effects through the inhibition of the Sonic hedgehog signaling pathway in breast cancer / C. Fan [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2015. – Vol. 36, № 1. – P. 204-214.
91. Metformin in chemically-induced mammary carcinogenesis in rats / B. Bojkova [et al.] // *Neoplasma.* – 2009. – Vol. 56. – P. 69-274.
92. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study / S. Niraula [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2012. – Vol. 135, № 3. – P. 821-830.
93. Metformin Induced AMPK Activation, G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest and the Inhibition of Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinomas In Vitro and In Vivo / C. Xianbin [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 7. – P. e0133349.
94. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells / L. Bolin [et al.] // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8, № 13. – P. 2031-2040.
95. Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models / Y. Li [et al.] // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 10, № 2. – P. 2158-2174.
96. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review / M. Franciosi [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – P. e71583.
97. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under

- tamoxifen alone / P. Lissoni [et al.] // *Br. J Cancer.* – 1995. – Vol. 71, № 4. – P. 854-856.
98. Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis / L. Spring [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2016. – Vol. 02, № 11. – P. 1477-1486.
99. Neoadjuvant FDC With Melatonin or Metformin for Locally Advanced Breast Cancer [Electronic resource]. – Available at: <http://www.clinicaltrials.gov>.
100. Neoadjuvant hormone therapy with toremifene vs. letrozole of postmenopausal breast cancer patients / S.K. Azatyan [et al.] // *Annals of Oncol.* – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 111-112.
101. Neoadjuvant Toremifene With Melatonin or Metformin in Locally Advanced Breast Cancer [Electronic resource]. – Available at: <http://www.clinicaltrials.gov>.
102. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes / G. Libby [et al.] // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 1620-1625.
103. Parkin, M. Use of Statistics to Assess the Global Burden of Breast Cancer / M. Parkin, L. Fernández // *Breast J.* – 2006. – Vol. 12. – P. 70-80.
104. Peri-operative aromatase inhibitor treatment in determining or predicting long-term outcome in early breast cancer – The POETIC* Trial (CRUK/07/015) [Electronic resource] / J. Robertson [et al.] // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78, № 4. – Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/4_Supplement/GS1-03.
105. Phase II randomized trial of primary endocrine therapy chemotherapy in postmenopausal patients with estrogen receptor positive breast cancer / V.F. Semiglazov [et al.] // *Cancer.* – 2007. – Vol. 110, № 2. – P. 244-254.
106. Phoenix, K. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model / K. Phoenix, F. Vumbaca, K. Claffey // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2008. – Vol. 113. – P. 101-111.

107. Pollak, M. Metformin and other biguanides in oncology: advancing the research agenda / M. Pollak // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. – 2010. – Vol. 3, № 9. – P. 1060-1065.
108. Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat / V. Lenoir [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2005. – Vol. 7, № 4. – P. 470-476.
109. P198 Prognostic values of breast cancer subtypes: from phase 2 randomized trial of neoadjuvant therapy / V.F. Semiglazov [et al.] // *The Breast*. – 2015. – Vol. 24. – P. S92.
110. Raikhlin, N. Melatonin in the blood serum of oncological patients / N. Raikhlin, I. Kvetnoy, E. Tyurin // *Klin. Med. (Mosk)*. – 1980. – Vol. 58. – P. 77-79.
111. Regression of NMU-induced mammary tumors with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid / K. Melancon [et al.] // *Cancer Lett.* – 2005. – Vol. 227. – P. 29-48.
112. Reiter, R.J. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen – centered free radicals: a brief review / R.J. Reiter // *Braz. J. Med Res.* – 1993. – Vol. 25. – P. 1141-1145.
113. Rodin, A. Statistical relationships of weight of the human pineal gland to age and malignancy / A. Rodin, J. Overall // *Cancer* – 1967. – Vol. 20. – P. 1203-1214.
114. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action / G. Zhou [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, № 8. – P. 1167-1174.
115. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells / J. Wang [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2012. – Vol. 53, № 1. – P. 77-90.
116. Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer: Correlation with prolactin, thyroid stimulating hormone and steroid receptors / C. Bartsch [et al.] // *Cancer*. – 1989. – Vol. 64. – P. 426-433.
117. Tapp, E. The human pineal gland in malignancy / E. Tapp // *J. Neural Transm.* – 1980. – Vol. 48. – P. 119-129.

118. Tapp, E. The weight of the pineal gland in malignancy / E. Tapp, M. Blumfield // *Br. J. Cancer* – 1970. – Vol. 24. – P. 67-70.
119. Targeting Metabolic Remodeling in Triple Negative Breast Cancer in a Murine Model / V. García-Castillo [et al.] // *J. Cancer*. – 2017. – Vol. 8, № 2. – P. 178-189.
120. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: Metformin, an old drug with multi-faceted effects / M.A. Pierotti [et al.] // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32, № 12. – P. 1475-1487.
121. The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells / S. Orecchioni [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2015. – Vol. 136, № 6. – P. 534-544.
122. The effect of metformin on breast cancer outcomes in patients with type 2 diabetes / B. Oppong [et al.] // *Cancer Med*. – 2014. – Vol. 3. – P. 1025-1034.
123. The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: a meta-analysis of randomized controlled trials / Y. Wang [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol*. – 2012. – Vol. 69, № 5. – P. 1213-1220.
124. The relative efficacy of neoadjuvant endocrine therapy versus chemotherapy in postmenopausal women with ER-positive breast cancer / V.F. Semiglazov [et al.] // *J. Clinical. Oncology*. – 2004. – Vol. 23. – P. 7.
125. Topcul, M. Effects of metformin on cell kinetic parameters of MCF-7 breast cancer cells in vitro / M. Topcul, I. Cetin // *Asian Pac. J. Cancer Prev*. – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 2351-2354.
126. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients / C. Bartsch [et al.] // *J. Neural Transm*. – 1981. – Vol. 52. – P. 281-294.
127. Use of metformin and survival of diabetic women with breast cancer / P. Peeters [et al.] // *Curr Drug Saf*. – 2013. – Vol. 8. – P. 357-363.
128. Van Der Laat, A. Neoadjuvant metformin along with systemic therapy increase pathological complete responses in breast cancer: Results of a cross-sectional

- study, Hospital Mexico, Costa Rica / A. Van Der Laat // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34. – P. e12519.
129. Wang, J. Suppression of tumor angiogenesis by metformin treatment via a mechanism linked to targeting of HER2/HIF-1 α /VEGF secretion axis / J. Wang, G. Li, Y. Wang // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 29, № 6. – P. 44579-44592.
130. Zhuang, Y. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1 / Y. Zhuang, W. Miskimins // *J. Mol. Signal.* – 2008. – Vol. 3. – P. 18.