

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и международной
деятельности ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
кандидат медицинских наук, доцент



_____ Д.В. Бутнару

_____ 20 23 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

на основании решения совместного заседания кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Диссертация «Поиск эффективных механизмов контроля EGFR-опосредованного канцерогенеза» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук выполнена на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского и Института клинической морфологии и цифровой

патологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Епишкина Анна Алексеевна, 1993 года рождения, гражданство Российской Федерации, окончила государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Лечебное дело».

Отчислена из аспирантуры в 2023 году в связи с окончанием обучения.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов №1721/Аз от 16 июня 2023 года выдана в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

С 2023 года работает в должности ассистента кафедры фундаментальной медицины Инженерно-физического института биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»» по настоящее время.

Научные руководители:

Демура Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, директор Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Блинова Екатерина Валериевна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Поиск эффективных механизмов контроля EGFR-опосредованного канцерогенеза», представленного на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.2. Патологическая анатомия, 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, принято следующее заключение:

- **Оценка выполненной соискателем работы**

Выполненная работа представляет собой законченную, самостоятельную научно-квалификационную работу, объединенную общей идеей, которой присущи признаки внутреннего смыслового единства, направленную на решение актуальной задачи современной патологической анатомии и фармакологии, клинической фармакологии, посвященную обоснованию инновационных терапевтических подходов в лечении онкологической патологии, в развитии которой ведущая роль принадлежит EGFR-ассоциированному сигнальному пути: дизайну, синтезу и изучению противоопухолевой активности новых перспективных молекул – потенциальных кандидатов в лекарственные средства

- **Актуальность темы диссертационного исследования**

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) является известным драйвером развития и прогрессирования опухоли. Тирозинкиназа EGFR модулирует рост и дифференцировку эпителиальных клеток посредством фосфорилирования внутриклеточных субстратов. В патологических условиях он вовлекает в онкогенную трансформацию и ускорение опухолевого роста различных новообразований, таких как рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, уротелиальная карцинома, глиобластома и др. Ингибиторы EGFR представляют собой надежную стратегию противораковой химиотерапии. В то же время широкий спектр

доступных в настоящее время ингибиторов зачастую не способен преодолеть химиорезистентность опухолевых клеток. Все это делает поиск новых потенциально эффективных блокаторов EGFR актуальной задачей молекулярной фармакологии.

Одним из возможных источников новых противоопухолевых препаратов являются производные пиридина. Химиотерапевтические аналоги нуклеотидов представляют собой антиметаболиты. Химически модифицированные аналоги природных нуклеотидов являются эндогенными метаболитами, участвующими во многих важных клеточных процессах, таких как синтез ДНК и РНК, передача внутриклеточных сигналов. Химическая модификация нуклеотида позволяет ему приобрести не только антинуклеотидное свойство, но и приобрести другие виды фармакологического действия. Среди них следует отметить мембраносвязанный и цитоплазматический ингибирующие эффекты макромолекул. Эти особенности влияния на опухолевые клетки были использованы исследователями Всесоюзного научного центра безопасности биологически активных веществ для разработки ряда новых соединений. При этом была отмечена высокая прогностическая вероятность наличия общего противоопухолевого эффекта, а также противоопухолевого действия в отношении колоректального рака, рака молочной железы (РМЖ), рака мочевого пузыря и рака толстого кишечника, а также лимфобластной лейкемии.

Принимая во внимание особенности действия соединений пиридинкарбоновой кислоты на злокачественные клетки, представляет интерес изучение их противоопухолевого действия в отношении немелкоклеточного рака легкого и тройного негативного РМЖ.

- **Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Автор лично сформулировал научную гипотезу диссертационного исследования, сформулировал научный вопрос, цель и задачи работы,

установил область знания, соответствующую своим научным интересам, разработал дизайн и план исследования, выбрал оптимальные методы патологической анатомии, фармакологии, молекулярной биологии для решения поставленных задач, самостоятельно проводил работы по культивированию и перевивке двухмерных и трехмерных клеточных культур, включенно участвовал в выполнении молекулярного раздела работы, самостоятельно проводила манипуляции с лабораторными животными и формированию ксенографтов, их патологоанатомической валидации, самостоятельно регистрировала результаты исследования, выполняла своду, обобщение и анализ данных, деятельно участвовала в написании научных публикаций по теме диссертационной работы.

- **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Достоверность основных положений и выводов настоящей диссертации определяется соответствием гипотезы, дизайна исследования принципам биомедицинской этики, применением в работе сертифицированных лабораторных животных, реактивов, расходных материалов, валидированных и имеющих международное признание методов исследования, формированием групп наблюдения, позволяющих получить репрезентативные результаты в соответствие с выбранным уровнем статистической достоверности и мощности, корректно выбранными использованными методами медицинской статистики.

- **Научная новизна результатов проведенных исследований**

Настоящая диссертация явилась результатом комплексного мультидисциплинарного исследования по поиску и обоснованию эффективного пути контроля EGFR-ассоциированного канцерогенеза.

В результате экспериментов по молекулярному докингу было впервые установлено высокое сродство 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-один к киназному домену макромолекулы EGFR. Было показано, что комплекс связывания образовывается за счет π - σ -связей между ароматическими

ядрами фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-один с аминокислотными остатками Leu820, Leu694 и Val702, при этом, алкильный и π -алкильный комплексы стабилизируются взаимодействиями метильных групп в положении 3 и фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-один с аминокислотными остатками Lys721, Met742, Ala719, Leu820, и Val702, а молекулярная стыковка становится возможной вследствие формирования внутримолекулярных водородных связей.

В работе показано, что инкубация клеток экспрессирующего EGFR дикого типа рака желудка сопровождается развитием цитотоксического действия соединения при увеличении его концентрации. В культурах AGS и Hs746T цитотоксическое действие соединения проявлялось уже в концентрации 0,001 мкМ. При этом, молекулярной основой формирования фармакологической активности служит снижение внутриклеточной концентрации активной – фосфорилированной – формы рецепторной тирозинкиназы дикого типа в клетках опухоли. Наименее чувствительной к действию соединения была культура MKN1.

Была разработана и валидирована опухолеподобная трехмерная культура EGFR-экспрессирующего рака молочной железы. Патоморфологический, иммуногистохимический и молекулярно-биологический анализ растущих органоидов, полученных из клеток протоковой карциномы молочной железы 68-летней пациентки позволил валидировать органоидную модель как ER-отрицательную, PR-отрицательную, Her2/neu-отрицательную, EGFR-положительную с индексом экспрессии Ki-67 35%. При этом *ex vivo* транслокация клеток сопровождалась потерей экспрессии эстрогеновых рецепторов и смены молекулярного паттерна органоидной опухоли в сторону более агрессивного тройного негативного варианта.

Показано, что соединение дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-один L-2-гидроксибутандиватом (ЛХТ-17-19) на примере трехмерной культуры опухолевых клеток тройного негативного рака молочной железы является эффективным средством фармакологического контроля онкогенной экспрессии рецепторной тирозинкиназы EGFR.

Инкубация органоидов с ЛХТ-17-19 в диапазоне концентраций от 0,5 до 60,0 мкМ сопровождалась не только ингибированием их роста и пролиферации, но и существенной циторедукцией.

В результате комплексного патоморфологического и молекулярно-генетического исследования особенностей развития ксенографтного немелкоклеточного EGFR-экспрессирующего рака легкого человека в организме гуманизированных иммунодефицитных мышей было установлено, что опухоль третьей генерации сохраняет морфологические, иммуногистохимические и молекулярные черты исходной опухоли легкого пациента, а также как и исходная опухолевая ткань несет активирующую мутацию – делецию в экзоне 19 гена EGFR (Del19).

Внутривенное курсовое введение соединения дигидроакридон 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-один L-2-гидрокси-бутандивата (соединение ЛХТ-17-19) в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 7 суток гуманизированным животным со сформированным ксенографтом опухоли сопровождалось повышением выживаемости животных, снижением роста и метастазирования опухоли, а лекарственный патоморфоз проявлялся в том числе элиминацией клеток, носителей мутантных аллелей гена EGFR. Таким образом было показано, что новое вещество проявляет свойства фармакологического соединения молекулярно-направленного действия, эффективного в отношении рассматриваемого типа опухоли, а экспериментальная терапия соединением ЛХТ-17-19 может рассматриваться с позиций контроля киназного драйвера канцерогенеза.

- **Практическая значимость проведенных исследований**

Трехмерная опухолеподобная органоидная модель EGFR-экспрессирующего рака молочной железы может быть предложена в качестве эффективной *ex vivo* трансляционной платформы для определения терапевтического потенциала новых молекул молекулярно-направленного типа действия при соблюдении ряда обязательных требований, в том числе,

предварительной патоморфологической, иммунофенотипической и молекулярно-генетической валидации.

Для персонализации молекулярно-направленной терапии ингибиторами киназы EGFR, в том числе и ее мутантного варианта, возможно применение ксенографтной модели аденокарциномы легкого, воспроизводимой в организме иммунодефицитных гуманизированных мышей, при этом для молекулярно-морфологической валидации варианта опухоли необходимо выполнение одновременно определение иммунофенотипа по статусу EGFR и молекулярно-генетической детекции мутаций гена EGFR в образце третьей генерации ксенографта.

Соединения дигидроакридона и, в частности, 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-один L-2-гидрокси-бутандиват (соединение ЛХТ-17-19) может служить источником создания нового оригинального лекарственного препарата молекулярно-направленного типа действия для эффективного контроля EGFR-опосредованного канцерогенеза.

- **Ценность научных работ соискателя ученой степени**

В результате всестороннего изучения нового соединения дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксибутандиватом (соединение ЛХТ-17-19), которое вводили животным со сформированным ксенографтом опухоли в дозе 2 мг/кг в сутки, было установлено, что новое вещество проявляет свойства фармакологического соединения молекулярно-направленного действия, эффективного в отношении рассматриваемого типа опухоли. Экспериментальная терапия сопровождалась повышением выживаемости животных, снижением роста и метастазирования опухоли, а лекарственный патоморфоз проявлялся в том числе элиминацией клеток, носителей мутантных аллелей гена EGFR

Полученные в работе научные результаты открывают широкие возможности как для их практического применения, так и для продолжения исследовательского поиска – его углубления и расширения. Так, в частности,

выявленная сниженная чувствительность культуры EGFR-экспрессирующего рака желудка MKN1 к терапевтическим концентрациям 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксибутандивата требует объяснения. С практической точки зрения важным является выполнение комплекса фармакокинетических исследований, изучения безопасности новой молекулы (ЛХТ-17-19).

- **Внедрение результатов диссертационного исследования в практику**

Важнейшие положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) Акт № 257 от 15.05.2023.

- **Этическая экспертиза научного исследования в Локальном этическом комитете (по медицинским и фармацевтическим наукам)**

Постановили: принять к сведению исследования в рамках диссертационной «Поиск эффективных механизмов контроля EGFR-опосредованного канцерогенеза» (исполнитель – Епишкина Анна Алексеевна). Выписка из заседания Локального этического Комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол заседания № 11-23 от 15.06.2023;

- **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, областям исследований по п. 2 «Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов», п. 3 «Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития

заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики»; паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, областям исследований по п. 1 «Выявление патогенетически обоснованных фармакологических мишеней», п. 2 «Разработка и фармакологическая валидация экспериментальных моделей патологических состояний» и п. 3 «Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*».

• Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По результатам исследования автором опубликовано 13 работ, в том числе 5 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 1 иные публикации по результатам исследования, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Оригинальные научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / ВАК при Минобрнауки России:

1) Внеэкспериментальный поиск молекул с противоопухолевой активностью и молекулярный докинг в ряду производных пиридинкарбоновых

кислот / О. Н. Дерябина, М. Ю. Кудрявцев, О. М. Тумутолова [и др.] // Вестник «Биомедицина и социология». - 2022. - Т. 7, № 3. - С. 37-42.

2) Изучение фармакологической активности лхт-17-19 в культурах клеток эпителиальных опухолей, экспрессирующих EGFR // М. Ю. Кудрявцев, О. Н. Тумутолова, О. Н. Дерябина [и др.] // Вестник «Биомедицина и социология». – 2022. - Т. 7, № 3. - С. 70-74.

3) Изучение фармакологической активности производного аминокромена при лечении рака молочной железы (экспериментальное исследование) // О. Н. Дерябина, Е. В. Блинова, Е. А. Самышина Е.А. [и др.] // Вестник «Биомедицина и социология». - 2022 - Т. 6, № 2. - С. 12-19.

4) К вопросу о противоопухолевой активности нового соединения – производного пиридина // М. Ю. Кудрявцев, О. Н. Дерябина, Е. А. Самышина [и др.] // Вестник «Биомедицина и социология». – 2021. - Т. 6, № 4. - С. 52-59.

5) Противоопухолевая активность некоторых перспективных соединений пиридинкарбоновых кислот в опухолевых клеточных культурах / А. А. Епишкина, О. Н. Дерябина, Д. С. Блинов [и др.] // Вестник «Биомедицина и социология». - 2023. - Т. 8, № 2. - С. 10-15.

Оригинальные научные статьи в научных изданиях, включенных в международные, индексируемые базы данных Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer:

1) Получение и механизм противоопухолевого действия соединения 4Н-аминокромена / Е. В. Блинова, М. Ю. Кудрявцев, Д. Н. Шимановский [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2022. - Т. 56, № 1. - С. 15-18.

2) Морфологическая оценка сосудистого микроокружения плоскоклеточных карцином легкого / А. А. Епишкина, А. М. Авдалян, Е. В. Гребенкин [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2022. – Т. 11, № 2. - С. 54–62.

3) Противоопухолевое действие нового производного дигидроакридина на экспериментальной модели рака мочевого пузыря / Е. В. Блинова, О. Н.

Дерябина, М. Ю. Кудрявцев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85, №9. – С. 22–26.

4) Antitumor activity of the novel pyridine derivative / E. V. Blinova, A. V. Epishkina, O. M. Tumutolova [et al.] // Research Results in Pharmacology. – 2022. – Vol. 8, № 3. - P. 81–86.

Иные публикации по теме диссертационного исследования:

1) Морфологическая и иммуногистохимическая валидация персонализированной биологической *in vivo* платформы немелкоклеточного рака легкого человека / А. А. Епишкина, О. Н. Дерябина, О. Н. Тумутолова [и др.] // Журнал Анатомии и гистопатологии. - 2022. - Т. 11, № 4. - С. 53-57.

Материалы конференций по теме диссертационного исследования:

1) Противоопухолевый потенциал производного пиридинкарбоновых кислот на *in vivo* модели тройного негативного рака молочной желез / А. А. Епишкина, О. Н. Дерябина, Е. В. Блинова [и др.] // материалы Всероссийского конгресса с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии». - 2023. – Т. 22, № 2. - С. 37.

2) Изучение противоопухолевого действия нового соединения пиридинкарбоновой кислоты на инновационной модели немелкоклеточного рака легкого / А. А. Епишкина, Е. В. Блинова, О. Н. Дерябина [и др.] // материалы IX Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2023» «Вопросы онкологии». - 2023. – Т. 69, № 3. - С. 460-461.

3) Изучение фармакологической эффективности производных пиридинкарбоновых кислот *in vitro* / Блинова Е. В., Дерябина О. Н., Епишкина А. А., Рубаданова Н. Р. // Огарёв-Online. - 2023. - № 3 (188).

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:

1) 19th International Federation of Associations of Anatomists Congress (London, United Kingdom, 2019);

2) XXVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2021);

3) XXIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2021);

4) Всероссийский конгресс с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (г. Москва, 2023);

5) Конкурс научных работ молодых ученых в 2023 году в рамках международного онкологического форума "Белые Ночи 2023" (г. Санкт-Петербург, 2023);

6) IX Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2023» (г. Санкт-Петербург, 2023);

7) Вторая конференция Московского общества медицинских генетиков "Преемственность в онкологии: от диагностики к лечению" (г. Екатеринбург, 2023)

Заключение

Диссертация соответствует требованиям п. 21 Положения о присуждении ученых степеней в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом от 06.06.2022 г. № 0692/Р, и не содержит заимствованного материала без ссылки на автора(ов).

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа Епишкиной Анны Алексеевны «Поиск эффективных механизмов контроля EGFR-опосредованного канцерогенеза» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.2. Патологическая анатомия, 3.3.6. Фармакология, клиническая.

Заключение принято на совместном заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Присутствовало на заседании 21 чел.

Результаты голосования: «за» – 21 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 1 от 19 июня 2023 г.

Председательствующий на заседании

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой оперативной хирургии и
топографической анатомии
Института клинической медицины
им. Н.В. Склифосовского
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
имени И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

С.С. Дыдыкин

