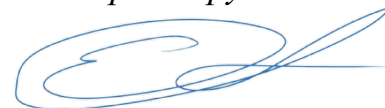


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Епишкина Анна Алексеевна

**Поиск эффективных механизмов контроля EGFR-опосредованного  
канцерогенеза**

3.3.2. Патологическая анатомия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор

Демура Татьяна Александровна

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ЗНАЧЕНИЕ EGFR СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РЕГУЛЯЦИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ(ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР) .....	18
1.1 Критическая роль в эпирегулиновом контроле ранних этапов канцерогенеза.....	21
1.1.1 Эпирегулиновая сигнализация в нормальных клетках и тканях .....	21
1.1.2 Эпирегулин активирует раннее развитие опухоли .....	22
1.2 Значение гиперэкспрессии EGFR в опухолевой прогрессии .....	25
1.2.1 Выживаемость пациентов и уровень экспрессии EGFR. Роль ингибиторов и препаратов антител к EGFR .....	27
1.2.2 Альтернативные сигнальные пути, задействованный в EGFR- ассоциированной опухолевой прогрессии.....	31
1.3 Участие EGFR-опосредованной сигнализации в метастазировании опухолей .....	33
1.4 Влияние активации EGFR на характеристику стволовых клеток опухоли .....	36
1.5 Клинико-патологические перспективы таргетирования EGFR-сигнального пути .....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Дизайн экспериментального исследования.....	44
2.2 Соответствие протокола исследования принципам биоэтики .....	46
2.3 Клеточные культуры EGFR-экспрессирующего рака желудка.....	48
2.3.1 Метод исследования жизнеспособности опухолевых клеток .....	49
2.3.2 Метод молекулярно-биологического определения драйверной киназы в опухолевых клетках .....	50

2.4 Органоидная опухолеподобная модель EGFR-позитивного рака молочной железы .....	51
2.4.1 Метод определения жизнеспособности клеток органоидной культуры .....	52
2.4.2 Методы патоморфологической и молекулярной валидации подтипа опухолевых клеток органоидного рака молочной железы .....	53
2.5 Ксенографтная животная модель EGFR-эксперессирующего немелкоклеточного рака легкого .....	57
2.5.1 Лабораторные животные: условия содержания, процедуры гуманизации....	57
2.5.2 Постановка модели .....	58
2.6 Исследуемое соединение и препарат сравнения.....	60
2.7 Метод молекулярной идентификации ингибиторной активности ЛХТ-17-19 в отношении киназного домена EGFR.....	62
2.8 Методы статистического анализа результатов диссертационного исследования.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	65
3.1 Изучение анти-EGFR ингибиторного потенциала ЛХТ-17-19 в двух- и трехмерных культурах опухолевых клеток человека.....	65
3.1.1 Молекулярная идентификация активных центров киназного домена макромолекулы EGFR для контроля активности фермента .....	66
3.1.2 Противоопухолевая активность ЛХТ-17-19 в различных культурах клеток EGFR-эксперессирующего рака желудка .....	69
3.1.3 Органоидная опухолеподобная культура EGFR-эксперессирующего рака молочной железы как модель для изучения активности соединения ЛХТ-17-19 .....	73
3.2 Ксенографтная модель EGFR-эксперессирующего немелкоклеточного рака легкого – молекулярная и патоморфологическая валидация, анализ активности потенциального ингибитора.....	79

3.2.1 Патоморфологическая и молекулярная валидация ксенографтной опухоли.....	80
3.2.2 Анализ активности ингибитора тирозинкиназ – соединения ЛХТ-17-19 на валидированной ксенографтной модели EGFR-экспрессирующего рака легкого .....	84
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	90
4.1 Итоги выполнения диссертационного исследования .....	99
4.2 Перспективы дальнейшего развития темы настоящего диссертационного исследования.....	100
ВЫВОДЫ .....	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR/ErbB1) представляет собой рецепторную тирозинкиназу семейства белков ErbB (ErbB1-4). EGFR подвергается гомо- или гетероасимметричной димеризации в ответ на стимуляцию лигандом, что впоследствии приводит к аутофосфорилированию EGFR по ключевым остаткам тирозина в его внутриклеточном домене, это, в свою очередь, активирует нижестоящие сигнальные каскады, регулирующие рост клеток [1, 2].

Изменения EGFR (гиперэкспрессия или соматические мутации, активирующие киназу) часто встречаются при злокачественных новообразованиях (ЗНО) [3]. Гиперэкспрессия EGFR связана с увеличением выживаемости опухолевых клеток, метастазированием, инвазией, резистентностью к химиотерапии и плохим прогнозом [4, 5]. Как моноклональные антитела, так и низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы для блокирования/ингибирования активности EGFR были разработаны в качестве таргетной терапии для EGFR-зависимых видов злокачественных новообразований (ЗНО) [1, 2, 5].

Ингибиторы тирозинкиназы представляют собой небольшие молекулы хиναзолинового происхождения, которые ингибируют активность киназы EGFR путем обратимого или необратимого связывания с карманом связывания аденозинтрифосфата (АТФ) в киназном домене [6]. Однако в клинике препараты эффективны только у 10-40% пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) с мутациями EGFR [7-10]. Возникновение приобретенной резистентности приводит к прогрессированию заболевания у всех пациентов, получавших ингибиторы тирозинкиназы, со средней выживаемостью без прогрессирования от 9 до 13 месяцев [11]. Приобретенной резистентности часто способствует молекулярная адаптация, которая может происходить на двух уровнях. Первым и наиболее распространенным механизмом резистентности

является развитие соматических мутаций EGFR, таких как T790M и C797S, которые снижают чувствительность к лечению ингибиторами [12]. Второй тип резистентного механизма включает молекулярные изменения, которые приводят к активации альтернативных онкогенных путей, регулирующих рост и выживание клеток. Они могут включать амплификацию онкогенного RTK-c-Met (receptor tyrosine kinases-c-MNNG HOS transforming gene) и мутации усиления функции Ras/Raf/MEK (retrovirus associated DNA sequences/rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen-activated protein kinase kinase) и сигнальных путей PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B) [13].

Исследования последних лет показали, что С-концевой нефосфорилируемый мутантный вариант EGFR является онкогенным [14], что ясно указывает на то, что онкогенный потенциал EGFR заключается в его независимых от других внутриклеточных киназ функциях. Более того, подавление экспрессии белка EGFR вызывает гибель опухолевых клеток за счет индукции митофагии [15].

Все вышеизложенное обуславливает сохраняющийся высокий интерес как идентификации отдельных элементов роли EGFR в формировании злокачественных новообразований и, в частности, патоморфологических вариантов опухолевого процесса, так и к поиску эффективных путей фармакологического контроля над киназной активностью фермента в зависимости от состояния кодирующего его гена, что обуславливает актуальность и значимость настоящего диссертационного исследования для медицинской науки и практики.

### **Степень разработанности темы 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 [2].

В патологических условиях она вовлекается в онкогенную трансформацию и ускорение опухолевого роста различных новообразований, таких как рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, уротелиальный рак, глиобластома и др. [5-7]. Ингибиторы EGFR представляют собой надежную стратегию противораковой химиотерапии. В то же время опухолевой ответ часто бывает скомпрометирован развитием ранней резистентности, обычно связанной с мутациями гена *EGFR* [10, 11]. К настоящему времени предложены различные подходы к профилактике резистентности фермента к противоопухолевому воздействию. Среди прочего, аллостерическая модуляция активности тирозинкиназы привела к созданию так называемых аллостерических EGFR-деградеров [12, 13]. Последние, как сообщают авторы, смогли преодолеть резистентность опухолевых клеток, мутантных по гену EGFR.

Также в результате совместного многолетнего сотрудничества ученых ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), АО «ВНЦ БАВ», ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» были успешно обоснованы общие принципы формирования валидных экспериментальных моделей патологических состояний, и, в частности, канцерогенеза, для проведения патологоанатомических и фармакологических исследований [16-20].

Производные акридина являются хорошо известным источником многих противоопухолевых препаратов [16-18]. Научным коллективом Всесоюзного научного центра безопасности биологически активных соединений в ходе широких поисков новых химических структур с малой молекулярной массой и противоопухолевыми свойствами были отобраны перспективные производные дигидроакридона с различными амино- и карбоновыми фрагментами.

Количественный структурно-активный анализ химических структур, проведенный в дальнейшем с помощью программы PASS<sup>®</sup> показал, что наиболее активное соединение ЛХТ-17-19 обладает общей противоопухолевой активностью с прогнозируемой оценкой выше 0,87 и прогностическим

ингибирующим свойством EGFR ( $P_a > 0,9$ ). Не менее выгодным было и то, что это производное, 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиоват, может быть относительно просто синтезировано в лабораторных условиях.

### Цель и задачи

Разработать эффективный способ контроля канцерогенеза, обусловленного активацией EGFR-ассоциированного драйверного механизма, на примере злокачественных новообразований желудка, молочной железы и легкого.

1. Определить структуру молекулярных мишеней для потенциального таргетного воздействия в киназном домене макромолекулы рецептора эпидермального фактора роста.

2. В культурах опухолевых клеток рака желудка AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующих киназу EGFR дикого типа, установить цитотоксический потенциал соединения дигидроакридона ЛХТ-17-19, а также определить степень подавления веществом активной – фосфорилированной формы – киназного драйвера.

3. Разработать трехмерную опухолеподобную органоидную трансляционную модель EGFR-экспрессирующего рака молочной железы и провести ее патоморфологическую, иммунофенотипическую и молекулярно-биологическую валидацию.

4. Определить противоопухолевый потенциал 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиовата на органоидной модели EGFR-экспрессирующего рака молочной железы, в том числе с учетом активности онкогенной тирозинкиназы.

5. В организме гуманизированных иммунодефицитных мышей воспроизвести ксенографтный EGFR-экспрессирующий немелкоклеточный рак легкого, несущий мутацию драйверного гена, соответствующий по иммунофенотипу и патоморфологии исходной опухолевой ткани.



6. Изучить противоопухолевую активность соединения ЛХТ-17-19 при курсовом введении на ксенографтной модели EGFR-экспрессирующего немелкоклеточного рака легкого, в том числе определить влияние вещества на рост и метастазирование опухоли, продолжительность жизни животных – носителей ксенографта.

### **Научная новизна**

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)-ОН к киназному домену макромолекулы EGFR. Было показано, что комплекс связывания образовывается за счет  $\pi$ - $\sigma$ -связей между ароматическими ядрами фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Leu820, Leu694 и Val702, при этом, алкильный и  $\pi$ -алкильный комплексы стабилизируются взаимодействиями метильных групп в положении 3 и фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН 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.

Впервые 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 (estrogen receptor)-отрицательную, PR (progesteron receptor)-отрицательную, Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2)-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.

Впервые показано, что соединение дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН 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 дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН 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.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

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 ксенотрансплантата.

Соединения дигидроакридона и, в частности, 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН 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.

## Методология и методы исследования

На первом этапе была сформулирована научная гипотеза исследования, определены методы работы, а также необходимые материалы для ее успешного выполнения. Также в рамках первого этапа для формулирования гипотезы проведено реферирование широкого спектра зарубежных и отечественных периодических источников.

Второй этап посвящен обоснованию эффективности контроля EGFR-ассоциированного драйверного пути в росте культуры опухолевых клеток желудка. Для этих целей были выбраны культуры немутантного штамма опухоли. В своей работе использован МТТ-тест для измерения клеточной метаболической активности как индикатора жизнеспособности, пролиферации и цитотоксичности клеток EGFR-экспрессирующих культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1. Количественное определение активной (фосфорилированной формы) тирозинкиназы проведено методом вестерн-блоттинга. Для направленного цитологически-подтвержденного отбора фармакологического агента – потенциального молекулярно-направленного таргетного анти-EGFR лекарственного средства использован молекулярный докинг.

На третьем этапе противоопухолевые свойства молекулярно-направленного средства ЛХТ-17-19 оценивались на органоидной (patient-derived organoid – PDO) модели рака молочной железы, экспрессирующего дикий тип EGFR. Для формирования органоидов использована свежая опухолевая ткань 68-летней пациентки с билатеральным раком молочной железы, ранее не подвергавшимся химиотерапии, подтвержденный морфологически и иммуногистохимически (ИГХ). Жизнеспособность клеток органоидов рака молочной железы после 7-дневного присутствия ЛХТ-17-19 оценивалась с использованием теста на основе MTS.

Четвертый этап состоял из определения клиничко-патоморфологических особенностей течения ксенографтного гетеротопического опухолевого процесса немелкоклеточной карциномы легкого с наличием экспрессии EGFR сигнального пути и драйверных мутаций в соответствующем гене, а также особенности ответа

опухоли на направленное молекулярно-биологическое воздействие таргетным веществом ЛХТ-17-19. Гетеротопическая животная модель ксенотрансплантата (PDX) экспрессирующей EGFR карциномы легкого, полученной от пациента, была воспроизведена у самцов мышей BALB/c *nu/nu* в возрасте 10 недель.

При работе с трехмерными клеточными культурами и ксенотрансплантатом, а также исходными опухолевыми тканями для патоморфологической и иммунофенотипической валидации применялись методы светооптической микроскопии и иммуногистохимии. Использована полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR) для обнаружения мутаций гена *EGFR*.

Для анализа полученных результатов применялись методы вариационной статистики, анализ кривых выживаемости

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

1. Метаболическая активность и пролиферация EGFR-экспрессирующих культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1 обусловлена внутриклеточным содержанием фосфорилированной (активной) формы рецепторной тирозинкиназы дикого типа, при этом ингибирование роста и гибель опухолевых клеток под действием 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидро-акридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиват (соединение ЛХТ-17-19) связано с высоким сродством молекулы к сайту связывания киназного домена фермента, подчиняется дозозависимой закономерности и обуславливает истощение внутриклеточного пула активированной формы EGFR.

2. *Ex vivo* транслокация опухолевых клеток гормонально-зависимого EGFR-экспрессирующего рака молочной железы сопровождается инверсией экспрессии эстрогеновых рецепторов, протекает по пути повышения злокачественности фенотипа опухоли без потери активности внутриклеточного драйверного киназного механизма, что, тем не менее не снижает чувствительности клеток формирующейся трехмерной опухолевой культуры к молекулярно-направленному циторедуктивному действию производного дигидроакридона ЛХТ-17-19.

3. В результате трехэтапной перевивки образца EGFR-экспрессирующего немелкоклеточного рака легкого формируется патоморфологически и иммунофенотипически эквивалентный исходному ксенографт опухоли в организме иммунодефицитных мышей, курсовое воздействие на который 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидро-акридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиват приводит к торможению роста и метастазирования опухоли, причем, лекарственный патоморфоз характеризуется.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

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*».

### **Степень достоверности и апробации результатов**

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 соответствии с выбранным уровнем статистической достоверности и мощности, корректно выбранными методами медицинской статистики.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном заседании Института патоморфологии и цифровой патологии, кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №1 от 19.06.2023 г.

Результаты представленного диссертационного исследования докладывались и обсуждались на 19th International Federation of Associations of Anatomists Congress (London, United Kingdom, 2019), XXVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2021), XXIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2021), Всероссийском конгрессе с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (Москва, 2023), конкурсе научных работ молодых ученых в 2023 году в рамках IX Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2023» (Санкт-Петербург, 2023), IX Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2023» (Санкт-Петербург, 2023), Второй конференции Московского общества медицинских генетиков "Преемственность в онкологии: от диагностики к лечению" (Екатеринбург, 2023).

### **Личный вклад автора**

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

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

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертационного исследования 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 иная публикация по результатам исследования, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

### **Объем и структура работы**

Диссертация имеет традиционную структуру, содержит следующие разделы: введение, главу 1 (обзор литературы), главу 2 (материал и методы исследования), главу 3 (результаты собственных исследований) и главу 4 (заключение).



Диссертация изложена на 125 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью четырьмя рисунками и двумя таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 167 работ, из которых 7 работ отечественных и 160 зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ЗНАЧЕНИЕ EGFR СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РЕГУЛЯЦИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Активация внутриклеточного сигнального пути эпидермального фактора роста и его рецептора (EGF/EGFR) играет одну из ключевых ролей в опухолевой прогрессии и тесно связана с экспрессией природного активирующего лиганда EGFR – гомолога вирусного онкогена эритробластной лейкемии (ERBB). В свою очередь установлено, что экспрессия ERBB повышается в процессе формирования опухолевого микроокружения, прогрессии опухоли и при формировании противоопухолевой химиорезистентности [21,22]. ERBB семейство включает рецепторные трансмембранные тирозинкиназы, такие как ERBB1/EGFR/HER (человеческий EGF рецептор) 1 комплекс, ERBB2/HER2/Neu комплекс, ERBB3/HER3 комплекс и ERBB4/HER4 комплекс [22].

Активированный лиганд ERBB опосредует регуляцию различных сигнальных путей, включая такие как RAS/RAF, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназу (PI3K)/АКТ (серин / треонинпротеинкиназу), фосфолипазу C (PLC)- $\gamma$ 1, а также сигнальных путей и активаторов транскрипции (STAT) [22,23]. Несколько молекулярных лигандов могут связываться с EGFR, включая EGF, эпиген, трансформирующий фактор роста (TGF)- $\alpha$ , амфирегулин (AREG), эфирегулин (EREG), бетацеллюлин (BTC) и гепарин-связывающий EGF (HB-EGF). Схематические взаимоотношение перечисленных лигандов с различными функциональными киназными доменами показано на рисунке 1.

Трансмембранные лиганды EGFR включают N-концевой сигнальный пептид, пропептидную область, EGF-подобный короткий околосмембранный фрагмент, гидрофобный трансмембранный домен и цитоплазматический домен (Рисунок 1). Нейрегулины (NRG) представляют собой семейство, содержащее EGF-подобные доменные белки; они играют существенную роль в развитии головного мозга человека [24] и различных видов злокачественных опухолей [22,25-27]. Наиболее изученные NRG, такие как ген *NRG1*, продуцируют шесть

различных типов и 33 изоформы сплайсинга из-за разных сайтов инициации транскрипции и альтернативного сплайсинга [22,24]. Белки NRG в основном содержат EGF-подобные и трансмембранные домены; однако типоспецифичная N-концевая область (тип I, II и IV-VI NRG1), иммуноглобулиноподобный домен и сайт гликозилирования зависят от изоформы макромолекулы [22,28, 29].

Кроме того, идентичность общей белковой последовательности в этих лигандах низкая [22,30], а консервативный модуль EGF, включающий шесть остатков аминокислоты цистеин, расположен в виде трех дисульфидных мостиков (рисунок 1). Расстояние между EGF-совместимого домена в семи лигандах EGFR может быть представлено в виде цистеинового паттерна CX7CX4–5CX10CXCX8C (X может быть любой аминокислотой). Примечательно, что недавние исследования показали, что остаток N57 EREG является ключевым для взаимодействия с доменами I и III EGFR [22,31]. EGF уникален тем, что существует девять вариантов EGF, хотя только тот, который примыкает к клеточной мембране, выполняет функцию домена, связывающего EGFR (Рисунок 1).

EREG и HB-EGF содержат дополнительный гепарин-связывающий домен. Функциональный модуль EGF расположен примерно в 25 остатках трансмембранного домена. Наличие расстояния между дополнительными специфическими остатками дополнительно отличает лиганды EGFR от NRG, содержащих модули EGF на структурном уровне, и определяет высокоаффинное связывание с EGFR [22,32]. Более того, NRG1 и 2 избирательно связываются с ERBB3 (рисунок 1). Лиганды, такие как BTC, HB-EGF, EREG и NRG1-4, взаимодействуют с ERBB4. Лиганды ERBB связываются с внеклеточным доменом рецепторов ERBB1, ERBB3 и ERBB4 с образованием активных гомодимеров или гетеродимеров. Однако лиганды не связываются напрямую с ERBB2 в лиганд-активированном состоянии, способствуя гомодимеризации.

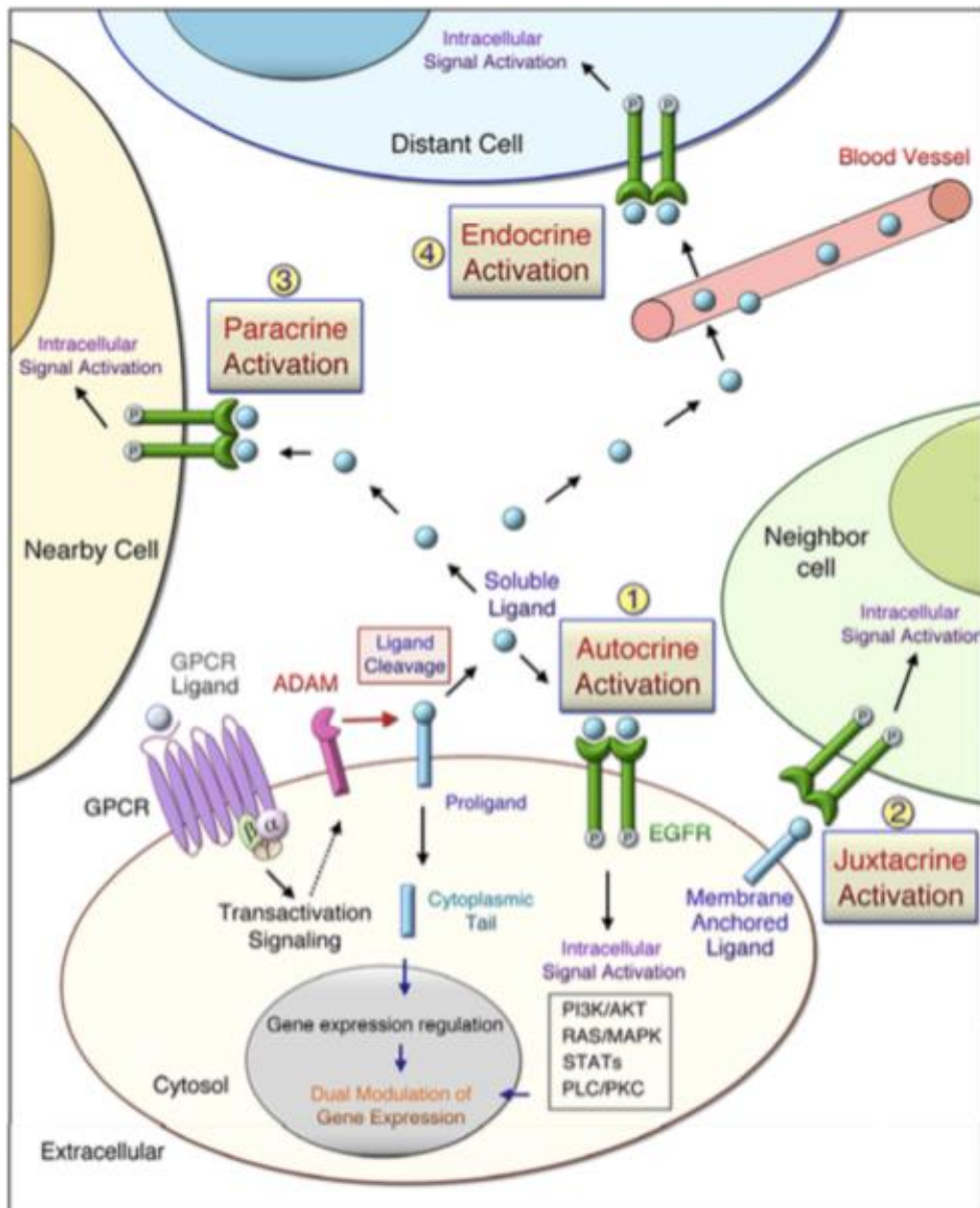


Рисунок 1 – Схематические взаимоотношение лигандов EGFR с различными функциональными киназными доменами по [32] в редакции автора

Кроме того, белки ERBB2 могут активироваться посредством взаимодействия с другими ERBB. Рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), стимулируют специфические металлопротеиназы, такие как представители семейства дезинтегрин и металлопротеиназы (ADAM), что приводит к расщеплению пролиганда EGFR и запуску трансактивного каскада EGFR [22,33] (рисунок 1).

Шеддинг эктодомена возникает при различных физиологических реакциях, а эффективность расщепления в основном определяется специфической последовательностью в сайте расщепления и длиной проксимального к мембране домена [22,14]. Растворимые лиганды связываются с рецепторами, активируя внутриклеточную передачу сигналов в клетке-мишени, соседних клетках и отдаленных клетках посредством аутокринных, паракринных (или юстакринных) и эндокринных путей соответственно [22,32]. Опосредованные EGFR сигнальные пути могут быть активированы путем связывания с растворимыми лигандами или лигандами, закрепленными на мембране, посредством юстакринового пути. Помимо действия растворимых лигандов, свободный цитоплазматический участок (СТ) этих лигандов (например, про-AREG СТ) необходим для базолатеральной сортировки [22,34, 35], а про-HBE-GF СТ может напрямую регулировать экспрессию генов [36]. Эффективность и специфичность внутриклеточных сигнальных путей регулируются специфическими лигандами, димеризацией рецепторов и взаимодействующими белками, которые связываются с фосфорилированными доменами ERBB [22,37].

## **1.1 Критическая роль в эпирегулиновом контроле ранних этапов канцерогенеза**

### **1.1.1 Эпирегулиновая сигнализация в нормальных клетках и тканях**

Ген эпирегулина (*EREG*) расположен на хромосоме 4q13.3 человека и имеет сходство последовательностей на 24–50% с другими членами семейства EGF [38]. Экспрессия гена *EREG* транскрипционно регулируется инсулином [39], Sp1 (specificity protein 1), AP-1 (activator protein-1), NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) [40] и AP-2 (activator protein-2) [41]. *EREG* изначально экспрессируется как трансмембранная проформа, протеолитически расщепляемая ADAM17 с высвобождением растворимой формы примерно из 50 аминокислот [42] (рисунок 1). Секретируемый человеком *EREG* обладает биологической активностью за счет

стимуляции синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) при поддержании нормального роста клеток [43]. Связывание растворимого EREG с ERBB, таким как EGFR и ERBB4, инициирует нижестоящий сигнальный каскад [43].

EREG играет критическую роль в нормальной регуляции физиологического стресса, воспаления и ангиогенеза. Агонисты GPCR, в том числе эндотелин-1, ангиотензин II и  $\alpha$ -тромбин, индуцируют расщепление трансмембранного белка EREG, что приводит к высвобождению зрелого EREG, что может способствовать пролиферации гладкомышечных клеток сосудов (ГТМК) и ремоделированию сосудов [44]. В отличие от контрольных клеток дикого типа, EREG-нулевые макрофаги высвобождали низкие уровни провоспалительных цитокинов при стимуляции агонистами Toll-подобных рецепторов [45]. Однако EREG экспрессируется в кератиноцитах и резидентных тканевых макрофагах, где маркер регулирует гомеостаз кожи, а дефицит EREG вызывает развитие хронического дерматита у мышей. Истощение EREG в макрофагах или дендритных клетках снижает продукцию интерлейкина-6 (IL-6) в ответ на стимуляцию пептидогликана [46]. Заживление кожных эксцизионных ран и воспаление индуцируют экспрессию нескольких генов, таких как *EREG* и *VEGF-B* (vascular endothelial growth factor - B), которые способствуют ангиогенезу [47]. Экспрессия EREG в большинстве тканей человека и мыши низкая или отсутствует [48, 49]. Воспаление и ангиогенез – это процессы, которые играют важную роль в развитии злокачественных новообразований, включая инициацию канцерогенеза, опухоль *in situ* и поздних стадий опухолей [22,50]. Примечательно, что повышенная экспрессия EREG вовлечена в активацию воспаления во время ранней инициации опухоли.

### 1.1.2 Эпирегулин активировывает раннее развитие опухоли

Установлено, что ген *EREG* сверхэкспрессируется в клетках немелкоклеточного рака легкого с мутациями в гене гомолога вирусного онкогена саркомы крысы Кирстена (KRAS) или иммортализованных клетках,

экспрессирующих мутантный KRAS; однако уровень экспрессии фактора низок в незлокачественных бронхиальных эпителиальных клетках человека [51]. EREG играет решающую роль в hTERT (human telomerase reverse transcriptase)-опосредованной иммортализации клеток и трансформации фибробластов [52]. Физиологическое действие EREG-опосредованной передачи сигналов ERBB2 может контролировать дифференцировку эпителиальных клеток при совместном культивировании эпителиальных клеток дыхательных путей человека с EREG-экспрессирующими фибробластами [53]. Более того, компрессионный стресс индуцировал экспрессию EREG в бронхиальных эпителиальных клетках человека, а нижележащие сигнальные пути EREG-опосредованного ERBB подавлялись ингибитором EGFR [54].

Иммуногистохимический (ИГХ) анализ выявил высокую экспрессию (91,7%) белка EREG в карциномах тимуса, что указывает на то, что EREG обычно экспрессируется в опухолевых тканях вилочковой железы [55]. Экспрессию и распределение агрегированного белка EREG, исследуемого с помощью ИГХ окрашивания, можно использовать в качестве ранних индикаторов развития рака яичников [56]. EREG необходим для нормальной трансформации фибробластов и может индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) через сигнальные пути JAK2/STAT3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3) и IL-6 в клетках плоскоклеточного рака полости рта [57]. По сравнению с нормальным эпителием молочной железы, EREG индуцировался при протоковой карциноме *in situ*, а EREG и MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) коррелировали в подмножестве гистологических образцов этого варианта рака молочной железы [58]. Кроме того, гиперэкспрессия EREG и MMP-1 увеличивает выживаемость опухолевых клеток при раке молочной железы на ранней стадии. Онкогенная роль длинной межгенной небелковой кодирующей рибонуклеиновой кислоты 885 (РНК 885) (LINC00885) коррелирует с ранним прогрессированием рака молочной железы, что может способствовать пролиферации и выживанию клеток посредством путей EREG/EGFR и FOXM1 (forkhead box protein M1) [59].

Длительное воздействие аэрополлютантов в значительной степени связано с ухудшением функции легких и прогрессированием рака легкого [60]. 2,3,7,8-Тетрахлордibenзо-*p*-диоксин индуцирует экспрессию EREG посредством связывания активированного арильного углеводородного рецептора с промотором EREG, который включает диоксин-чувствительный элемент и три сайта связывания Sp1 [61].

Воздействие переносимых по воздуху загрязняющих веществ, таких как полициклические ароматические углеводороды, может повышать экспрессию EREG через сигнальный путь EGFR, тем самым способствуя прогрессированию опухоли. Уровень экспрессии гена *EREG* обычно низкий в неопухолевых клетках, но высокий в различных опухолях, в том числе в опухолях легких [51]. Истощение EREG уменьшало образование опухолей легких в первичной двухстадийной мышинной модели, а воздействие 3-метилхолантрена и бутилированного гидрокситолуола вызывало возникновение и прогрессирование опухоли соответственно [62].

На ранней стадии (12 недель) воспаление (макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты и уровни CXCL1/KC (chemokine (C-X-C motif) ligand 1/keratinocyte-derived chemokine)) было значительно снижено у мышей с нокаутом EREG (EREG<sup>-/-</sup>) по сравнению с контрольными мышами дикого типа (EREG<sup>+/+</sup>). Через 20 недель развитие опухоли также значительно уменьшилось у мышей с нокаутом EREG (EREG<sup>-/-</sup>) по сравнению с контрольной группой дикого типа. Эти данные показывают, что EREG играет критическую роль в возникновении и прогрессировании рака легкого.

Некоторые канцерогены и их метаболиты вызывают активацию внутриклеточного онкогена (например, KRAS) или блокаду гена-супрессора опухоли (например, p53), что в конечном итоге вызывает прогрессирование рака легкого [63]. Недавние результаты показали, что потенциальный канцероген, 3-нитробензантрон (3-NBA), вызывает подавление белка p53 и трансформацию эпителиальных клеток легких. Гиперэкспрессия EREG заметно приводит к онкогенезу в 3-NBA-трансформированных клетках посредством активации путей



PI3K/АКТ и MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) [64]. Повышенные уровни EREG активируют нижестоящие пути EGFR и синергически усиливают передачу сигналов IL-6/STAT3 при прогрессировании злокачественной опухоли [65]. Апикальный EREG поддерживает активацию фосфорилирования EGFR и нижестоящих сигнальных путей; однако базолатеральная стимуляция EREG приводит только к временному фосфорилированию тирозина EGFR. Более того, апикальный искаженный трафик EREG (Y156A) приводит к более крупным, высокопролиферативным и агрессивным опухолям. Дефицит EREG у мышей способствовал индуцированному декстрансульфатом натрия повреждению кишечника и не влиял на развитие опухоли кишечника [66].

Действие EREG стромального происхождения предотвращает повреждение кишечника и вызывает колит-ассоциированный рак [66, 67]. Кроме того, Yар (yes-associated protein)-зависимая передача сигналов активации EGFR стимулирует инициацию рака в кишечнике, тем самым способствуя регенерации и онкогенезу [68]. В клетках микроокружения ядерный Yар способствует экспрессии EREG и, следовательно, активирует сигнальный путь EGFR [69]. Атипично высокие концентрации EREG, но не других лигандов EGFR (таких как EGF и AREG), могут предотвращать рост Yар-нулевых органоидов [68]. Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенный уровень стромального EREG компенсирует функцию регенерации за счет потери Yар *in vivo*.

## 1.2 Значение гиперэкспрессии EGFR в опухолевой прогрессии

Активированный путь EREG/EGFR регулирует различные клеточные функции, в том числе пролиферацию опухолевых клеток, их выживание, метастазирование и ангиогенез, тем самым формируя фенотипы злокачественных опухолей [70]. Клинико-патологические исследования и исследования *in vitro* показали, что экспрессия EGFR имеет прогностическое значение при некоторых видах злокачественных опухолей человека. EGFR обычно гиперэкспрессируется

при таких опухолях, как рак мочевого пузыря [71-73], опухоли головного мозга [74-77], рак молочной железы [58, 59, 78-83], рак яичников и шейки матки [56, 84], колоректальный рак [67, 85-92], рак головы и шеи [31, 57, 93-96], гепатоцеллюлярный рак [97, 98], рак легкого [51, 99-102], рак поджелудочной железы [103], рак предстательной железы [104] ], рак желудка (РЖ) [105, 106] и рак тимуса [105].

Анализ ИГХ показал, что экспрессия EREG наблюдалась в 237 (64,7%) из 366 биопсийных тканей, полученных от пациентов с немелкоклеточным раком легкого, и коррелировала с отдаленными метастазами и более короткой выживаемостью [100]. Белки EREG были значительно гиперэкспрессированы при аденокарциномах легких и коррелировали с агрессивными опухолевыми фенотипами [51]. Анализ выживаемости опухолевых генов при раке шейки матки показал, что EREG может вызывать репликативное бессмертие [84]. При раке мочевого пузыря экспрессия EREG была увеличена у пациентов с поздней стадией заболевания, а высокая экспрессия мРНК EREG была в значительной степени связана с плохими результатами выживания [71]. Уровень белка EREG был повышен в тканях рака желудка и коррелировал со стадией метастазирования опухоли в лимфатические узлы и более короткой общей выживаемостью [106]. Кроме того, повышенная экспрессия мРНК EREG была связана с короткой общей выживаемостью у пациентов с раком яичников и шейки матки [22,93].

Уровень белка EREG в тканях колоректального рака был достоверно связан с инвазией и отдаленным метастазированием опухоли [85]. Кроме того, высокая экспрессия мРНК EREG (но не AREG) коррелировала с более длительной общей выживаемостью и выживаемостью без прогрессирования у пациентов, получавших химиотерапию первой линии на основе иринотекана [68]. Более того, EREG может служить потенциальным прогностическим маркером, а высокие уровни белка EREG были связаны с лучшими результатами выживаемости у пациентов с колоректальным раком, получающих неoadьювантную одновременную химиолучевую терапию [91]. Повышенная экспрессия белка EREG у пациентов с глиобластомой сильно коррелировала с более высокой

стадией опухоли и плохой общей выживаемостью [75]. Хотя высокий уровень белка EREG был обнаружен в тканях рака желудка и связан с неблагоприятными исходами [106], низкая экспрессия EREG может быть вызвана эпигенетическими регуляторными механизмами, такими как аберрантная модификация гистонов и метилирование ДНК, у части пациентов с данной опухолью [105].

### **1.2.1 Выживаемость пациентов и уровень экспрессии EGFR. Роль ингибиторов и препаратов антител к EGFR**

Результаты выживаемости пациентов с раком легкого в значительной степени связаны с мутациями EGFR (такими как L858R и делеция или вставка экзона 19) или гиперэкспрессией членов семейства ERBB, которые повышают активность EGFR за счет увеличения димеризации и сродства к АТФ [107, 108]. Специфическое ингибирование EGFR с помощью лечения ингибиторами тирозинкиназы (ИТК), такими как гефитиниб и эрлотиниб, первоначально показало удовлетворительные клинические результаты [109]. Хотя пациенты с метастатическим колоректальным раком демонстрировали хороший ответ на препараты антител к EGFR, такие как цетуксимаб или панитумумаб, наблюдали лекарственную устойчивость опухолевых клеток [110, 111].

У большинства пациентов с колоректальным раком, получающих анти-EGFR-терапию, наблюдается повышенное число копий EGFR; однако степень экспрессии EGFR, по-видимому, не коррелирует с блокадой передачи сигналов EGFR. Увеличение количества копий гена EGFR в основном связано с лучшим результатом лечения моноклональными антителами против EGFR, особенно у пациентов с KRAS дикого типа [112]. Однако у пациентов с мутацией KRAS разницы часто не было. Компенсация альтернативных сигнальных путей при различных онкогенных мутациях и различных клеточных пейзажах, включая аберрантную экспрессию EREG, может приводить к неблагоприятным результатам анти-EGFR-терапии по отношению различным опухолевым клеткам [111, 113].

В клетках немелкоклеточного рака легкого EREG действует как лиганд ERBB и потенциальная мишень транскрипции онкогенной передачи сигналов KRAS [51]. Онкогенная активация сигнального пути MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase) мутантными генами *EGFR*, *KRAS* или протоонкоген B-raf (*BRAF*) может вызывать гиперэкспрессию EREG [99]. Когда количество лигандов EGFR увеличивается, эти лиганды могут связываться с EGFR/ERBB и активировать нижестоящие сигнальные пути, включая MEK/ERK и PI3K/AKT, посредством механизма аутокринной петли. У пациентов с немелкоклеточным раком легкого с высокой экспрессией EREG и мутациями KRAS была более короткая общая выживаемость и безрецидивная выживаемость, чем у пациентов с низкой экспрессией EREG и KRAS дикого типа [99]. Кроме того, уровни мРНК EREG выше в тканях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, чем в нормальных тканях и тканях при хроническом панкреатите [103]. Результаты анализа полноэкзомного секвенирования также показали, что экспрессия EREG индуцируется в онкогенных KRAS-управляемых протоковых аденокарциномах поджелудочной железы [114]. Примечательно, что мутации онкогенного драйвера, такие как EGFR и KRAS, обычно наблюдаются при аденокарциноме легкого [115]. Более того, функции, способствующие развитию опухоли, блокировались антителами против EREG или ингибиторами тирозинкиназы (EGFR-ТКИ, гефитиниб или эрлотиниб) при немелкоклеточном раке легкого [100]. Таким образом, считается вероятным, что подгруппа пациентов с немелкоклеточным раком легкого с высокой экспрессией EREG и драйверной мутацией благоприятна для лечения ингибиторами или антителами к EGFR или направленного лечения анти-EREG.

Моноклональные антитела, такие как цетуксимаб и панитумумаб, нацелены на внеклеточный домен EGFR. Биологический смысл этого заключается в необходимости блокировать связывание лиганда и внутриклеточную передачу сигналов, тем самым ингибируя пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование [109]. Цетуксимаб и панитумумаб были одобрены для лечения

прогрессирующего колоректального рака и поздней стадии рака головы и шеи и метастатического колоректального рака соответственно [111].

Преимущество монотерапии цетуксимабом или панитумумабом отдельно или в комбинации с химиотерапией ограничено только пациентами с метастатическим колоректальным раком с KRAS дикого типа и NRAS (гомологом вирусного онкогена нейробластомы RAS) [116-121]. Однако использование антител к EGFR у пациентов с конститутивно активированным RAS имело плохие результаты лечения [113]. Лиганды AREG и EREG обычно высоко экспрессируются при колоректальном раке и активируют нижестоящие пути EGFR [85, 118]. AREG и EREG активировали нижележащую сигнальную ось EGFR-RAS-MAPK, которая представляет собой положительную аутокринную петлю, которая, как предполагалось, является механизмом регуляции опухолевой прогрессии [122]. В одном из опубликованных мета-анализов у пациентов с метастатическим колоректальным раком с RAS дикого типа, а также с гиперэкспрессией AREG и EREG, получавших цетуксимаб или панитумумаб, наблюдались лучшие результаты выживаемости, чем у других пациентов [123]. Повышенная экспрессия генов AREG или EREG коррелирует с преимуществами терапии против EGFR у нерандомизированных пациентов с распространенным колоректальным раком и KRAS дикого типа [117, 124, 125]. В исследовании III фазы (CO.17) у пациентов с распространенным колоректальным раком с KRAS дикого типа и высокой экспрессией мРНК EREG, но не низкой экспрессией EREG, наблюдалась пролонгированная общая и беспрогрессивная выживаемость после терапии цетуксимабом [126].

Терапевтическая эффективность панитумумаба в виде монотерапии и в сочетании с химиотерапией FOLFOX4, включающей оксалиплатин, фторурацил и лейковорин, у пациентов с распространенным колоректальным раком с мутациями RAS была ниже, чем у пациентов с RAS дикого типа [120]. Эти результаты свидетельствуют о том, что пациенты с распространенным колоректальным раком с повышенной передачей сигналов EGFR будут более чувствительны к анти-EGFR терапии. Однако у пациентов с распространенным

колоректальным раком с RAS дикого типа не было отмечено улучшения общей выживаемости при лечении комбинированной терапией иринотеканом и панитумумабом [121].

Тем не менее, крупное рандомизированное клиническое исследование (PICCOLO) показало, что высокая экспрессия лигандов EGFR, таких как AREG и EREG, является предиктором длительной беспрогрессивной выживаемости у пациентов с распространенным колоректальным раком с RAS дикого типа, получающих панитумумаб [116]. Кроме того, высокая экспрессия мРНК HER3 (human epidermal growth factor receptor 3) и AREG/EREG у пациентов с распространенным колоректальным раком с RAS дикого типа, получавших панитумумаб, была связана с более длительными показателями общей и беспрогрессивной выживаемости [127]. Пациенты с метастатическим колоректальным раком, с RAS дикого типа, которые имели левосторонние опухоли и получали цетуксимаб, имели пролонгированную бессобытийную выживаемость, и более половины (150/399) правосторонних опухолей у этих пациентов имели KRAS или PIK3CA (PI3K, каталитическая субъединица альфа) мутации [128].

Экспрессия генов *EREG* и *AREG* была заметно ограничена метилированием ДНК, которое, в свою очередь, связано с фенотипическим статусом метилятора CpG (cytosine-phosphate-guanine)-островков у пациентов с первичными опухолями KRAS дикого типа, которые могут быть устойчивыми к терапевтическим антителам против EGFR [129]. Экспрессия генов AREG и EREG негативно регулируется сложными механизмами, включающими внутригенное метилирование и промотор-зависимый контроль [122]. Экспрессия AREG и EREG обратно коррелировала с уровнями метилирования и повышенным статусом фенотипа метилятора CpG-островков. Кроме того, более низкая бессобытийная выживаемость на фоне терапии анти-EGFR была связана с высоким статусом фенотипа метилятора CpG-островков [129].

### 1.2.2 Альтернативные сигнальные пути, задействованный в EGFR-ассоциированной опухолевой прогрессии

Низкие уровни мРНК AREG и EREG в опухолевых тканях метастатического колоректального рака связаны с мутациями *BRAF* и коррелируют с более короткой общей выживаемостью у пациентов с этим видом рака, получающих оксалиплатин / фторпиримидин и бевацизумаб в качестве комбинированного лечения [89]. Уровни экспрессии лигандов AREG и EREG координированно регулируются, и нижележащие сигнальные пути EGFR могут активироваться петлей аутокринного / паракринного лиганда, что способствует прогрессированию опухоли (рисунок 2). Низкий уровень экспрессии AREG и EREG указывает на то, что опухоли в меньшей степени зависят от EGFR; таким образом, они особенно склонны к лекарственной устойчивости к ингибиторам EGFR (рисунок 2).

Однако в некоторых опухолях (таких как колоректальный рак) с aberrантными генетическими изменениями, включая RAS [130], BRAF [89], PIK3CA [131], мутации EGFR S492R [132], потерю PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) [133] и фосфорилирование STAT3 [133, 134] придают нечувствительность к анти-EGFR-терапии за счет конститутивной активации нижестоящих сигнальных каскадов EGFR независимо от блокады EGFR (Рисунок 2). Кроме того, нисходящие пути EGFR могут быть активированы компенсаторной индукцией рецепторов фактора роста, включая рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) [135], MET (протоонкоген MET, тирозинкиназа рецептора) [136], ERBB2 [135, 137] и VEGFR (vascular endothelial growth factor receptors) [138] (рисунок 2).

Эти альтернативные пути могут запускать внутриклеточные сигнальные механизмы в обход EGFR и индуцировать рост и пролиферацию опухолевых клеток, что приводит к резистентности к терапии против EGFR. Высокие уровни экспрессии AREG и EREG у пациентов с метастатическим колоректальным раком с RAS дикого типа могут указывать на лучшую эффективность анти-EGFR-

терапии [123]. Кроме того, мутация BRAF, сопровождающаяся низкими уровнями экспрессии мРНК AREG и EREG, коррелировала с плохими результатами выживаемости у пациентов с метастатическим колоректальным раком, получавших оксалиплатин/фторпиримидин и бевацизумаб [89].

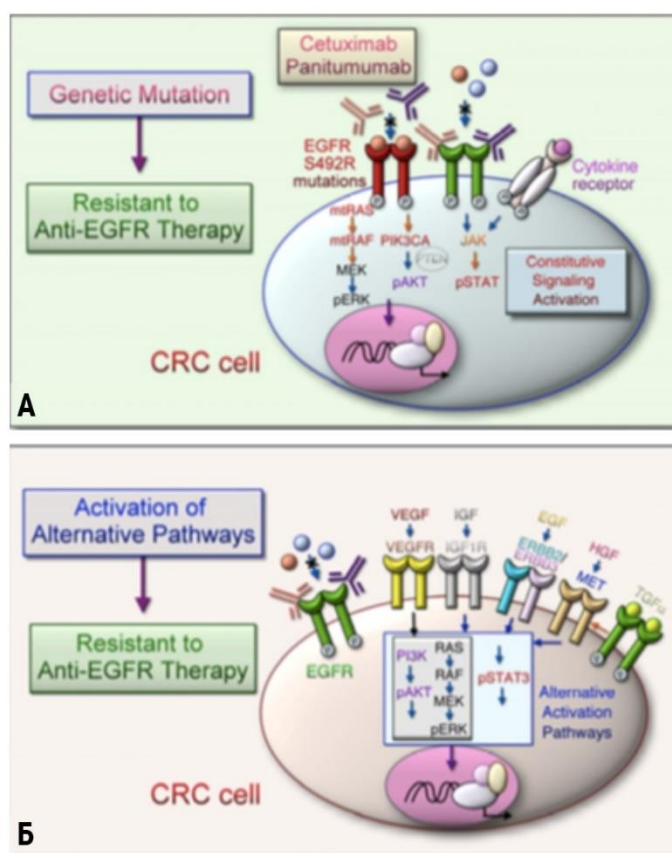


Рисунок 2 – Альтернативные пути активации (А) и обхода (Б) EGFR сигнализации по [22,122] в редакции автора

Примечательно, что метилирование гена *AREG* особенно снижено в эпителиальном компартменте ткани колоректального рака по сравнению со стромальной тканью и нормальными эпителиальными клетками [122]. По сравнению с одной лучевой терапией, комбинированная терапия цетуксимабом и



лучевой терапией приводила к увеличению бессобытийной выживаемости у пациентов с распространенным плоскоклеточным раком головы и шеи [139].

Кроме того, пациенты с рецидивирующим/метастатическим плоскоклеточным раком головы и шеи, получающие комбинированное лечение цетуксимабом и химиотерапией и демонстрирующие высокую экспрессию *AREG* и *EREG*, имели более длительные общую и бессобытийную выживаемость, чем пациенты с более низкой экспрессией указанных генов [94].

Следует отметить, что ранее предполагалось, что высокая экспрессия *EREG* активирует онкогенную петлю обратной связи, которая, в свою очередь, индуцирует сигнальный каскад EGFR/ERBB4, и также предполагалось, что указанная петля может рассматриваться терапевтической мишенью при немелкоклеточном раке легкого [99]. Однако, было показано, что повышение *EREG* является прогностическим биомаркером ответа на анти-EGFR-терапию у пациентов с метастатическим колоректальным раком и плоскоклеточным раком головы и шеи [31, 140].

Таким образом, EGFR-специфические лиганды, такие как *EREG*, оказывают значительное влияние на внутриклеточный путь и тесно связаны с реакцией на анти-EGFR-терапию. Понимание того, как специфические факторы, способствующие развитию опухоли, такие как *EREG*, регулируются в различных клеточных контекстах, и как онкогенные мутации обеспечивают альтернативную активацию сигнала, может помочь клиницистам улучшить методы лечения, такие как анти-EGFR направленная терапия.

### **1.3 Участие EGFR-опосредованной сигнализации в метастазировании опухолей**

*AREG* и *EREG* опосредуют активацию нижележащего сигнального пути *RGFR*, а избыточная экспрессия обоих лигандов способствует клоногенному выживанию базальных клеток, которое блокируется цетуксимабом при базальноподобном немелкоклеточном раке легкого (рисунок 3) [141]. *EREG*

активирует сигнальный путь EGFR-ERK и индуцирует экспрессию С-Мус, тем самым способствуя онкогенной трансформации у пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи и повышая чувствительность к эрлотинибу [31]. Цитоплазматический EREG, накапливающийся в тканях рака яичников, может действовать посредством аутокринного и паракринного высвобождения и связываться с EGFR в опухолеспецифическом микроокружении [56]. EREG, полученный из фибробластов, способствует пролиферации эпителиальных клеток кишечника через путь ERK при развитии опухоли, связанной с колитом [67].

Было установлено, что истощение MUC1 (Mucin-1) в фибробластах и эпителиальных клетках приводило к увеличению экспрессии EREG, что способствовало развитию рака легких посредством пути EGFR / АКТ [101]. Это открытие позволяет предположить, что роль MUC1 в развитии опухоли компенсируется повышенной продукцией EREG в ТМЕ. Истощение гена-супрессора опухоли индийского ежа увеличивало трансформацию кишечного эпителия в стромальных клетках толстой кишки, вызванную EREG/APC (adenoma polyposis coli) [92]. В совокупности результаты показывают, что аутокринный и паракринный EREG могут в основном активировать нисходящие пути EGFR в различных ландшафтах микроокружения опухоли, которые способствуют онкогенезу (рисунок 3).

EREG способствует прогрессированию опухоли и метастазированию при различных видах туморогенеза. EREG избыточно экспрессируется при раке мочевого пузыря, что приводит к высокому риску метастазирования в легкие [72]. Сигнатура генов метастазирования в легкие, включая EREG, COX2 (cyclooxygenases-2) и MMP1/2, был идентифицирован в клетках рака молочной железы с потенциалом метастазирования в легкие [79]. Гены метастазирования опосредуют первичный рост опухоли, ангиогенез и метастатическую экстравазацию при раке молочной железы [80]. Более того, блокада этих медиаторов комбинированными препаратами (цетуксимаб / целекоксиб / GM6001) значительно снижала метастатическую прогрессию.

Гиперэкспрессия KAP1 (KRAB-associated protein 1) активирует EREG, COX2 и MMP, которые стимулируют пролиферацию опухолевых клеток [81]. K14 высоко экспрессируется в кластерах эпителиальных опухолевых клеток молочной железы, которые являются ключевым регулятором метастазирования в отдаленные органы за счет активации передачи сигналов *EREG* [82]. При раке толстой кишки с метастазами в печень *EREG* был идентифицирован как ген, ассоциированный с метастазами, посредством анализа экспрессии генов [86]. Кроме того, активация передачи сигналов EREG/ERK/АКТ в клетках рака яичников и шейки матки увеличивала вероятность метастазирования в легкие [95].

Гиперэкспрессия *EREG* в нормальных фибробластах опосредовала ассоциированный с опухолью фенотип, который способствовал метастазированию через сигнальные пути JAK2/STAT3 и IL-6 [57] (рисунок 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что EREG необходим для трансформации фибробластов при прогрессировании рака яичников и шейки матки и что EREG-опосредованная миграция и инвазия рака яичников и шейки матки могут быть терапевтически нацелены на опухолевое микроокружение. Антитело против EREG значительно подавляло клеточную адгезию и распространение в клетках толстой кишки, экспрессирующих EREG, но оказывало незначительное влияние на их рост [22,142]. Более того, антитело против EREG эффективно ингибировало нисходящую передачу сигналов EGFR, активируемую EREG, но не EGF. Эти данные показали, что передача сигналов EREG-EGFR связана с адгезией и миграцией клеток.

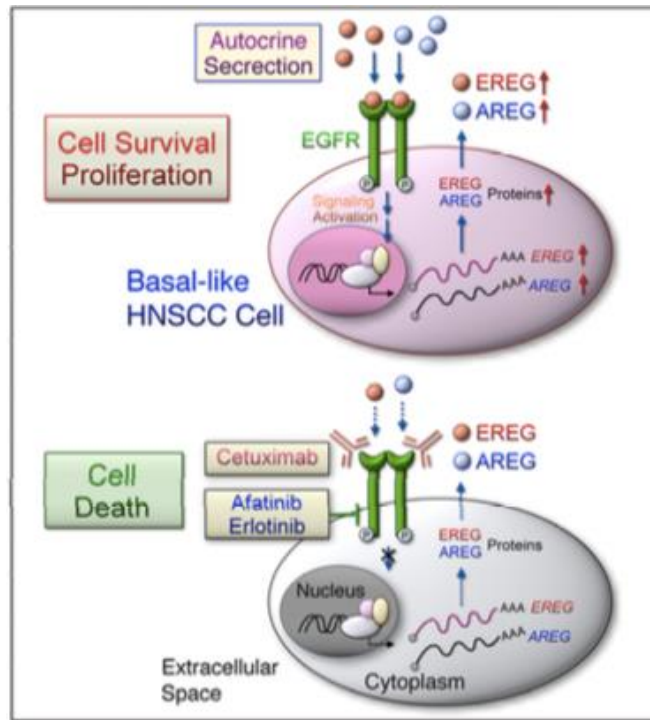


Рисунок 3 – Вовлеченность EGFR-опосредованной сигнализации в метастазирование, модификацию микроокружения и химиорезистентность

#### 1.4 Влияние активации EGFR на характеристику стволовых клеток опухоли

Как мы уже упоминали ранее, экспрессия *EREG* была увеличена в клетках колоректального рака и была связана с характеристиками опухолевых стволовых клеток [143]. При аденокарциноме легкого экспрессию LGR5 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) исследовали с помощью ИГХ окрашивания. Было установлено, что экспрессия маркера значительно коррелировала с большим размером опухоли, стадией TNM и плохим прогнозом [144]. LGR5-положительные клетки со свойствами колоректального рака с повышенной способностью к клеточной пролиферации были преобразованы в LGR5-отрицательные клетки с состоянием лекарственной устойчивости при воздействии химиотерапевтических препаратов.

Уровни экспрессии белка EREG были обнаружены как в LGR5-положительных, так и в резистентных к лекарственным препаратам LGR5-отрицательных опухолевых клетках толстой кишки. Кроме того, антитело против EREG проявляло противоопухолевую активность в отношении опухолей,

происходящих из LGR5-позитивных и LGR5-негативных клеток в метастатической модели. Это была первая демонстрация создания стабильных клеточных линий, обладающих свойствами опухолевых стволовых клеток и способностью переходить между двумя различными состояниями, пролиферирующим состоянием и состоянием лекарственной устойчивости. Кроме того, доказано, что терапия анти-EGFR-антителами может эффективно справляться с метастазированием опухоли в том случае, когда на ранних стадиях развития опухолевого узла он обильно заселен опухолевыми стволовыми клетками. Это указывает на то, что нацеливание на EGFR может быть вариантом лечения опухолевыми стволовыми клетками и преодоления лекарственной устойчивости.

Анализ эпигенетически регулируемого индекса стволовости на основе экспрессии мРНК (mRNAsi) в наборе данных Атласа генома опухоли показал, что более высокий показатель EGFR-mRNAsi коррелирует с более короткой общей выживаемостью у пациентов с глиомой [96]. В совокупности гиперэкспрессия EGFR приводит к появлению более агрессивных свойств и играет критическую роль в метастазировании во время прогрессирования опухоли. Экспрессия EGFR потенциально индуцируется в клетках рака толстой кишки и связана с лекарственной устойчивостью. При этом остается до конца неясным, играет ли экспрессия EGFR критическую роль в различных типах опухоли, которые вызывают метастазирование опухоли и лекарственную устойчивость.

Анти-EGFR таргетная терапия гифетинибом у азиатских пациентов с немелкоклеточным раком легкого с мутациями *EGFR* показала более благоприятные результаты с точки зрения частоты объективного ответа и медианы бессобытийной выживаемости по сравнению с химиотерапией карбоплатином / паклитакселом [145]. Однако приобретенная резистентность в течение 9-14 месяцев все же имела место, хотя лечение EGFR-ТКИ продемонстрировало первоначальное улучшение клинических исходов [145, 146]. Таким образом, ответ на вопрос как преодолеть устойчивость к EGFR-ТКИ при лечении злокачественных новообразований имеет критическое значение для

понимания наиболее эффективной стратегии лечения EGFR-экспрессирующих опухолей.

Недавнее исследование показало, что лиганд EREG вызывает устойчивость к ингибиторам тирозинкиназ (таким как эрлотиниб) у пациентов с немелкоклеточным раком легкого [102] (рисунок 3). EREG снижал индуцированный таргетными препаратами клеточный апоптоз посредством сигнальных путей EGFR/ERBB2 и АКТ. Однако не было отмечено существенной разницы в резистентности к таргетным препаратам на фоне гиперэкспрессии или нокдаунов *EREG*. *EREG* в основном экспрессировался в макрофагах микроокружения немелкоклеточного рака легкого, что удалось установить с помощью секвенирования РНК единственной клетки (single cell sequencing) [102]. Примечательно, что резистентность к анти-EGFR препаратам увеличивалась после обработки кондиционированной средой, полученной из макрофагов, обогащенных EREG. EREG, продуцируемый опухоль-ассоциированными макрофагами, вызывает лекарственную устойчивость клеток немелкоклеточного рака легкого; однако взаимодействие критических факторов, таких как экспрессия EREG, в различных ландшафтах микроокружения опухоли с точки зрения различного пространства, времени, границ, типов клеток и контекстов остается неясным.

EREG может индуцировать эффект Варбурга за счет активации передачи сигналов EGFR, что увеличивает экспрессию гликолитических генов, включая GLUT3 (glucose transporter 3), HK2 (hexokinase 2) и PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), в клетках рака молочной железы, устойчивых к тамоксифену [83] (рисунок 2). Это исследование показало, что тамоксифен усиливает экспрессию EREG за счет подавления ингибирования miR-186-3p, нацеленного на EREG, в устойчивых к лекарственным средствам клетках. У пациентов с колоректальным раком EREG является основным препятствием для лечения 5-фторурацилом и может вызывать приобретенную резистентность [90]. Сероводород ( $H_2S$ ) индуцировал экспрессию тимидилатсинтетазы (TYMS) и гена EREG посредством подавления miR-215-5p в клетках колоректального рака [90]. Кроме того,

ингибирование синтеза  $H_2S$  может подавлять приобретенную устойчивость к 5-фторурацилу путем регуляции оси miR-215-5p / EREG / TYMS. EREG высоко экспрессируется в глиобластоме и может активировать выделение ERK для стимуляции онкогенеза [75]. Уровень белка Rab27b был специфически индуцирован в облученных клетках глиобластомы человека U87MG [77] (Рисунок 3). Кроме того, опосредованная Rab27b продукция EREG, секретируемого клетками U87MG, активировала EGFR, что способствовало пролиферации клеток глиомы H4 паракринным образом.

Путь Rab27b-EREG может повысить эффективность лучевой терапии мультиформной глиобластомы. Таким образом, аутокринная и паракринная гиперэкспрессия EREG в отдельных клетках может синергетически активировать различные сигнальные каскады, микроРНК и пути аэробного гликолиза, которые способствуют росту первичной опухоли, метастазированию и резистентности к лекарственным препаратам.

Лекарственная устойчивость, вызванная мутациями онкогена или активацией онкогенных сигнальных путей и повышенной пластичностью опухоли, является основным препятствием, с которым сталкиваются клиницисты при применении таргетной терапии, такой как терапия, направленная против EGFR [111, 147]. Сосуществующие генетические события, включая драйверные мутации и альтернативную активацию передачи сигналов, такую как экспрессия EREG, могут создавать различные ландшафты опухолевого микроокружения, что приводит к различной лекарственной устойчивости в разных типах опухолей. Таким образом, персонализированная терапия, включающая использование комбинированных препаратов, может преодолеть побочные эффекты, связанные со злокачественным фенотипом опухоли и приобретенной резистентностью.

## 1.5 Клинико-патологические перспективы таргетирования EGFR-сигнального пути

Лечение низкомолекулярным ингибитором EGFR гефитинибом подавляло нисходящие сигнальные пути EREG/EGFR и уменьшало образование опухолей у животных с ксенотрансплантатом, несущих клетки мультифокусной глиобластомы с гиперэкспрессией EREG [75]. Кроме того, лечение препаратами антител против EREG значительно подавляло адгезию и распространение клеток рака толстой кишки [142]. По сравнению с EGF, EREG приводил к образованию более слабого димера EGFR с более короткой продолжительностью жизни, что запускало aberrантную передачу сигналов EGFR и устойчивые пути ERK. Это, в свою очередь, влекло дифференцировку клеток рака молочной железы [148]. Примечательно, что aberrантные мутации EGFR, BRAF или KRAS встречались при аденокарциномах легкого взаимоисключающим образом [149, 150].

Гиперэкспрессия EREG была обнаружена в мутантных клетках немелкоклеточного рака легкого с мутациями EGFR или BRAF и в подмножестве клеток опухоли с EGFR/KRAS/BRAF дикого типа [51, 100] (рисунок 4). Нокдаун EREG подавлял зависимый или независимый рост клеток немелкоклеточного рака легкого как с мутациями KRAS, так и с гиперэкспрессией EREG [51], что указывает на высокий терапевтический потенциал таргетирования EREG при KRAS-экспрессирующем немелкоклеточном раке легкого. Независимо от статуса мутации, блокада путей MEK/ERK снижала уровни EREG в клетках немелкоклеточного рака легкого с гиперэкспрессией EREG [51].



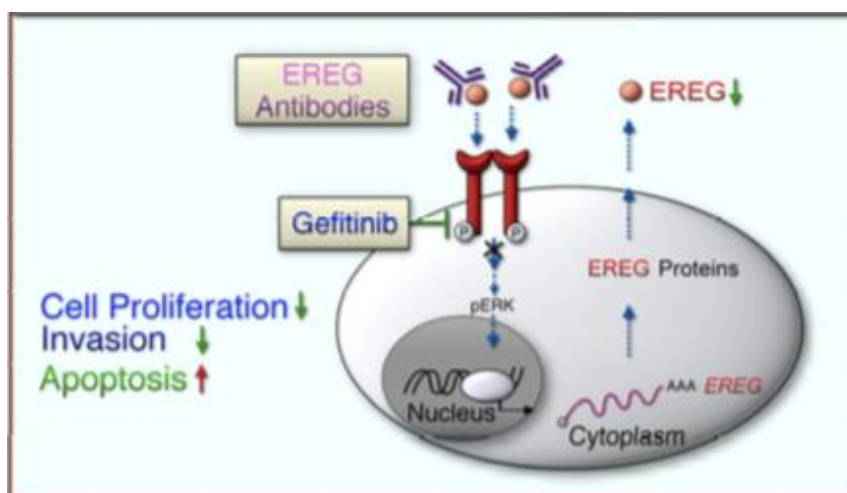


Рисунок 4 – Перспективные пути управления EGFR сигнальным путем опухолевой прогрессии

Экспрессия EREG подавлялась таргетным анти-EGFR препаратом gefitinibом в EGFR-мутантных клетках немелкоклеточного рака легкого [100]. Инвазию EGFR-мутантных клеток подавляли нокдауном экспрессии EREG или обработкой антителом против EREG. Повышенная экспрессия генов AREG и EREG в легком дополнительно способствует развитию опухоли у трансгенных мышей с мутантным EGFR [151]. Более того, результаты лечения антителами против EGFR были значительно лучше у пациентов с колоректальным раком с KRAS дикого типа в отличие от мутантного RAS, имеющего высокую экспрессию EREG [22, 116, 118, 124, 126]. Таким образом, нацеливание на EREG/EGFR в микроокружении опухоли может предоставить терапевтические возможности для пациентов с немелкоклеточным раком легкого, особенно подгруппой с драйверной мутацией или резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы EGFR, пациенток с раком молочной железы, а также для пациентов с колоректальным раком с экспрессией KRAS дикого типа.

В этой связи поиск перспективных путей управления канцерогенной трансформацией опухолевых клеток и прогрессии злокачественных опухолей, экспрессирующих EGFR, представляется одним из наиболее перспективных и развивающихся направлений современной молекулярной патологии и

фармакологии, что определяет высокую актуальность настоящего диссертационного сочинения с позиций общемировой научно-исследовательской медицинской повестки.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Важнейшим элементом современной персонализированной терапии онкологических заболеваний является поиск и валидация релевантных биологических моделей, воспроизводящих в условиях, максимально приближенных к реальным, патологический процесс во всей его сложности и многоуровневом многообразии. Это многообразие, в свою очередь, определяется собственно опухолевыми клетками и микроокружением или опухолевой экосистемой. Каждый из этих компонентов включает целый комплекс молекулярных характеристик, формирующих тканевой пейзаж злокачественного новообразования.

Идентификация и понимание роли органных, тканевых, клеточных и субклеточных процессов во всей их широте и сложности лежит в основе определения главных и эффективных направлений борьбы с неопластической клеточной трансформацией и действенных инструментов контроля всех элементов опухолевой прогрессии – роста, инвазии, метастазирования.

Говоря об индивидуализированных опухолевых моделях, следует обратить внимание, что сегодня в фундаментальной и прикладной медицинской науке используются культуры опухолевых клеток, трехмерные объемные опухолеподобные конструкции – органоиды и тумороиды – включающие и не содержащие клеточные компоненты опухолевого микроокружения, животные модели сингенных и ксенографтных опухолей. Правильный выбор модели, ее патоморфологическая, в том числе и иммунофенотипическая, и молекулярная валидация определяют успех инновационной противоопухолевой интервенции, гарантируют оптимальные эффективность и скорость трансляции результатов доклинических изысканий в реальную клиническую практику.

Именно поэтому целью диссертационной работы явилась разработка эффективного способа контроля канцерогенеза, обусловленного активацией EGFR-ассоциированного драйверного механизма, на примере злокачественных опухолей желудка, молочной железы и легкого.

В связи с очевидной мультидисциплинарностью сформулированной цели исследования диссертация выполнялась на стыке научных специальностей патологическая анатомия и фармакология, клиническая фармакология, и потребовала привлечения, помимо классических методов патоморфологии и фармакологии, также биохимических, молекулярно-биологических и математических методов исследования.

## 2.1 Дизайн экспериментального исследования

Настоящее исследование было спланировано и выполнено в несколько этапов (рисунок 5). На первом этапе была сформулирована научная гипотеза исследования, определены методы работы, а также необходимые материалы для ее успешного выполнения. Также в рамках первого этапа для формулирования гипотезы проведено реферирование широкого спектра зарубежных и отечественных периодических источников.

Второй этап посвящен обоснованию эффективности контроля EGFR-ассоциированного драйверного пути в росте культуры опухолевых клеток желудка. Для этих целей были выбраны культуры немутантного штамма опухоли. На этом же этапе произошел направленный цитологически-подтвержденный отбор фармакологического агента – потенциального молекулярно-направленного таргетного анти-EGFR лекарственного средства.

Третий этап включал воспроизведение, патоморфологическую, иммунофенотипическую и молекулярно-генетическую валидацию трехмерной опухолеподобной органоидной модели EGFR-экспрессирующего рака молочной железы с последующим исследованием на этой модели противоопухолевых свойств нового молекулярно-направленного вещества – 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН 2-гидроксипутандиоата (соединение ЛХТ-17-19).

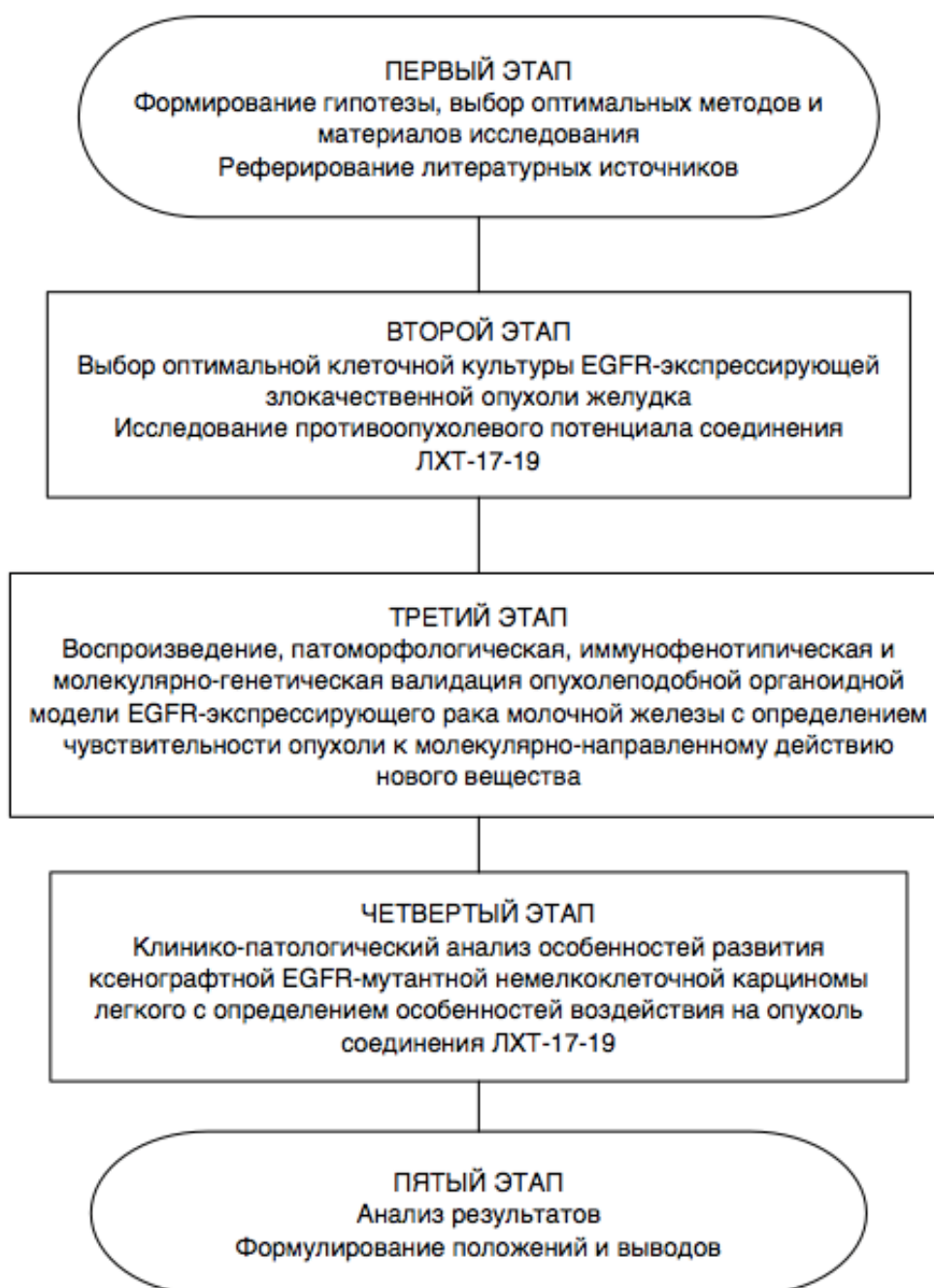


Рисунок 5 – Дизайн и структура исследования

Четвертый этап состоял из определения клинико-патоморфологических особенностей течения ксенографтного гетеротопического опухолевого процесса немелкоклеточной карциномы легкого с наличием экспрессии EGFR сигнального пути и драйверных мутаций в соответствующем гене, а также особенности ответа опухоли на направленное молекулярно-биологическое воздействие таргетным веществом ЛХТ-17-19.

На заключительном – пятом – этапе проводилась обработка и анализ полученных данных, формулировались основные положения работы, выводы диссертационного исследования.

## **2.2 Соответствие протокола исследования принципам биоэтики**

Протокол настоящего исследования включал использование в научных целях лабораторных животных, а также живых тканей и клеток пациентов, что требовало в обязательном порядке одобрения этического комитета. В этой связи исследовательский протокол был подан на рассмотрение в Локальный этический комитет ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), и на заседании комитета от 15.06.2023 было получено одобрение (протокол заседания №11-23).

Все лабораторные процедуры: забор, фиксация, замораживание, хранение, маркировка проб, пробоподготовка, выполнение гистологической проводки, нарезка, раскапывание, нанесение на покровные стекла, высушивание, окрашивание, просмотр срезов, ведение гистологического архива, ведение лабораторных записей, выполнялись в строгом соответствии со специальными операционными процедурами (СОП) лабораторий Института морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Все манипуляции с лабораторными животными: транспортировка, получение, карантинизация, содержание (в том числе кормление, подача воды, поддержание санитарно-гигиенического состояния клеток и помещений с учетом видовых требований к микроклимату, инвазивные манипуляции и вмешательства (инъекции, пункции, операции), контроль состояния здоровья, выведение из лабораторного эксперимента, выполнялись в строгом соответствии со специальными операционными процедурами (СОП) экспериментально-биологической операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ

ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Помимо вышеупомянутых СОП мы также руководствовались следующими документами национальной регуляторной практики и международными положениями:

Федеральным Законом №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в действующей редакции);

Федеральным Законом №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (в действующей редакции);

приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека №224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок» (в действующей редакции);

приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (в действующей редакции);

ГОСТом 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»; ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»;

Хельсинкской декларацией «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (1964 год; в действующей редакции);

интегрированным дополнением к Руководству по надлежащей клинической практике ICH E6(R1), E6(R2) (9.11.2016 года) и

Директивой Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС).

### 2.3 Клеточные культуры EGFR-экспрессирующего рака желудка

В настоящем исследовании использованы нижеследующие линии клеток рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующие EGFR дикого типа (немутантная форма гена тирозинкиназы). Клеточная культура AGS была приобретена в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, каталожный номер 89090402). Клеточная культура MKN1 (каталожный номер RCB1003 и каталожный номер RCB1062) были приобретены банком клеток RIKEN BioResource Center (Цукуба, Япония). Клетки Hs746T были получены из коллекции клеточной биологии ATCC (LGC Standards GmbH, Везель, Германия, каталожный номер ATCC HTB-135).

Клетки AGS и MKN1 культивировались в среде RPMI 1640 (Life Technologies, Дармштадт, Германия) с добавлением 2 mM L-глутамина (Life Technologies, Дармштадт, Германия), в соответствии с рекомендациями производителя.

Клетки линии Hs746T культивировались в модифицированной среде Дульбекко (DMEM) с прибавлением GlutaMAX™-I, 4500 мг/л D-глюкозы и пирувата натрия (Life Technologies, Дармштадт, Германия). Клетки линии LMSU культивировались в среде Nutrient Mixture F-10 Ham (Merck Sigma-Aldrich, Германия).

Во все среды для культивирования клеток добавлялось 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) Sera Plus (PAN-Biotech, Германия) с содержанием пенициллина и стрептомицина (Merck Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 100 ME/мл, 100 мкг/мл соответственно. После оттаивания замороженных клеток рутинным методом подтверждалось отсутствие микоплазмы в кондиционированной среде.

Клеточные культуры инкубировались в CO<sub>2</sub> инкубаторе при температуре 37°C. Молекулярная валидация клеточной культуры, а также исследование влияния соединения ЛХТ-17-19 на пролиферацию и жизнеспособность



опухолевых клеток культур AGS, Hs746T и MKN1 проводились в экспоненциальную фазу роста.

### **2.3.1 Метод исследования жизнеспособности опухолевых клеток**

В настоящей работе использовался МТТ-тест для измерения клеточной метаболической активности как индикатора жизнеспособности, пролиферации и цитотоксичности клеток EGFR-экспрессирующих культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1. Этот колориметрический анализ основан на восстановлении желтой соли тетразолия (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия или МТТ производства Merck Sigma-Aldrich, Германия) до пурпурных кристаллов формазана под действием митохондриальной редуктазы метаболически активными клетками. Эта нерадиоактивная система колориметрического анализа с использованием МТТ была впервые описана Т. Mosmann и улучшена в последующие годы несколькими другими исследователями. Примененный в данной работе коммерческий набор I для пролиферации опухолевых клеток (МТТ производства Merck Sigma-Aldrich, Германия) представляет собой оптимизированный набор для анализа МТТ, содержащий готовые использовать реагенты, не требует этапов промывки или дополнительных реагентов. Это количественный анализ, позволяющий быстро и удобно работать с большим количеством образцов.

Принцип метода заключается в том, что жизнеспособные клетки содержат ферменты НАД(Ф)Н-зависимой оксидоредуктазы, которые восстанавливали МТТ до формазана. Нерастворимые кристаллы формазана растворяются с использованием солюбилизующего раствора, и полученный окрашенный раствор количественно определяют путем измерения оптической плотности при 500-600 нанометров с помощью многолучного полуавтоматического спектрофотометра StatFax 4200 (Awareness Technology, США). Чем темнее раствор, тем больше жизнеспособных, метаболически активных клеток.

В протоколе использовался стандартный 96-луночный планшет. Анализ имел оптимальную линейность измерения (до 106 клеток), что отвечает рекомендациям в доступных литературных источниках.

### **2.3.2 Метод молекулярно-биологического определения драйверной киназы в опухолевых клетках**

Способность исследуемого соединения молекулярно-направленного действия – производного акридина ЛХТ-17-19, а также препарата сравнения – ингибитора тирозинкиназы первого поколения эрлотиниба эффективно ингибировать активность киназу EGFR оценивалась на различных EGFR-положительных опухолевых клетках культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующих киназу EGFR дикого типа. Для этого клетки обрабатывались возрастающими дозами соединений (от 0,5 до 10 мкМ) в течение 24 часов, и статус фосфорилирования EGFR оценивался как маркер его киназной активности с помощью молекулярного метода вестерн-блоттинга.

Для нокдауна EGFR в исходных клетках (культуры рака желудка AGS, Hs746T и MKN1) и в соответствующих клетках, получавших фармакологическое воздействие соединением ЛХТ-17-19 и ингибитором тирозинкиназы первого поколения эрлотинибом использовалось 500 нг EGFR siRNA (каталожный номер ENU076761, производитель Merck Sigma-Aldrich, Германия) в 12-луночном формате.

Образцы белка из клеток для вестерн-блоттинга собирались в буфере Лэммли в соотношении 2 к 1 по сравнению с образцом. Затем образцы денатурировались при 100°C в течение 10 мин. Равное количество образцов белка загружалось и разделялось на геле SDS PAGE, который затем переносился на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) с последующей блокировкой в 5% молоке в TBST в течение 1 часа.

Различные интересующие белки (фосфорилированную – активную – и нефосфорилированную – неактивную – формы рецепторной тирозинкиназы

EGFR) исследовались с использованием специфических первичных и вторичных антител в оптимизированных концентрациях (антитела к EGFR (каталожный номер D38B1) были приобретены в компании Cell Signaling (США). Все измерения проводились при трехкратном повторении.

#### **2.4 Органоидная опухолеподобная модель EGFR-позитивного рака молочной железы**

Противоопухолевые свойства молекулярно-направленного средства ЛХТ-17-19 в сравнении с коммерческим таргетным ингибитором тирозинкиназы эрлотинибом оценивались на органоидной (patient-derived organoid – PDO) модели рака молочной железы, экспрессирующего дикий тип EGFR. Для формирования органоидов использовалась свежая опухолевая ткань 68-летней пациентки с билатеральным раком молочной железы, ранее не подвергавшимся химиотерапии, подтвержденная морфологически и иммуногистохимически (ИГХ). Образец ткани объемом ~120 мм<sup>2</sup> был получен во время хирургической операции, проведенной в ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ» и разделен на три равные части. Одна часть образца фиксировалась и затем использовалась для патоморфологического исследования, второй фрагмент замораживался (до температуры -90°C) и подвергался молекулярному анализу.

Третий фрагмент опухолевой ткани был механически разделен на мелкие кусочки с помощью микрохирургических ножниц производства World Precision Instruments (США) и немедленно помещен в раствор для хранения тканей MACS производства Miltenyi Biotec (Германия). Образцы хранились при 40°C не более 8 часов до патоморфологического подтверждения типа опухоли и иммуногистохимического (ИГХ) фенотипирования ее молекулярной идентичности.

После этого образцы переносились во флаконы для гомогенизации тканей softMACS С производства Miltenyi Biotec (Германия), а затем – в коктейль ферментов из специального лабораторного набора Tumor Dissociation Kit для

человека того же производителя. Затем культуральные флаконы плотно закрывались и помещались в окто-диссоциатор GenMaCS Octo Dissociator. Для диссоциации клеток использовалась программа 37C\_h\_TDK\_3. Полученная суспензия центрифугировалась при 3000 оборотах в минуту в течение 10 мин. После удаления супернатанта осадок разбавлялся 10 мл забуференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия и снова центрифугировался.

После удаления супернатанта осадок разбавлялся в среде DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, США). Затем охлажденная суспензия смешивалась с Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (Corning, США) в соотношении 1:2, 50 мкл смеси переносились в 24-луночный планшет (TPP, Швейцария) и инкубировались при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в течение 20 мин. В каждую лунку добавлялось по 750 мкл полной клеточной среды и снова повторялся описанный цикл инкубации. Каждые 48 часов культуральная среда полностью обновлялась. Растущие органоиды наблюдались с помощью микроскопа PrimoVert (Carl Zeiss, Германия). Рекультивация органоидов проводилась раз в две недели.

#### **2.4.1 Метод определения жизнеспособности клеток органоидной культуры**

Жизнеспособность клеток органоидов рака молочной железы после 7-дневного присутствия ЛХТ-17-19 оценивалась с использованием теста на основе MTS, набора CellTiter 96 AQueous One<sup>®</sup> Solution Cell Proliferation Assay (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя.

Принцип метода, заложенного в основу CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous, основан на восстановлении соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбокситетрагидрофурил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолия (MTS) до окрашенного соединения формазана жизнеспособными клетками в культуре. Тетразолий MTS аналогичен широко используемому тетразолию МТТ с тем преимущественным отличием, что формазановый продукт восстановления MTS растворим в среде культивирования клеток. Метаболизм в жизнеспособных клетках производит «восстанавливающие

эквиваленты», такие как восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) или восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Эти восстанавливающие соединения передают свои электроны промежуточному реагенту с переносом электронов, который может восстанавливать MTS в водный формазановый продукт. После гибели клеток клетки быстро теряют способность восстанавливать продукты тетразолия. Следовательно, окрашенный формазановый продукт пропорционален количеству жизнеспособных клеток в культуре.

Анализ пролиферации клеток в одном растворе CellTiter 96® AQueous включал добавление реагента непосредственно в лунки для анализа в рекомендуемом соотношении 20 мкл реагента на 100 мкл культуральной среды. Клетки инкубировались 1-4 часа при 37°C, затем измерялась оптическая плотность при 490 нм с помощью многолучного полуавтоматического спектрофотометра StatFax 4200 (Awareness Technology, США). Водный раствор производного акридина и коммерческий таргетный ингибитор тирозинкиназы эрлотиниб добавлялись в инкубационную среду ежедневно в концентрациях 0,5, 2,0, 9,0, 60,0, 250,0 и 1000,0 мкМ.

#### **2.4.2 Методы патоморфологической и молекулярной валидации подтипа опухолевых клеток органоидного рака молочной железы**

##### **Методы патоморфологической валидации**

Органоидные тельца в полной среде культивирования снимались с планшета для тканевых культур и собирались в пробирку Falcon (Германия), предварительно покрытую адгезивным силиконовым материалом BSA. Органоиды собирались и однократно промывались в забуференном изотоническом 0,9% растворе хлорида натрия путем центрифугирования при 300 оборотах в минуту в течение 5 минут. Среда для сбора органоидов (каталожный № 3700–100-01, Trevigen) добавлялась к органоидам в объеме в 3 раза больше

матригеля и инкубировалась при 4°C на льду в течение 30 минут, чтобы обеспечить удаление матригеля и концентрацию органоидов на дне емкости.

После чего органоиды однократно промывались большим количеством забуференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия и фиксировались в свежем 4% растворе забуференного формалина при комнатной температуре в течение 10 минут. В пробирку добавлялся BSA 1:1 (об./об.) и центрифугировался при 300 оборотах в минуту в течение 5 минут для удаления формалина. Органоиды дважды промывались достаточным количеством забуференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия и заключались в 2% агарозу в дважды дистиллированной воде. Затем агарозный гель, содержащий органоиды, заливался парафином, и готовились срезы толщиной 5 мкм.

Окрашивание гематоксилином и эозином проводилось в мультистейнере Leica (ST5020, Германия). Для этого срезы депарафинизировались и регидратировались, а затем окрашивались в гематоксилине (Hematoxylin 560 MX, Leica, Германия) в течение 1 мин с последующим обесцвечиванием в Define MX-aq (Leica, Германия) в течение 30 с, окрашивались в голубой буфер 8 (Leica, Германия) в течение 1 мин и затем окрашивались в эозине (eosin 515 LT, Leica) в течение 30 сек. После обезвоживания покровные стекла помещались на предметные стекла с помощью роботизированного устройства (Leica CV5030, Германия).

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание проводилось в автоматическом аппарате для ИГХ окрашивания Discovery Ultra (Roche, Швейцария) в соответствии со стандартными протоколами. В частности, на первом этапе предметные стекла подвергались извлечению антигена (Benchmark Ultra CC1, Roche) при 96°C в течение 1 часа; первичные антитела инкубировались при 37°C в течение 1 часа и использовалась система обнаружения мультимеров Discovery (Discovery OmniMap HRP, Discovery DAB и Purple, Roche, Швейцария) для обнаружения и усиления иммунных сигналов. Используемые антитела: кроличьи моноклональные антитела к рецептору эстрогена (ER), рецептору

прогестерона (PR) человека, анти-Her2/neu и анти-Ki67 антитела (DAKO, Agilent Technology, США).

Для определения ИГХ экспрессии EGFR использовался следующий протокол: на первом этапе эндогенная пероксидаза блокировалась раствором для блокировки пероксидазы (DAKO, США) в течение 5 минут. Затем срезы инкубировались с первичными крысиными антителами к EGFR (клон EGFR.113, разведение 1/200, Novocastra Laboratories Ltd., Ньюкасл, Тайн-энд-Уир, Великобритания) в течение одного часа при комнатной температуре. Реакция визуализировалась с помощью набора для окрашивания EnVision (DAKO, США). Срезы докрашивались гематоксилином. С помощью специальной компьютерной морфометрической программы определялась степень окрашивания порядка 100 клеток в трех разных полях зрения. Статус экспрессии EGFR оценивался на основе интенсивности окрашивания мембраны, как описано ранее: 0 – нет окрашивания, 1+ – слабое окрашивание мембраны в >10% опухолевых клеток, 2+ – умеренное полное окрашивание мембраны в >10% опухолевых клеток, и 3+ – сильное окрашивание мембран в >10% опухолевых клеток.

### **Методы молекулярно-генетической валидации органоидных опухолеподобных структур рака молочной железы**

Органоидная РНК экстрагировалась с использованием протокола экстракции РНК TRIzol® (Thermo Fischer 15596018, США). ДНК экстрагировалась путем удаления матригеля из органоидов с использованием охлажденного на льду забуференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия или TрупLE с последующей экстракцией ДНК с использованием набора Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Qiagen 69504, Германия) с элюированием в воде, не содержащей нуклеаз (Thermo Fischer/Ambion 4387936, США).

ДНК затем использовалась для амплификации генов ABCC4, ANXA3, FOXC1, KLK3, U19 и гена PGK (housekeeping gene) со следующими специфическими праймерами:

FW ABCC4 5'-AGAGGGTGTTCAGAGGCAATC-3',  
 RV ABCC4 5'-CATCAAGTAGCAAAAAGGTCT-3';  
 FW ANXA3 5'-GTGGACACCGAGGAACAGT,  
 RV ANXA3 5'-GCTGTGCATTTGACCTCTCA-3';  
 FW FOXC1 5'-TAGCTGTCAAATGGCCTTC,  
 RV FOXC1 5'-TAGTTCGGCTTTGAGGGTGT-3';  
 FW KLK3 5'-TCCCAGACGTGGATTGGT-3',  
 RV KLK3 5'-CAGGGTTGGGAATGGTTCT-3';  
 FW U19 5'- CAGGGAATTGTGTCTCAGGAC-3',  
 RV U19 5'- GGCCACTGTTGTCTCGAAAT - 3'.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, qPCR) в реальном времени проводилась в трех повторениях в 96-луночных планшетах оптического качества с 5 мкл SYBR Green Master mix (PE Applied Biosystems), 12,5 мкМ каждого праймера и 35 нг ДНК в объеме 60 мкл.

Термоциклирование проводилось с использованием системы ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems 7300, США) при следующих условиях: 95°C в течение 10 мин, 40 циклов при 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 1 мин. Относительное количественное определение генов-мишеней было получено с использованием методов сравнительного порога цикла (Ct). В частности, для расчета относительной экспрессии мРНК целевого гена, нормализованной по отношению к *PGK*, среднее значение Ct-мишени вычиталось из среднего значения Ct *PGK* ( $\Delta Ct$ ). Количество мишени, нормализованное к эндогенному эталону и относительно калибратора (кратное изменение), определяется как  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , где расчет  $\Delta\Delta Ct$  включает вычитание калибровочного значения  $\Delta Ct$  (*EGFR*). Предполагая, что  $\Delta Ct = 3,3$  соответствует 10-кратной разнице экспрессии между *PGK* и мишенью, рассчитанной по  $\log_{10}$ , результаты  $\Delta Ct$  были разделены на 3,3 и представлены в логарифмической шкале.

Лабораторный набор Therascreen® EGFR Pyro Kit использовался для выявления и количественного определения мутаций в экзоне 18 (кодон 719), экзоне 19 (делеция), экзоне 20 (кодоны 768 и 790) и экзоне 21 (кодоны 858 и 861)



на основе последовательности гена *EGFR* (кат. № 971480, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) по протоколу производителя с использованием 10 нг геномной ДНК, выделенной из опухолевой ткани. В данной работе использовалась полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR) для обнаружения мутаций гена *EGFR*.

## **2.5 Ксенографтная животная модель EGFR-эксперессирующего немелкоклеточного рака легкого**

Гетеротопическая животная модель ксенотрансплантата (PDX) экспрессирующей EGFR карциномы легкого, полученной от пациента, была воспроизведена у самцов мышей BALB/c *nu/nu* в возрасте 10 недель, в соответствии с описанием [152, 153].

### **2.5.1 Лабораторные животные: условия содержания, процедуры гуманизации**

Животные были приобретены в SPF-питомнике Института биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова РАН (г. Пущино Московской области) и содержались в индивидуальных вентилируемых клетках условиях естественного дневного света при температуре 22°C и влажности 55-65% со свободным доступом к корму и воде. Для кормления мышей использовались специальные рецептуры автоклавированного гранулированного корма и стерильную воду.

Перед осуществлением гетеротопической ксенотрансплантации животные гуманизировались однократным сублетальным рентгеновским облучением в суммарной дозе 3,5 Гр при дозе 0,8 Гр/мин (Рентген-ГА 150/10, ООО «СпектрАП», Москва, Россия) с последующей, через 3 сут, внутрибрюшинной трансплантацией человеческих лимфоцитов в дозе  $5 \times 10^7$  клеток / 1 мл / мышь внутрибрюшинно. Клетки были выделены из лейко-пакетов здоровых доноров в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской

гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия).

Все болезненные процедуры, проводимые с лабораторными животными, осуществлялись под наркозом с использованием специальной наркозной приставки производства R500 (RWD Life Science, Китай) к аппарату ИВЛ (UGO Basil, Италия) для грызунов. В качестве наркозного средства использовался изофлуран. Перевивка опухоли проводилась бодрствующим животным, выведение из эксперимента – с помощью наркозного аппарата.

### 2.5.2 Постановка модели

Образец ткани немелкоклеточной EGFR-экспрессирующей ALK-позитивной аденокарциномы легкого, не получавшей химиотерапевтического воздействия, объемом  $\sim 120$  мм<sup>2</sup> был получен во время хирургической операции 71-летнего мужчины, проведенной в ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ» и разделен на три равные части. Одна часть образца фиксировалась и затем использовалась для патоморфологического исследования, второй фрагмент замораживался (до температуры  $-90^{\circ}\text{C}$ ) и подвергался молекулярному анализу.

Как описано выше, образец был разделен на три части для дальнейшей прививки и патоморфологической и молекулярно-генетической валидации ксенотрансплантата. Опухолевые частицы размером не более 0,5-0,8 мм инокулировались подкожно в области боковой поверхности левого бедра гуманизированного животного (рисунок 6). Размер подкожно растущего узла (длина, ширина и глубина) измерялся два раза в неделю, и как только он увеличивался до 150 мм<sup>3</sup> и более, животное выводилось из эксперимента, опухоль извлекалась, измельчалась и непосредственно повторно трансплантировалась. Циклы прививки повторялся трижды, и после гистологической, ИГХ и молекулярной валидации образцы опухоли инокулировались 15 мышам.

Носители ксенотрансплантата случайным образом распределялись на три экспериментальные группы: контрольную, препарат сравнения – коммерческий

ингибитор тирозинкиназы второго поколения эрлотиниб и ЛХТ-17-19 ( $n = 5$  в каждой группе). Мышам контрольной группы вводилось внутривенно в хвостовую вену 0,2 мл забуференного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия, тогда как животным группы препарата сравнения и экспериментальной группы вводился эрлотиниб (субстанция с чистотой 98% Merck SIGMA-Aldrich, Германия) и ЛХТ-17-19 в суточной дозе 5 мг/кг и 2 мг/кг соответственно. Забуференный изотонический 0,9% раствор хлорида натрия и экспериментальное соединение вводились внутривенно в 11 часов утра в течение 7 дней, с момента достижения объема ксенотрансплантата значений 180-200 мм<sup>3</sup>. Проводилось наблюдение за животными и контроль самочувствия до момента гибели; у погибших животных опухоли извлекались и исследовались; учитывались и подсчитывались отдаленные метастазы. Для каждого животного рассчитывалось время удвоения объема опухоли.

В ходе эксперимента строго контролировался болевой синдром животных с помощью мимической лицевой шкалы боли [154, 155]. Боль от легкой до умеренной купировалась внутрижелудочным введением 100 мг/кг кетопрофена (вещество, каталодный № K1751, чистота > 98%, Merck SIGMA-Aldrich, Германия) два раза в день. Мыши с сильными неконтролируемыми болями подвергались эвтаназии изофлураном с помощью наркозного аппарата для мелких животных R500 (RWD Life Science, Китай). Такие случаи учитывались при цензурировании данных о выживаемости.

Патоморфологическая и молекулярно-генетическая валидация ксенографтной опухоли проводилась теми же методами и основывалась на тех же принципах, что были описаны в п. 2.4 настоящей главы.

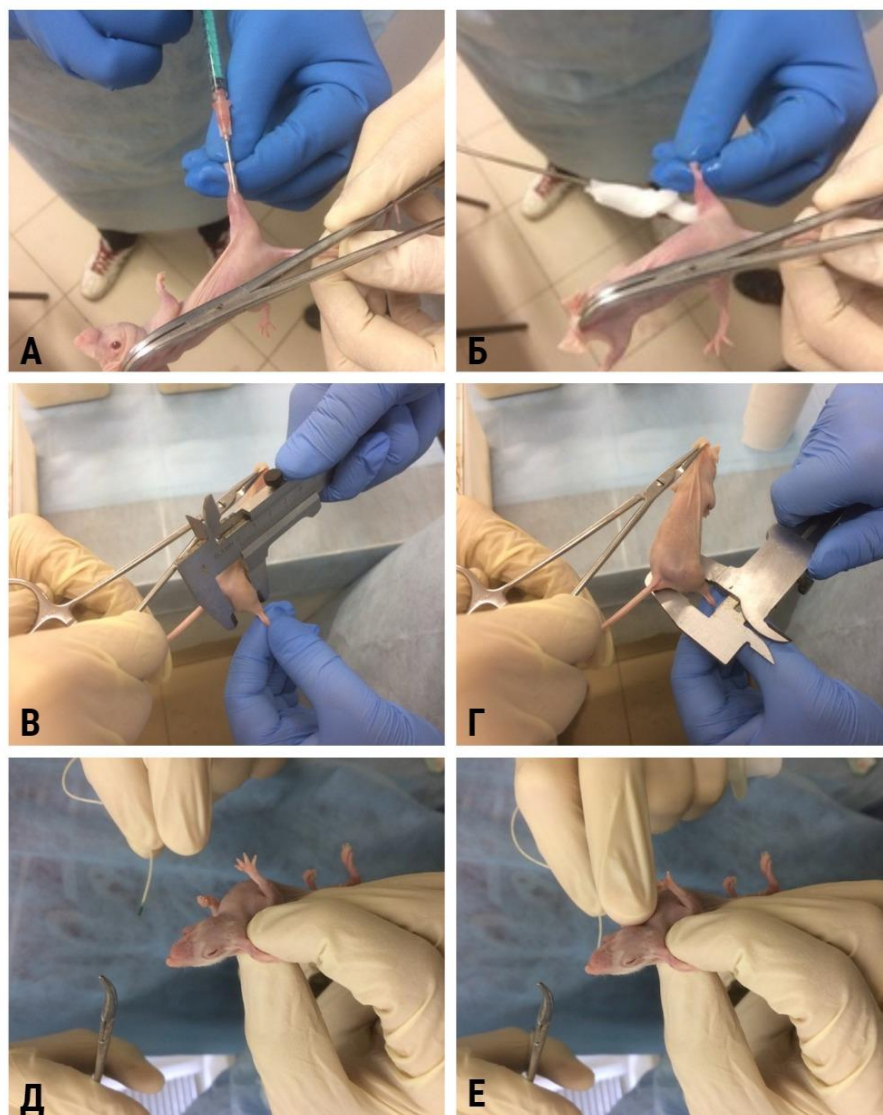


Рисунок 6 – Основные этапы формирования опухолевой платформы на основе BALB/c *nu/nu* мышей: (А) и (Б) – инокуляция фрагментов опухоли; (В) и (Г) – измерения штангенциркулем размера опухолевого узла; (Д) и (Е) – зондовое введение изучаемого соединения в желудок

## 2.6 Исследуемое соединение и препарат сравнения

В работе изучено соединение 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2Н)-ОН L-2-гидрокси-бутандиоват (лабораторный номер ЛХТ-17-19), полученное в отделе химии, технологии и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна Московской области) и любезно предоставленное руководителем авторского коллектива – профессором С.Я. Скачиловой.

Синтез соединения (рисунок 7) осуществляется следующим образом: в гомогенизатор загружают эквимольные количества 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН 9,35 г (0,25 ммоль) и L-2-гидрокси-бутандиовой кислоты 3,35 г (0,25 ммоль). Массу тщательно гомогенизируют в течение 10-15 минут, затем загружают 70 мл 50%-ного этилового спирта, гомогенизируют реагенты, нагревают массу при перемешивании до кипения, выдерживают 2 ч, мониторинг реакции вели методом ТСХ. Растворитель удаляют в вакууме, полученное вещество перекристаллизовывают до постоянной температуры плавления 193°C.

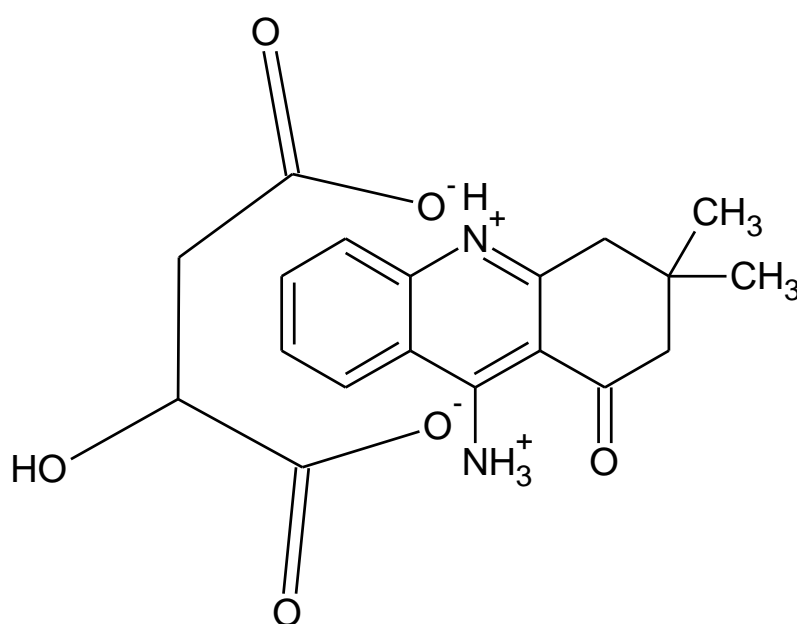


Рисунок 7 – Химическая структура 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она L-2-гидрокси-бутандиовата (лабораторный номер ЛХТ-17-19)

Найдено, %: С 60,91; Н 5,94; N 7,46  $C_{19}H_{22}N_2O_6$

Вычислено, %: С 60,95; Н 5,92; N 7,48; O 25,65

ИК-спектр,  $\nu$  см<sup>-1</sup>: 3160, 3080 (NH), 1925 (N<sup>+</sup>) 1620, 1630 (C=C), 1560 (COO-)

ТСХ на сорбенте Silikagel Merck F254, элюент вода:бутанол:ацетон (3:1:1), в зоне основной адсорбции одно пятно.

Масс-спектр протонированной субстанции: 375,39 (M + 1).

NMR (400 MHz): DMSO (d<sub>6</sub>):  $\delta$  ppm – CH<sub>2</sub> 1.77-1.88 (8 H.m); 2.73-2.91 (4H.m); C=C 7.63 (5H.m); N<sup>+</sup> 7.98-8.31 (4H.m).

В качестве препарата сравнения использовался ингибитор тирозинкиназы второго поколения эрлотиниб в виде субстанции (чистота > 98%, Merck SIGMA-Aldrich, Германия). Исследуемое соединение и препарат сравнения вводились животным внутривенно в вену хвоста в объеме растворителя 2 мл изотонического 0,9% раствора хлорида натрия.

## **2.7 Метод молекулярной идентификации ингибиторной активности ЛХТ-17-19 в отношении киназного домена EGFR**

Поскольку молекула ЛХТ-17-19 представляет собой соль, содержащую фрагмент L-2-гидроксипутандиовой кислоты, для проведения экспериментов по молекулярному докингу использовалась только 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1-(2H)-овая основа молекулы.

Для ориентированной на рецепторы гибкой стыковки использовался программный пакет Autodock 4.2 с открытым исходным кодом. Для приготовления лигандов применялась программа MGL Tools 1.5.6 (The Scripps Research Institute, США). Оптимизация лиганда проводилась с использованием программного обеспечения Avogadro с открытым исходным кодом. Для расчетов в Autodock 4.2. исходные форматы данных о рецепторах и лигандах были преобразованы в специальный формат PDBQT. Использовались кристаллографические структуры активных центров макромолекулы рецептора EGFRK из банка данных белков (PDB ID: 1M17). Карта рецепторов была подготовлена с применением программного обеспечения MGL Tools и AutoGrid. Молекулы воды, ионы и лиганды были удалены из PDB ID 1M17. Набор параметров для экспериментов по молекулярной стыковке представлен в таблице 1. Использовался Discovery Studio Visualizer для визуального анализа лиганд-рецепторных комплексов. Рассчитывалась аффинность

связывания (оценка  $dG$ , ккал/моль), свободная энергия связывания ( $E_{Dос}$ , ккал/моль) и коэффициент взаимодействия ( $K_i$ , мкМ).

Таблица 1 – Параметры проведения молекулярно-направленного докинга ЛХТ-17-19 с киназным центром EGFR (EGFRK)

Показатель	Значение
Шаг	2 Å
Торзионный коэффициент свободы	0,2983
Кластерная толерантность	2 Å
Внешняя энергия связывания	1000
Максимальная исходная энергия	0
Максимальное число попыток	10 000
Число структур в популяции	150
Максимальное число уровней вычисления энергии	2 500 000
Максимальное число генераций	27 000
Максимальное число структур, переходящих на следующий этап	1
Уровень мутаций генов	0,02
Уровень кроссовера	0,8
Метод кроссовера	Арифметический

## 2.8 Методы статистического анализа результатов диссертационного исследования

Перед проведением статистического анализа проверялась неоднородность экспериментальных данных и нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, а также в ряде случаев графически. Непрерывные переменные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение

или медиана с межквартильным интервалом. Межгрупповые различия оценивались с помощью двустороннего критерия ANOVA и теста Тьюки. Кривые Каплана-Мейера использовались для анализа выживаемости животных с цензурированием данных. Различия во времени выживания оценивались с помощью теста log rank. Для статистического анализа использовалось программное обеспечение STATA версии 17 (StataCorp. LLC, США).



## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Изучение анти-EGFR ингибиторного потенциала ЛХТ-17-19 в двух- и трехмерных культурах опухолевых клеток человека

Растущие достижения в области молекулярной биологии злокачественных новообразований, выявление внутриклеточных путей канцерогенной клеточной трансформации и прогрессирования ускоряют поиск перспективных лигандов, нацеленных на внутриклеточные драйверные макромолекулы.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой одну из широко известных киназ, которая играет ключевую роль во внутриклеточной метаболической регуляции многих видов опухолей эпителиального происхождения [6]. Ингибиторы киназ рассматриваются как эффективная основа стратегий лечения рака легкого, поджелудочной железы, молочной железы и других видов рака [8]. Химически они происходят из различных органических структур, таких как 4-хиназолиномин (эрлотиниб гидрохлорид, gefitinib), 2-бутенамид (афатиниб), 2-пропенамид (осимертиниб) и т. д. [156, 157]. 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 средств контроля внутриклеточной онкогенной активности EGFR актуальной задачей патологической анатомии и молекулярной фармакологии.

В связи с этим внимание нашей исследовательской группы привлек класс производных акридина. В лабораторных условиях был осуществлен довольно простой синтез молекулы ЛХТ-17-19, которая представляла собой соль 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1-(2H)-ОН и L-2-гидроксибутандиовая кислота. Добавление остатка карбоновой кислоты увеличивает растворимость молекулы в воде и позволяет использовать ее в виде водного раствора.

Для эффективного решения поставленных научных задач и достижения цели диссертации принято решение остановиться на двух клеточных моделях EGFR-ассоциированного онкогенеза – двухмерных клеточных культурах рака

желудка человека и трехмерной органоидной опухолеподобной культуре рака молочной железы.

### 3.1.1 Молекулярная идентификация активных центров киназного домена макромолекулы EGFR для контроля активности фермента

9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН показал высокое сродство к киназному домену EGFR (идентификатор PDB: 1M17) с показателем  $dG$  -7,9 ккал/моль,  $E_{Doc}$  -5,45. ккал/моль и  $K_i$  101,24 мкМ. Этот комплекс образовался за счет  $\pi$ - $\sigma$ -связей между ароматическими ядрами фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Leu820, Leu694 и Val702 (рисунок 8). Кроме того, алкильный и  $\pi$ -алкильный комплекс стабилизирован взаимодействиями метильных групп в положении 3 и фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Lys721, Met742, Ala719, Leu820, и Val702 (рисунок 9, таблица 2).

Таблица 2 – Молекулярная основа сродства ЛХТ-17-19 к киназному домену EGFR

Расстояние, Å	Взаимодействие	Тип связи
1	2	3
2.21	Не ковалентное	Водородная
3.87	Гидрофобное	$\pi$ - $\sigma$
3.93	Гидрофобное	$\pi$ - $\sigma$
3.89	Гидрофобное	$\pi$ - $\sigma$
4.86	Гидрофобное	Алкил-

Продолжение Таблицы 2

1	2	3
---	---	---

3.64	Гидрофобное	Алкил-
4.90	Гидрофобное	Алкил-
4.65	Гидрофобное	$\pi$ - Алкил
5.36	Гидрофобное	$\pi$ - Алкил
5.19	Гидрофобное	$\pi$ - Алкил
5.12	Гидрофобное	$\pi$ - Алкил

Следует отметить, что пристыковка 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН к активному центру тирозинкиназы сопровождалась возникновением внутримолекулярной водородной связи между кислород карбонильного атома и протон водорода аминогруппы с межатомным расстоянием 2,21 Å (рисунок 10).

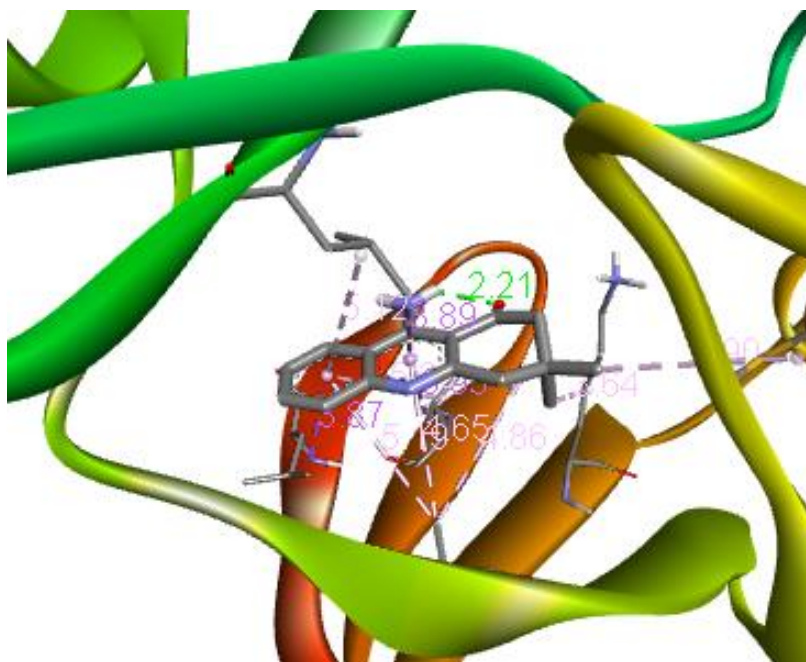


Рисунок 8 – Пространственная структура комплекса 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН с киназным доменом EGFR

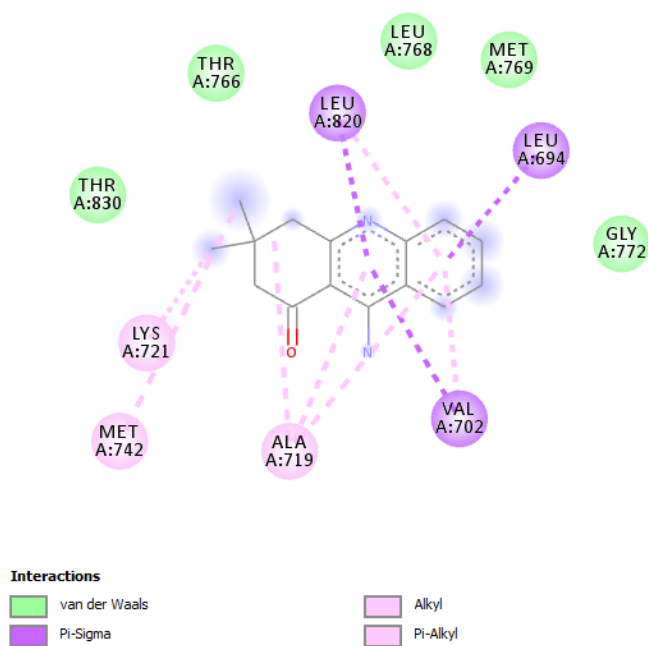


Рисунок 9 – Молекулярное взаимодействие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН с киназным доменом EGFR

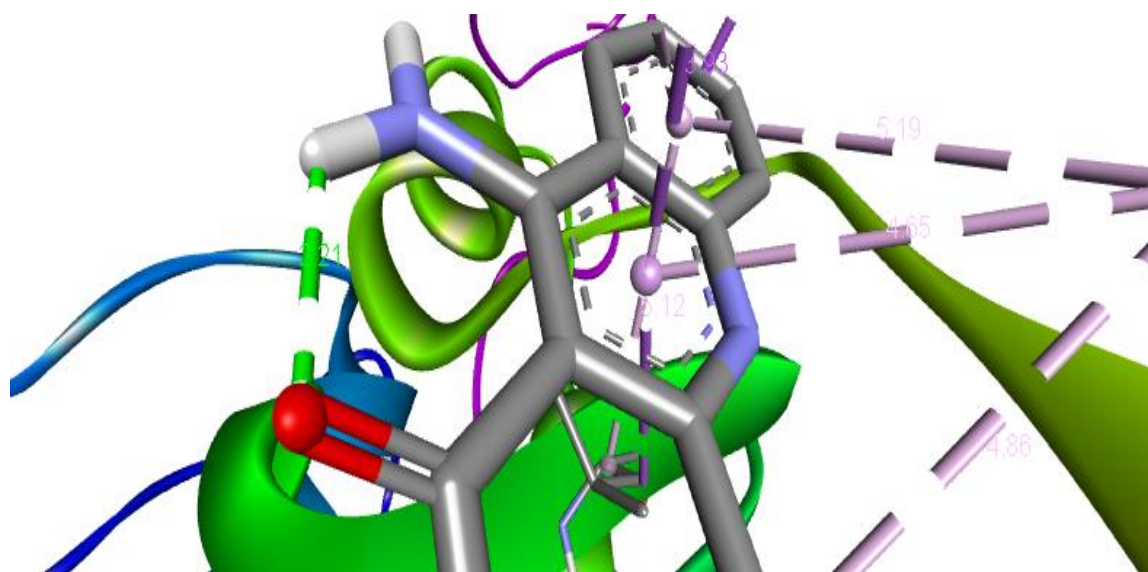


Рисунок 10 – Молекулярное взаимодействие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН с киназным доменом EGFR

### 3.1.2 Противоопухолевая активность ЛХТ-17-19 в различных культурах клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка

Способность исследуемого соединения молекулярно-направленного действия – производного акридина ЛХТ-17-19, а также препарата сравнения – ингибитора тирозинкиназы первого поколения эрлотиниба эффективно ингибировать активность киназу EGFR оценивалась на различных EGFR-положительных опухолевых клетках культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующих киназу EGFR дикого типа. Для этого клетки обрабатывались возрастающими дозами соединений (от 0,5 до 10 мкМ) в течение 24 часов, и статус фосфорилирования EGFR оценивался как маркер его киназной активности с помощью метода вестерн-блоттинга.

Как хорошо видно на рисунке 11, инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка Hs746T с различными концентрациями 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиовата сопровождалась развитием зависимой от концентрации цитотоксичностью.

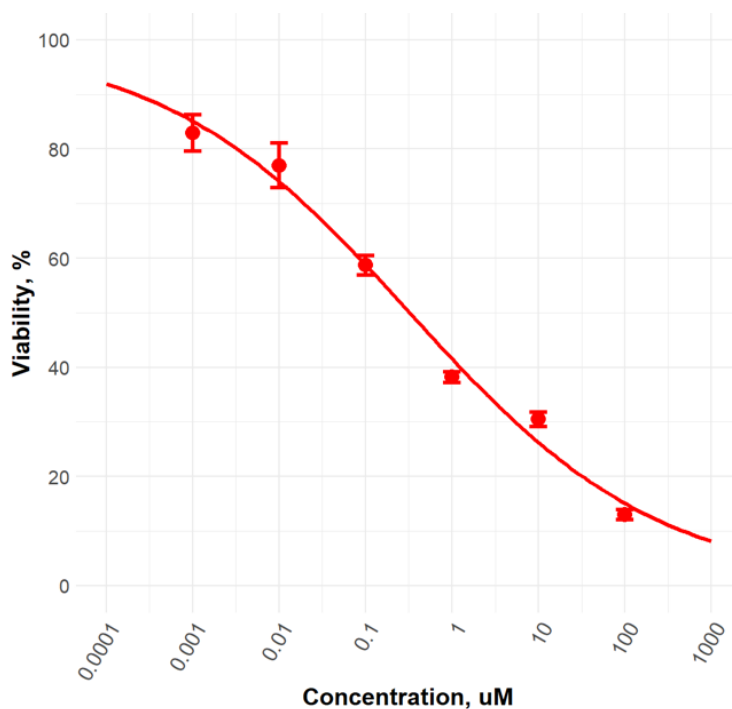


Рисунок 11 – Цитотоксическое действие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН в отношении клеток рака желудка Hs746T

Стоит отметить, что даже самая низкая изученная концентрация вызывала угнетение жизнеспособности клеток. Рассчитанный показатель  $IC_{50}$  составил 0,32 мкМ (95% доверительный интервал (ДИ) 0,11-0,54 мкМ).

Инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка AGS с нарастающими концентрациями 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиовата (ЛХТ-17-19) также приводила к развитию зависимой от концентрации цитотоксичности в отношении опухолевых клеток (рисуное 12).

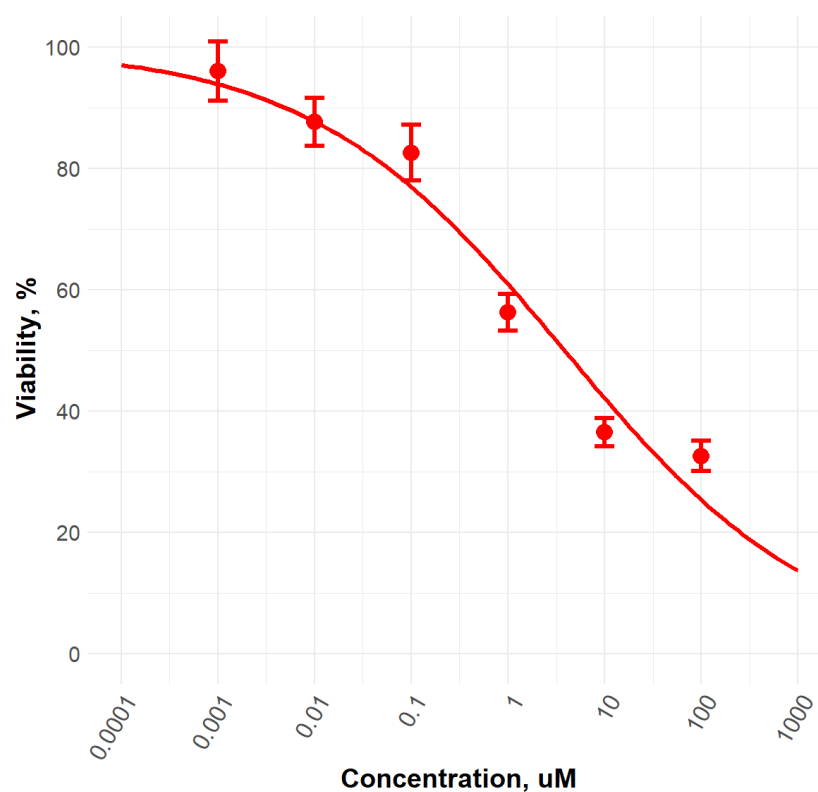


Рисунок 12 – Цитотоксическое действие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН в отношении клеток рака желудка AGS

Также, как и на предыдущей культуре, самая низкая изученная концентрация вызывала угнетение жизнеспособности клеток. Рассчитанный показатель  $IC_{50}$  составил 3,82 мкМ (95% доверительный интервал (ДИ) 0,00 -8,3 мкМ).

Инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка MKN1 с нарастающими концентрациями 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиовата (ЛХТ-17-19) также приводила к развитию зависимой от концентрации цитотоксичности в отношении опухолевых клеток (рисунок 13).

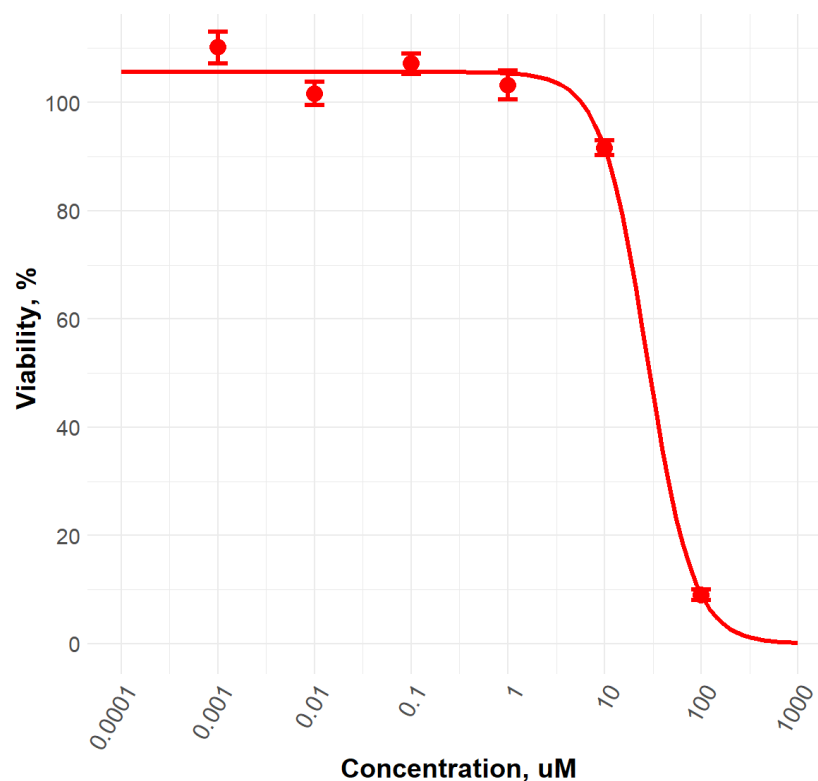


Рисунок 13 – Цитотоксическое действие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН в отношении клеток рака желудка MKN1

Однако, в отличие от предыдущих экспериментов, самая низкая изученная концентрация не вызывала угнетение жизнеспособности клеток, напротив, лишь при увеличении концентрации ЛХТ-17-19 до 1 мкМ наблюдали формирование цитотоксического действия соединения. При этом уже следующий порядок концентрации вызывал полную гибель клеток опухолевой культуры. Вычисленный показатель  $IC_{50}$  составил 27,63 мкМ (95% доверительный интервал (ДИ) 14,28 – 40,97 мкМ).

При изучении влияния экспериментального воздействия на активность внутриклеточного драйвера онкогенеза методом вестерн-блоттинга было установлено, что во всех трех культурах клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка обнаруживали снижение уровня фосфорилированной формы рецепторной тирозинкиназы (рисунок 14), однако уровень подавления активности фермента варьировал между культурами. Следует также подчеркнуть, что измерение проводилось в клетках, испытавших на себе воздействие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-бутандиовата в концентрациях от 0,0001 до 1000 мкМ.

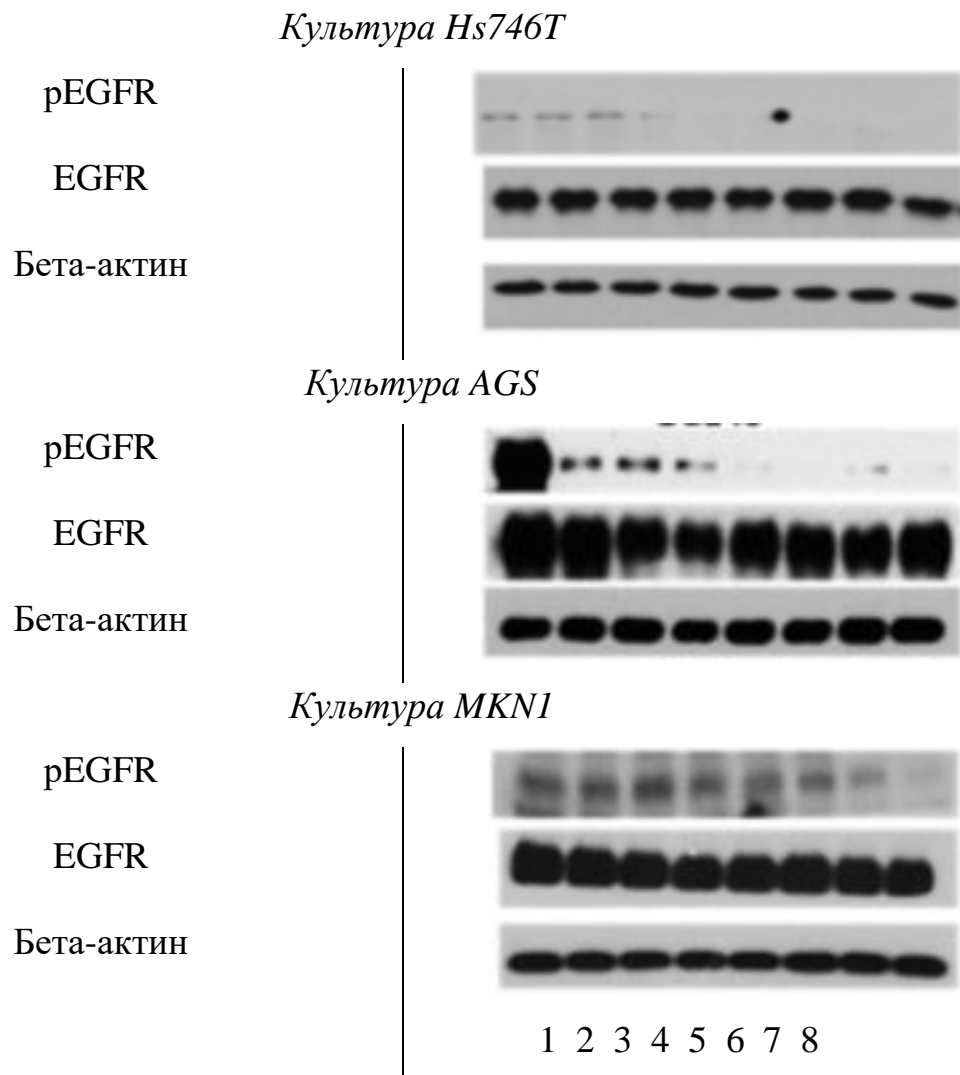


Рисунок 14 – ЛХТ-17-19 ингибирует активность EGFR в зависимости от концентрации в культурах клеток рака желудка: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – концентрации соединения в диапазоне от 0,0001 до 1000 мкМ



На рисунке 14 хорошо видно, что в культуре Hs746T соединение ЛХТ-17-19 в зависимости от концентрации снижает концентрацию фосфорилированной формы тирозинкиназы (pEGFR) при экспозиции вещества уже в концентрации 0,0001 мкМ. В культуре AGS наблюдается подобная динамика с той лишь разницей, что уровень экспрессии активной формы pEGFR остается выше, чем в экспериментах с Hs746T клетками.

Результаты, полученные в культуре MKN1, являются молекулярным подтверждением феномена цитотоксичности на фоне инкубации клеток в присутствии 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-бутандиовата: хотя жизнеспособность клеток при воздействии высоких (10-100 мкМ) концентраций вещества подавлялась, соединение в меньших концентрациях не снижало метаболической активности клеток.

### **3.1.3 Органоидная опухолеподобная культура EGFR-экспрессирующего рака молочной железы как модель для изучения активности соединения ЛХТ-17-19**

Противоопухолевые свойства молекулярно-направленного средства ЛХТ-17-19 в сравнении с коммерческим таргетным ингибитором тирозинкиназы эрлотинибом оценивались на органоидной (patient-derived organoid – PDO) модели рака молочной железы, экспрессирующего дикий тип EGFR. Для формирования органоидов использовалась свежую опухолевую ткань 68-летней пациентки с билатеральным раком молочной железы, ранее не подвергавшимся химиотерапии, подтвержденная морфологически и иммуногистохимически (ИГХ). Образец ткани объемом ~120 мм<sup>2</sup> был получен во время хирургической операции, проведенной в ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ» и разделен на три равные части. Одна часть образца фиксировалась и затем использовалась для патоморфологического исследования, второй фрагмент замораживался (до температуры -90°C) и подвергался молекулярному анализу.

## Патоморфологическая валидация органоидной опухолеподобной культуры рака молочной железы

Для морфологической валидации окрашивались срезы исходного опухолевого образца и выращенных органоидов рака молочной железы гематоксилином и эозином, а также проводилось иммуногистохимическое окрашивание со следующими антителами: кроличьи моноклональные антитела к рецептору эстрогена (ER), рецептору прогестерона (PR) человека, анти-Her2/neu и анти-Ki67 антитела (DAKO, Agilent Technology, США) (рисунки 15 и 16). Также определялся уровень экспрессии рецепторной тирозинкиназы EGFR.

При окрашивании гематоксилином и эозином установлено, что образец исходной ткани соответствует морфологической структуре протоковой аденокарциномы молочной железы (рисунок 15А). При этом, патологоанатомическая микроструктура органоидов полностью воспроизводит морфологический вариант исходного опухолевого образца (рисунок 15В). Светлые очаги округлой или неправильной формы в центре органоидных структур представляют собой очаги некроза опухолевой ткани вследствие отсутствия васкуляризации органоидов (бессосудистые структуры).

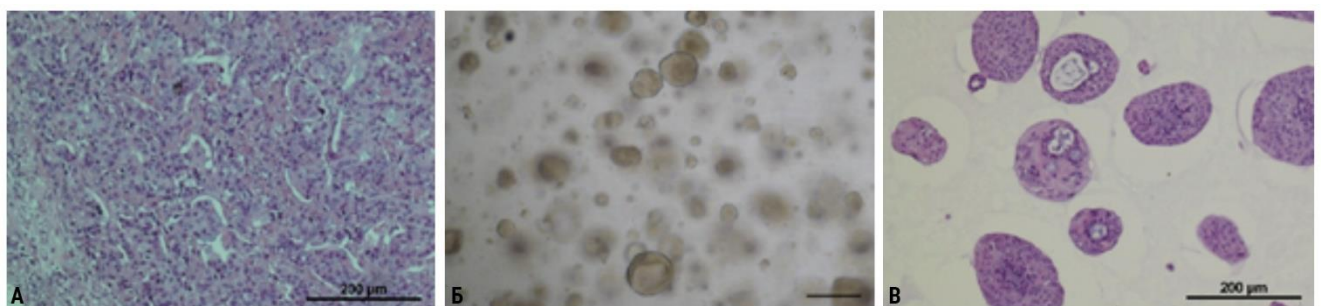


Рисунок 15 – Микропрепараты исходного образца опухоли пациентки 68 лет (А), органоидных культур после 7 суток их инкубирования в питательной среде (Б, В): А и В – окрашивание гематоксилином и эозином; Б – нативные препараты в проходящем свете;  $\times 200$

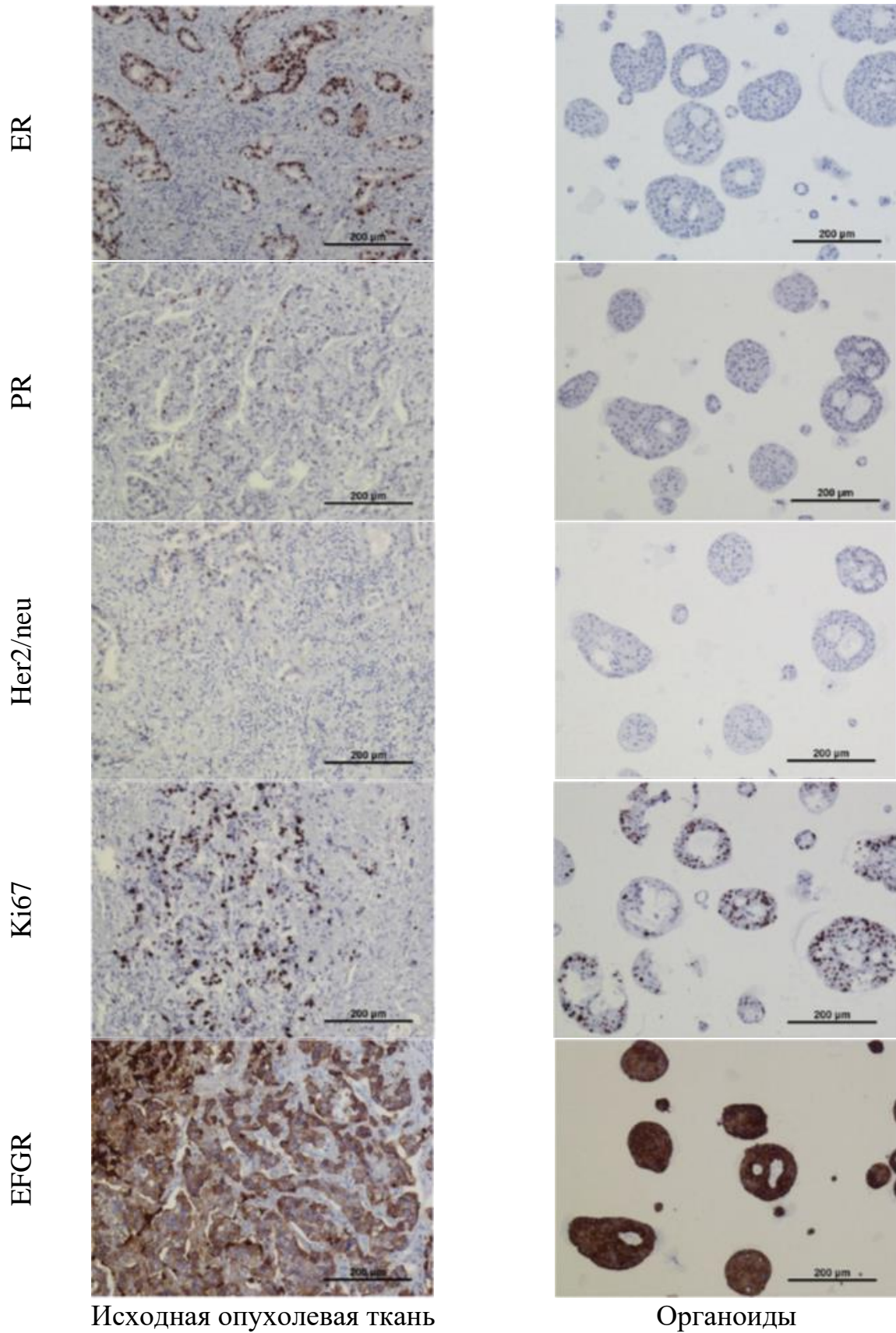


Рисунок 16 – Экспрессия клеточных маркеров рака молочной железы в исходной опухолевой ткани и в органоидах, ИГХ,  $\times 200$

Патоморфологический иммуногистохимический анализ интраоперационного материала показал, что представленные клетки рака молочной железы характеризовались как ER-положительные, PR-отрицательные, Her2/neu-отрицательные, EGFR-положительные с индексом экспрессии Ki-67 40%. Экспрессия прогестероновых рецепторов, Her2/neu и EGFR исходной ткани рака молочной железы сохранялась в органоидах. Индекс экспрессии Ki-67 клеток органоидов также был близок к первичной ткани (35%).

Вместе с тем, установлено, что статус экспрессии рецептора эстрогена не сохранялся в органоидах. Однако это явление ранее наблюдалось группой исследователей под руководством Hans Clevers, одними из пионеров исследования органоидов, полученных от пациентов [158]. Ими также показано, что таже ER-отрицательные опухоли могут генерировать ER-положительные органоиды [159].

Стоит особо отметить, что статус мембранной экспрессии эстрогеновых рецепторов не является конститутивным фенотипическим признаком опухолевых клеток. Многочисленные исследования показали гибкость эстрогеновых рецепторов на протяжении всей эволюции опухолевой прогрессии [160]. Более того, рецептор эстрогена- $\beta$  может быть активирован несколькими молекулами небольшой молекулярной массы, включая 3,30-дииндолилметан [161].

### **Молекулярно-генетическая валидация органоидной опухолеподобной культуры рака молочной железы**

На следующем этапе проведен анализ экспрессии гена *EGFR* в клетках исходной опухолевой ткани и выращенных органоидных культур (рисунок 17). Установлено, что в клетках исходной опухолевой ткани экспрессия гена рецепторной тирозинкиназы составляет  $27 \pm 4\%$ . В клетках замороженных образцов органоидов экспрессия целевого гена была равна  $31 \pm 5\%$  ( $p = 0,35$  при сравнении с экспрессией в исходной опухолевой ткани), что также

свидетельствует о сохранении клетками органоидов молекулярного паттерна *EGFR* экспрессии «материнских» клеток рака молочной железы.

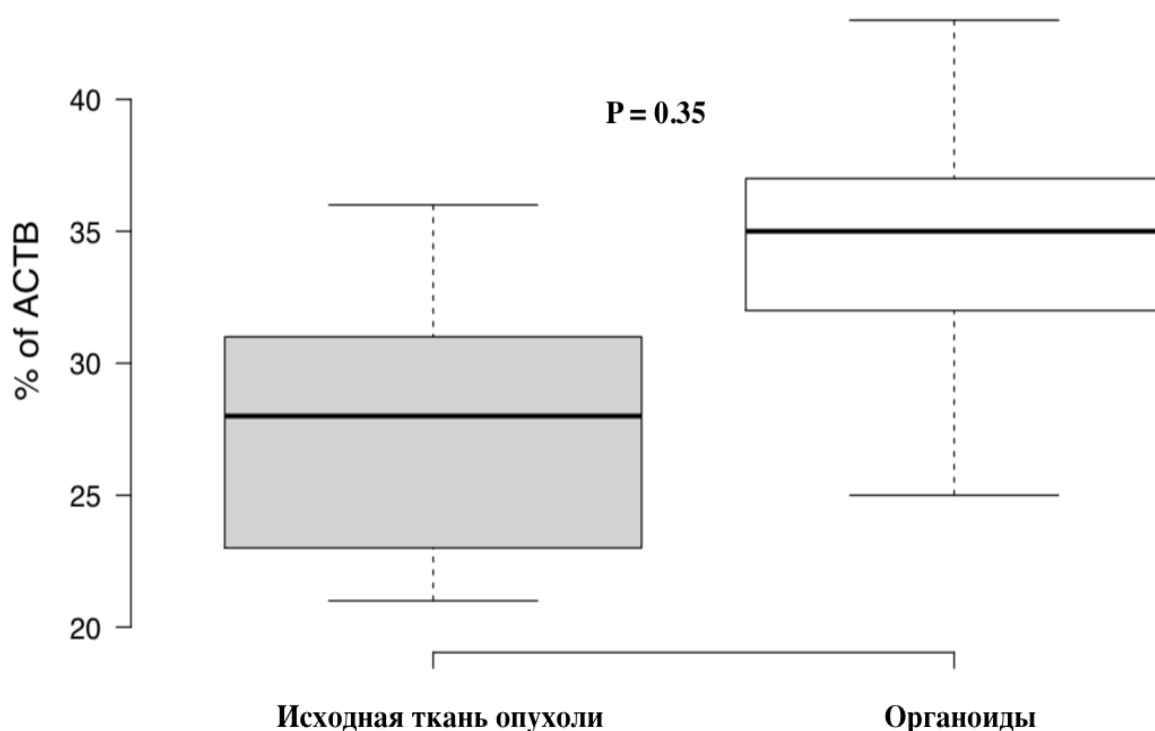


Рисунок 17 – Экспрессия гена *EGFR* в клетках исходной опухолевой ткани и выращенных органоидных культур (достоверность различий оценивали после проверки нормальности распределения с помощью двустороннего критерия t Стьюдента)

Полученные результаты патоморфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования позволили считать органоидную модель рака молочной железы валидированной как ER-отрицательную, PR-отрицательную, Her2/neu-отрицательную, EGFR-положительную с индексом экспрессии Ki-67 35%, что соответствует молекулярному профилю тройного негативного EGFR-экспрессирующего рака молочной железы.

## Противоопухолевая активность ЛХТ-17-19 на органоидной опухолеподобной культуре рака молочной железы

После семидневной инкубации культуры органоидов с 0,5-60,0 мкМ ЛХТ-17-19 наблюдалась депрессия роста органоидных телец. Повышение концентрации 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандивата до 250 и 1000 мкМ привело к существенному уменьшению размера органоидов (рисунок 18). Циторедукция свидетельствовала не только об ингибировании пролиферации, но и формировании цитотоксического эффекта соединения.

Вычисленный индекс ингибирования роста органоидов (growth inhibition,  $GI_{50}$ ) составил 0,32 мкМ (95% ДИ 0,11–0,54 мкМ).

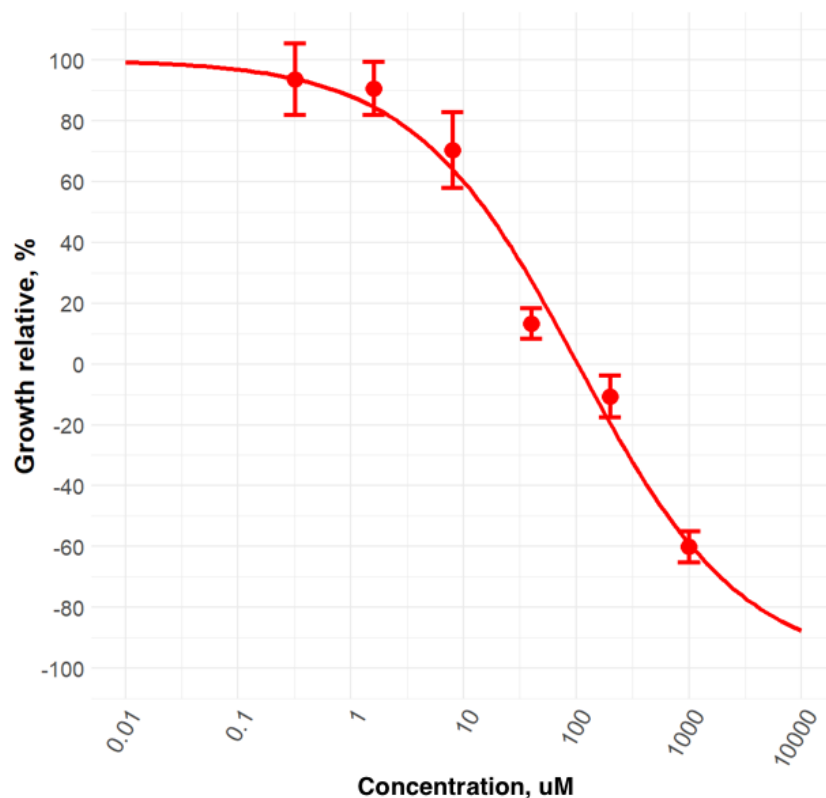


Рисунок 18 – Цитоторедуктивное действие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандивата в отношении клеток тройного негативного EGFR-экспрессирующего рака молочной железы

Таким образом, на двухмерных и трехмерных культурах опухолевых клеток нами была показана возможность контроля онкогенной экспрессии EGFR соединением акридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (ЛХТ-17-19). Так, в частности, было установлено, что инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка сопровождается развитием цитотоксического действия соединения при увеличении его концентрации. При этом, молекулярной основой формирования фармакологической активности служит снижение внутриклеточной концентрации активной – фосфорилированной – формы рецепторной тирозинкиназы в клетках. Наименее чувствительной к действию соединения была культура MKN1.

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 транслокация клеток сопровождалась потерей экспрессии эстрогеновых рецепторов и смены молекулярного паттерна органоидной опухоли в сторону более агрессивного тройного негативного варианта. Инкубация органоидов 0,5-60,0 мкМ ЛХТ-17-19 сопровождалась не только ингибированием их роста и пролиферации, но и существенной циторедукцией.

### **3.2 Ксенографтная модель EGFR-экспрессирующего немелкоклеточного рака легкого – молекулярная и патоморфологическая валидация, анализ активности потенциального ингибитора**

Гетеротопическая животная модель ксенотрансплантата (PDX) экспрессирующей EGFR карциномы легкого, полученной от пациента, была воспроизведена у самцов мышей BALB/c *nu/nu* в возрасте 10 недель. Перед ксенотрансплантацией все животные подвергались процедуре гуманизации,

включавшей сублетальное рентгеновское облучение и трансплантацию CD8+ лимфоцитов человека.

Образец ткани немелкоклеточной EGFR-экспрессирующей ALK-позитивной аденокарциномы легкого, не получавшей химиотерапевтического воздействия, объемом ~120 мм<sup>2</sup> был получен во время хирургической операции 71-летнего мужчины, проведенной в ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ» и разделен на три равные части. Одна часть образца фиксировалась и затем использовалась для патоморфологического исследования, второй фрагмент замораживался (до температуры -90°C) и подвергался молекулярному анализу.

### **3.2.1 Патоморфологическая и молекулярная валидация ксенографтной опухоли**

Рак легкого занимает второе место по распространённости в структуре онкологической заболеваемости и уровню смертности как у мужчин, так и у женщин [142]. На мелкоклеточный рак легкого приходится 10-15% случаев рака легкого и до 85% - на немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), основными подтипами которого являются аденокарцинома, плоскоклеточный рак и крупноклеточная карцинома [163]. С молекулярной точки зрения интерес представляет идентификация молекулярных драйверов НМРЛ, активируемых соматическими мутациями в генах TP53 (tumor protein p53), KRAS, KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), STK11 (Serine/threonine kinase 11) и EGFR [164]. Для проведения доклинических исследований потенциальных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства важную роль играет создание адекватных *in vivo* и *in vitro* моделей для определения их специфической активности, позволяющих транслировать результаты в реальную клиническую практику. В последние годы были предложены различные клеточные и животные модели, среди которых наиболее активно обсуждаются органоидные модели рака легкого из тканей пациента, введение опухолевых клеток в хвостовую вену мышей, создание ксенографтных моделей у иммунодефицитных животных и т.д.



Настоящий раздел исследования посвящен морфологической и иммуногистохимической валидации ксенографтной модели НМРЛ, созданной у атимичных мышей линии BALB/c *nu/nu* [165].

Иммуногистохимическое исследование также осуществлялось в автоматическом режиме с использованием кроличьих анти-Ki67, анти-СК7 и анти-TTF1 антител (Abcam, Великобритания). Оценка гистологических препаратов осуществлялась согласно рекомендациям ВОЗ (WHO Classification of Tumours. Thoracic tumours. 5th Edition, 2021) [166].

При окрашивании гематоксилином и эозином опухолевый узел, забранный от пациента с периферическим раком легкого, имел строение аденокарциномы, состоящей из ацинарных структур, выстланных эпителием, с признаками умеренной пролиферации и атипии. Вокруг опухолевых комплексов отмечалась умеренная десмопластическая реакция стромы (по Tils до 15%). Морфологическая картина опухолевого узла третьей генерации животных при окраске гематоксилином и эозином соответствовала аденокарциноме ацинарного строения, G II (рисунок 19А). Десмопластическая реакция карциномы слабая, Tils менее 5%. Для определения иммунофенотипа и гистогенеза карциномы легкого использован ядерный маркер TTF1 и субмембранный маркер СК7 [167]. При сличении контрольной опухоли и опухолевых узлов животных отмечается сходная иммуногистохимическая картина, диффузное позитивное ядерное анти-TTF1 окрашивание 90% клеток карциномы опухоли пациента и ксенографтной карциномы (рисунок 19Б), что доказывает иммунофенотипическую принадлежность к карциноме легкого (рисунок 19Г). Диффузное позитивное субмембранное окрашивание 90% клеток карциномы пациента анти-СК7 антителами и 75% клеток ксенографтной опухоли доказывает аденогенный генез карциномы. Индекс пролиферации Ki67 в контрольной опухоли был равен 73%, в ксенографтной опухоли – 85% (рисунок 19В) [167].

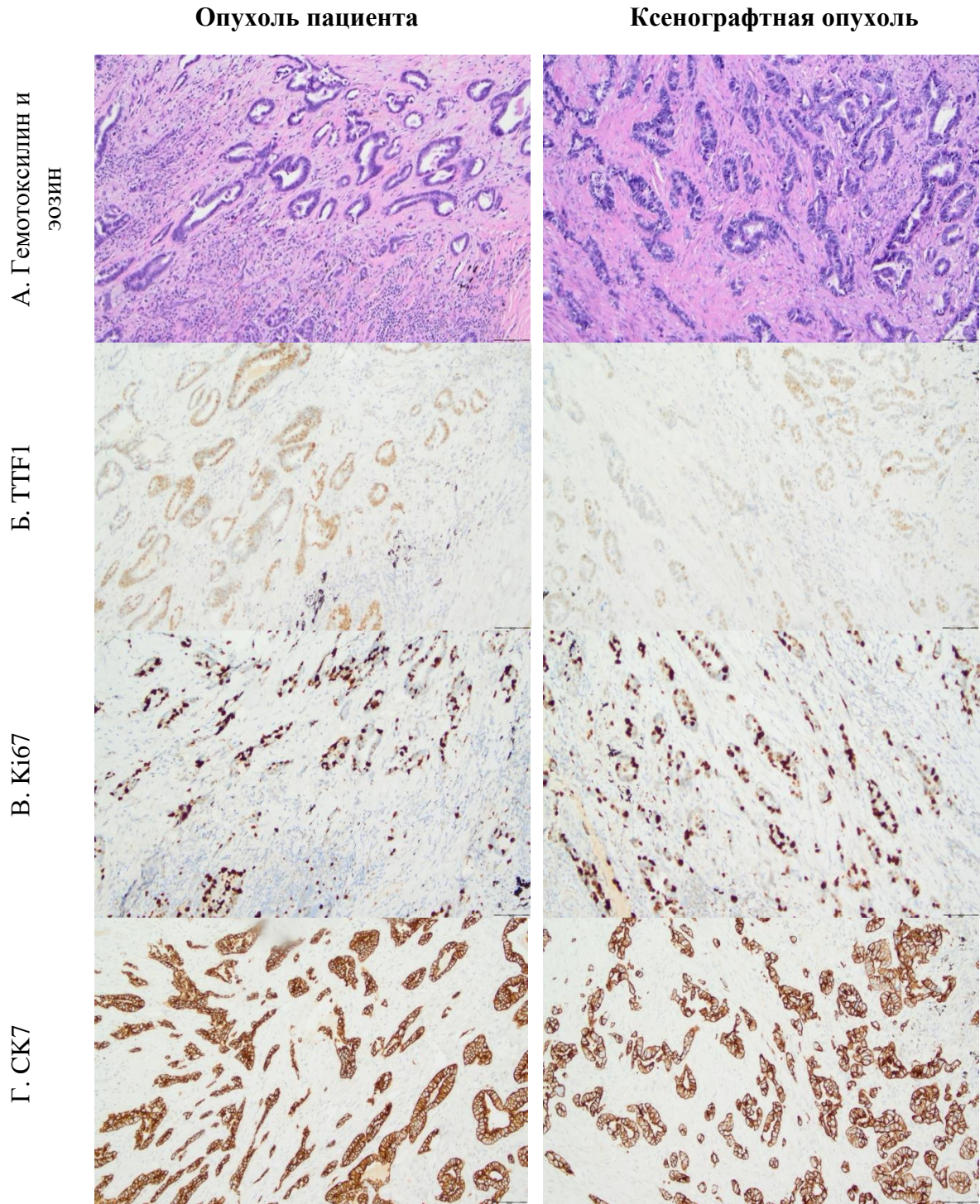


Рисунок 19 – Микропрепараты опухоли пациента и ксенографтной опухоли третьей генерации, развивавшейся в организме гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu*,  $\times 200$ ; гематоксилин и эозин, ИГХ; пояснения в тексте



Одной из важнейших задач настоящего раздела работы было установление соответствия экспрессии драйвера онкогенной трансформации – рецепторной киназы EGFR ксенографтного узла образцу исходного опухолевого материала. Интенсивное полномембранное окрашивание с анти-EGFR антителами обнаружено более чем в 10% опухолевых клеток как исходного образца, так и сформированной ксенографтной опухоли (рисунок 20).

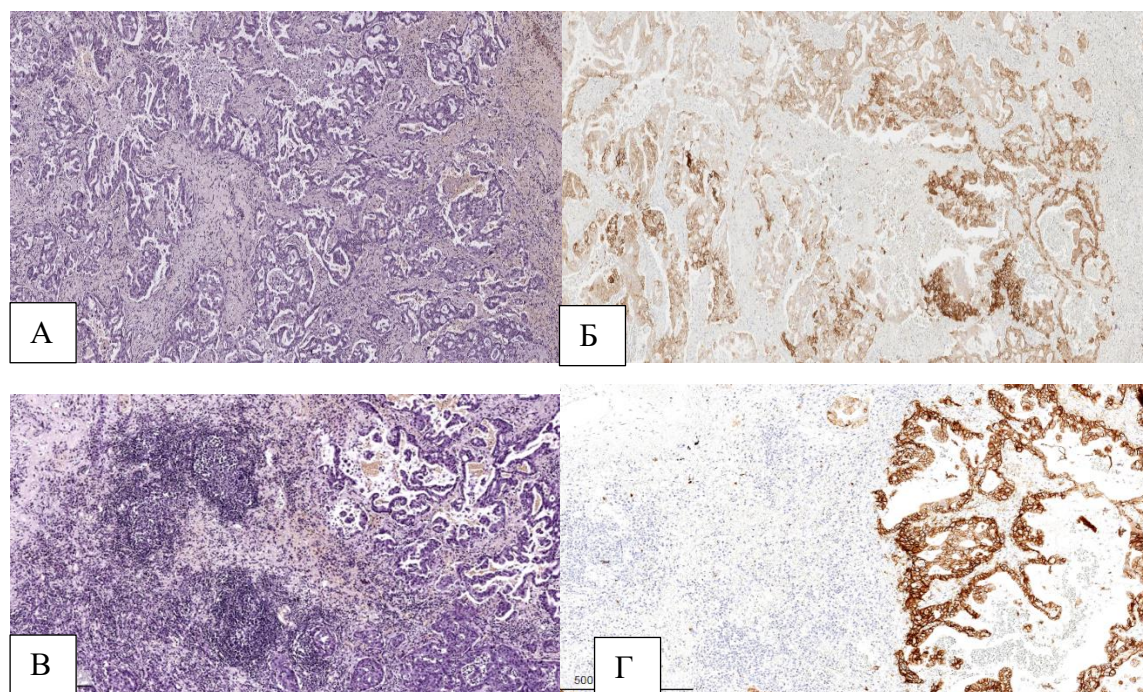


Рисунок 20 – Микропрепараты опухоли пациента и ксенографтной опухоли третьей генерации, развивавшейся в организме гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu*,  $\times 200$ ; ИГХ; пояснения в тексте

Однако, учитывая, что в настоящее время не существует единой валидированной шкалы для оценки уровня экспрессии антител к EGFR, результаты были подтверждены методом ПЦР в режиме реального времени. Было установлено, что, как и исходная опухолевая ткань, так и клетки ксенографта НМРЛ несут активирующую мутацию – делецию в экзоне 19 гена *EGFR* (Del19). В то же время, вставки в экзоне 20 гена *EGFR*, а также патогенные aberrации S768I, T790M, L858R, L861Q и aberrации в кодоне 719 не были обнаружены методом ПЦР в реальном времени.

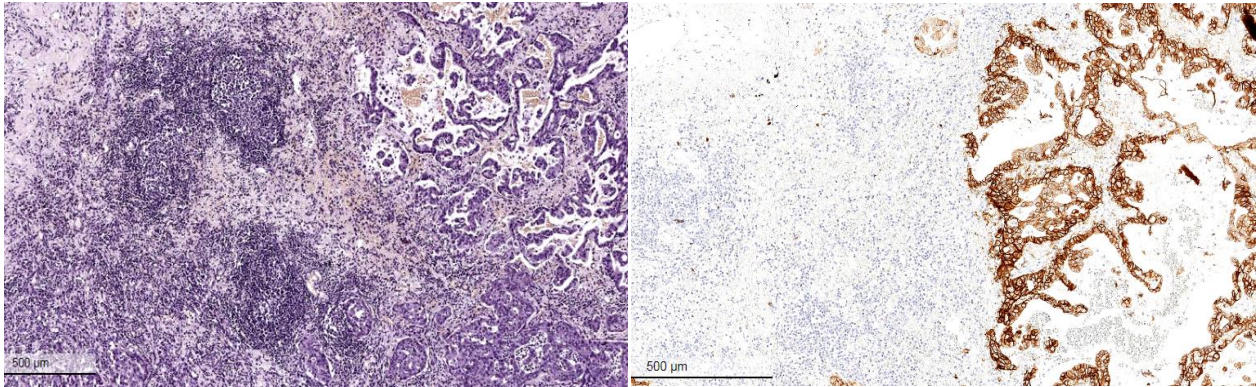
Следовательно, в результате проведения патоморфологической и молекулярной валидации модели было сделано заключение, что опухоль третьей генерации, развивающаяся в организме атимичных гуманизированных мышей, сохраняет морфологические, иммуногистохимические и молекулярные черты исходной опухоли легкого пациента. Описанный экспериментальный подход может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной онкологии.

### **3.2.2 Анализ активности ингибитора тирозинкиназ – соединения ЛХТ-17-19 на валидированной ксенографтной модели EGFR-экспрессирующего рака легкого**

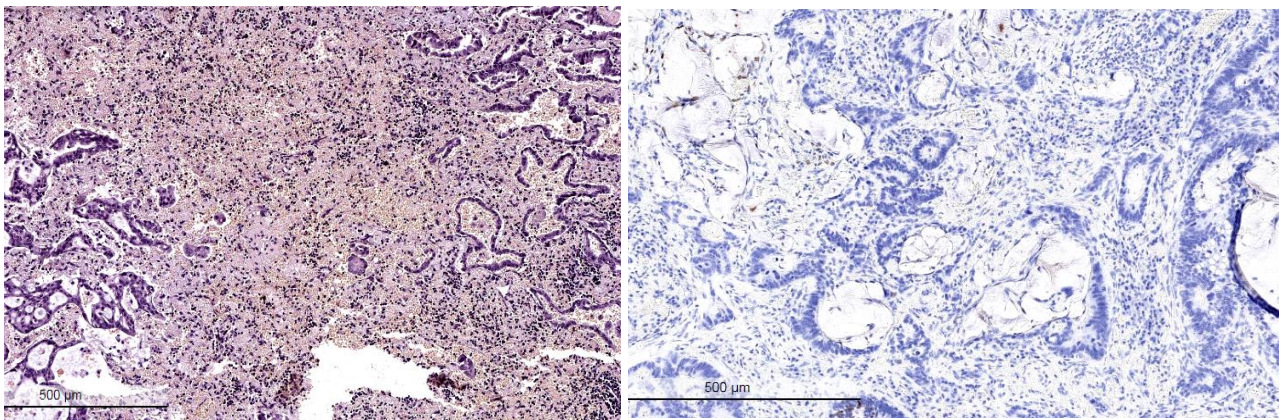
После проведения экспериментальной терапии 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (ЛХТ-17-19) в суточной дозе 2 мг/кг внутривенно струйно в течение 7 суток в резидуальной опухоли отмечалось уменьшение количества опухолевых структур до 30% от осмотренных участков с дистрофическими изменениями клеток, очагами фиброза. Все это соответствовало II степени лекарственного патоморфоза по Миллеру. Окрашенная специфическими антителами опухоль показала отсутствие анти-EGFR окрашивания мембраны (рисунок 21). Патологических вставок в экзоне 19 гена *EGFR* не обнаруживали [167]. Подобные же изменения были зарегистрированы в группе препарата сравнения эрлотиниба.



## EGFR-экспрессирующая мутантная ксенографтная опухоль, контроль



## EGFR-экспрессирующая мутантная ксенографтная опухоль, ЛХТ-17-19, 2 мг/кг



А

Б

Рисунок 21 – Микропрепараты EGFR-экспрессирующей мутантной ксенографтной опухоли третьей генерации, развивавшейся в организме гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu*, в контроле и на фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 7 суток: А – гематоксилин и эозин; Б – анти-EGFR ИГХ окрашивание;  $\times 500$

Одним из показателей злокачественности новообразования является его метастатическая активность. При этом, важное значение имеет количество метастатических очагов на фоне лечения как показатель эффективности изучаемой интервенции. Экспериментальная терапия мышей-носителей мутантного генотипа экспрессирующего EGFR ксенотрансплантата карциномы легкого соединением акридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксибутандиватом (ЛХТ-17-19) приводило к снижению числа

отдаленных метастазов до  $22,5 \pm 3,4$  против  $88,6 \pm 7,8$  в контрольной группе ( $p = 0,001$ ) (рисунок 22).

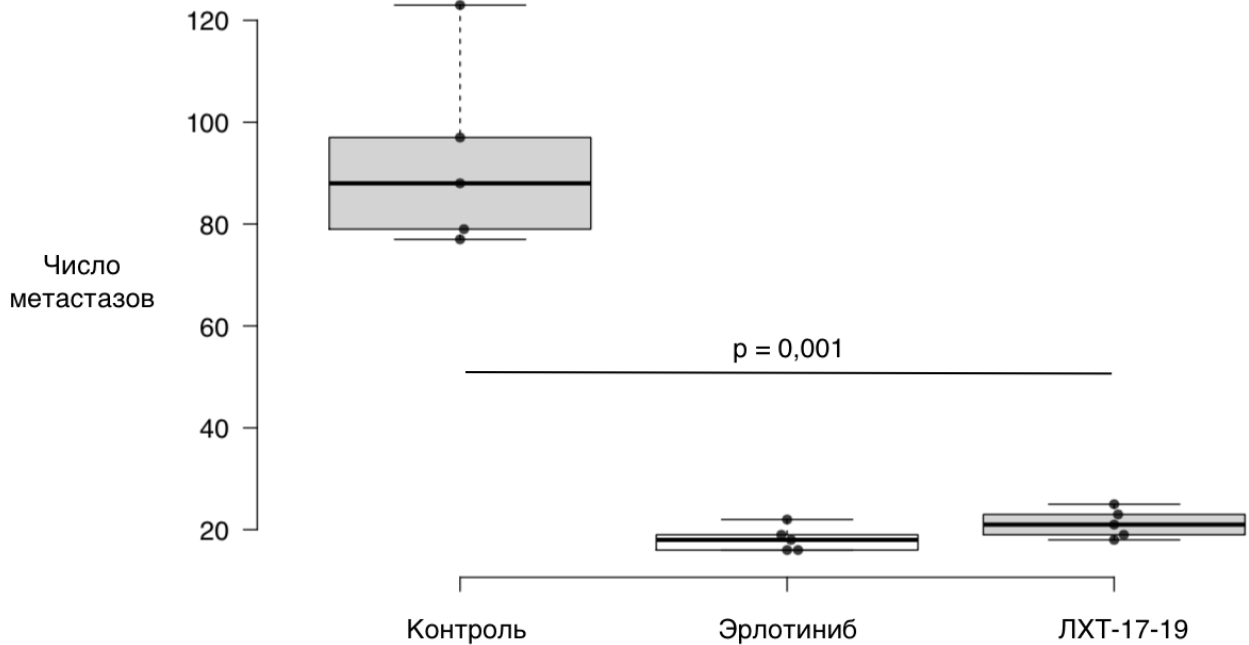


Рисунок 22 – Число отдаленных метастазов EGFR-экспрессирующей мутантной ксенорафтной опухоль в контрольной группе и в группе экспериментальной терапии соединением ЛХТ-17-19 в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 7 суток. Достоверность различий определена после проверки нормальности распределения с помощью критерия t Стьюдента с поправкой Бонферрони

Одним из наиболее чувствительных показателей эффективности экспериментальной противоопухолевой терапии на лабораторных моделях канцерогенеза у животных является показатель времени удвоения объема опухолевого узла. Путем периодических измерений трех взаимно перпендикулярных размеров ксенотрансплантата вычислялся объем опухоли и рассчитывался индекс удвоения в контрольной и опытных группах (рисунок 23). Зарегистрировано значительное увеличение времени удвоения объема опухоли до  $26,5 \pm 4,4$  в группе лечения ЛХТ-17-19, тогда как в контроле среднее время составило  $10,7 \pm 2,7$  ( $p = 0,005$ ) (рисунок 23). Следует отметить, что в группе

препарата сравнения эрлотиниба показатель составил  $27,8 \pm 3,1$ , что не имеет статистически достоверных отличий от исследуемого соединения.

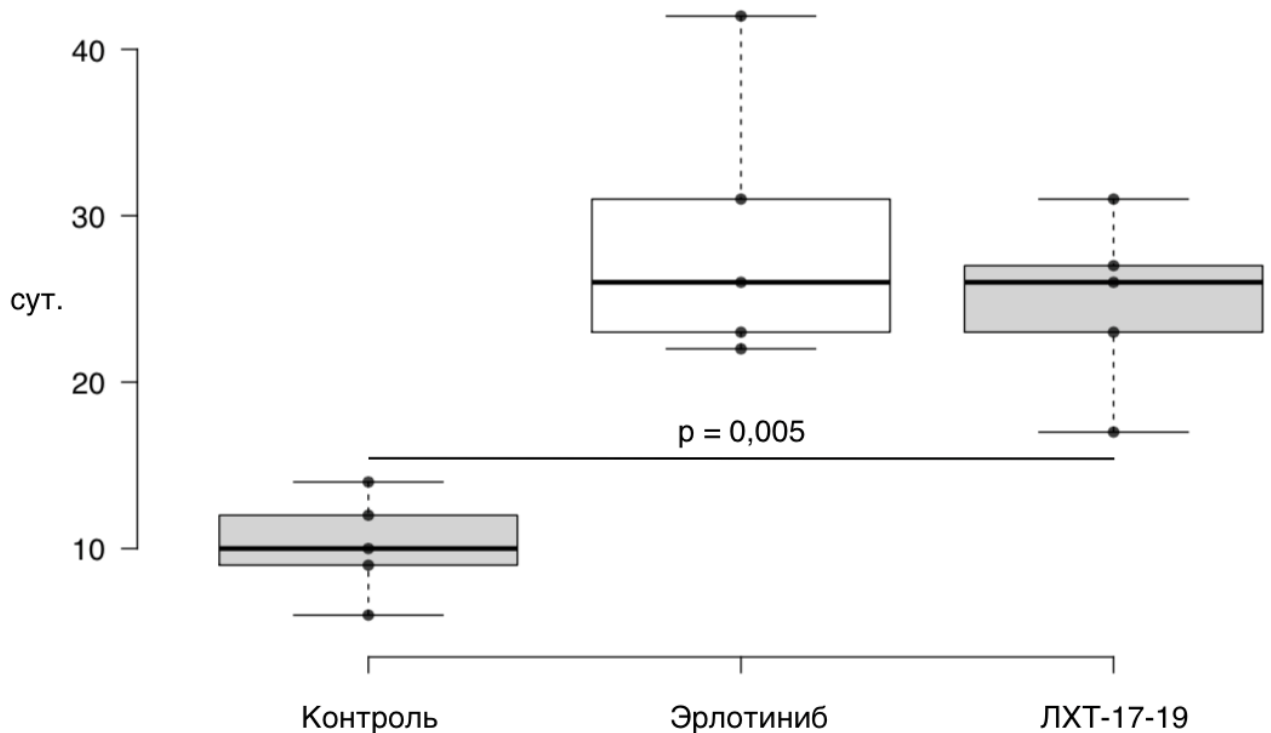


Рисунок 23 – Число отдаленных метастазов EGFR-экспрессирующей мутантной ксенорафтной опухоли в контрольной группе и в группе экспериментальной терапии соединением ЛХТ-17-19 в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 7 суток. Достоверность различий определена после проверки нормальности распределения с помощью критерия t Стьюдента с поправкой Бонферрони

Наиболее информативным показателем эффективности интервенционного воздействия на опухоль, в том числе отражающем и реакцию макроорганизма носителя опухоли на воздействие, является показатель выживаемости. Для оценки выживаемости лабораторных животных были построены кривые Каплана-Мейера. Различия в продолжительности жизни определялись методом log-rank.

Терапевтический эффект ЛХТ-17-19 приводил к увеличению выживаемости лабораторных мышей (рисунок 24): расчетная медиана времени выживания в экспериментальной группе лечения составила 31 день, в группе препарата

сравнения второго поколения эрлотиниба – 33 дня, против 25 дней в контрольной группе (логарифмический ранговый критерий = 5,441,  $p = 0,02$ ).

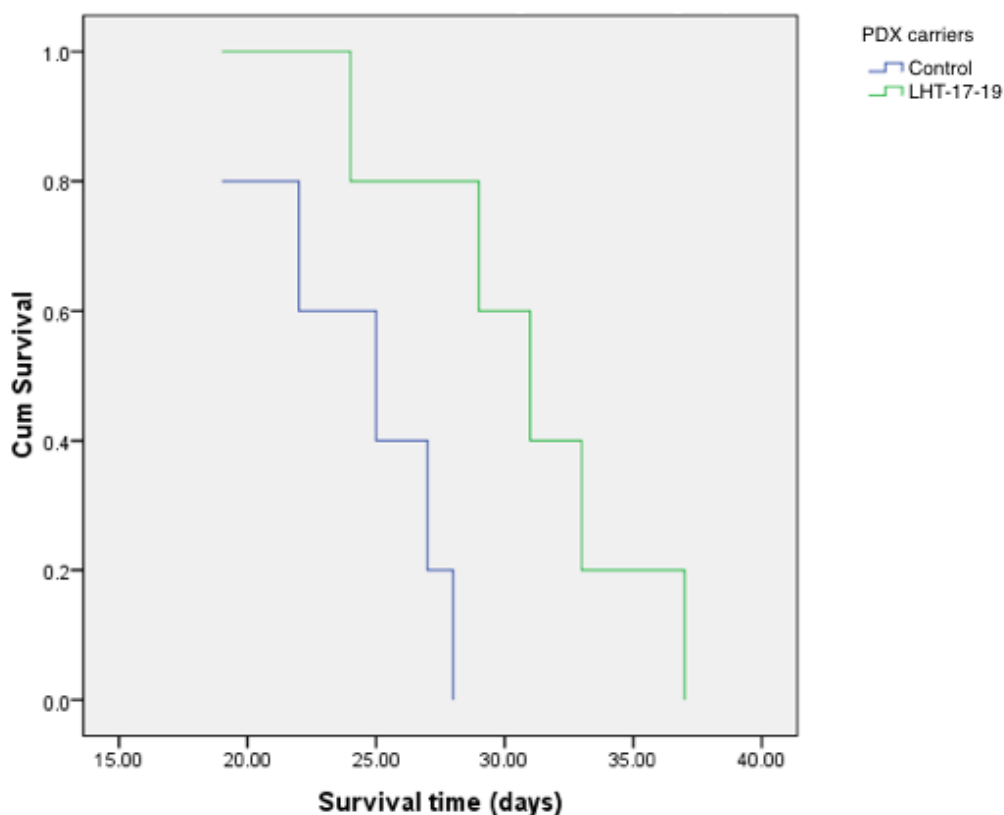


Рисунок 24 – Выживаемость (кривые Каплана-Мейера) гуманизированных мышей – носителей EGFR-экспрессирующей мутантной ксенорафтной опухоли в контрольной группе и в группе экспериментальной терапии соединением ЛХТ-17-19 в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 7 суток. Достоверность различий определена после расчета медиан выживаемости с помощью критерия log-rank

Таким образом, на основании проведенного исследования удалось провести молекулярную и патоморфологическую валидацию метода формирования ксенотрансплантата EGFR-экспрессирующей мутантной ксенорафтной немелкоклеточной карциномы легкого с делецией в экзоне 19 гена *EGFR*, позволяющей проводить трансляционные исследования новых видов лекарственных интервенций.

В результате всестороннего изучения нового соединения дигидроакридон 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксibuтандиватом (соединение ЛХТ-17-19), которое вводили



гуманизированным животным со сформированным ксенографтом опухоли в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 2 суток, 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.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация внутриклеточного сигнального пути эпидермального фактора роста и его рецептора (EGF/EGFR) играет одну из ключевых ролей в опухолевой прогрессии и тесно связана с экспрессией природного активирующего лиганда EGFR – гомолога вирусного онкогена эритробластной лейкемии (ERBB). В свою очередь установлено, что экспрессия ERBB повышается в процессе формирования опухолевого микроокружения, прогрессии опухоли и при формировании противоопухолевой химиорезистентности. В этой связи поиск перспективных путей управления канцерогенной трансформацией опухолевых клеток и прогрессии злокачественных опухолей, экспрессирующих EGFR, представляется одним из наиболее перспективных и развивающихся направлений современной молекулярной патологии и фармакологии, что определяет высокую актуальность настоящего диссертационного сочинения с позиций общемировой научно-исследовательской медицинской повестки.

Важнейшим элементом современной персонализированной терапии онкологических заболеваний является поиск и валидация релевантных биологических моделей, воспроизводящих в условиях, максимально приближенных к реальным, патологический процесс во всей его сложности и многоуровневом многообразии. Это многообразие, в свою очередь, определяется собственно опухолевыми клетками и микроокружением или опухолевой экосистемой. Каждый из этих компонентов включает целый комплекс молекулярных характеристик, формирующих тканевой пейзаж злокачественного новообразования.

Идентификация и понимание роли органных, тканевых, клеточных и субклеточных процессов во всей их широте и сложности лежит в основе определения главных и эффективных направлений борьбы с неопластической клеточной трансформацией и действенных инструментов контроля всех элементов опухолевой прогрессии – роста, инвазии, метастазирования.

Говоря об индивидуализированных опухолевых моделях, следует обратить внимание, что сегодня в фундаментальной и прикладной медицинской науке используются культуры опухолевых клеток, трехмерные объемные опухолеподобные конструкции – органоиды и тумороиды – включающие и не содержащие клеточные компоненты опухолевого микроокружения, животные модели сингенных и ксенографтных опухолей. Правильный выбор модели, ее патоморфологическая, в том числе и иммунофенотипическая, и молекулярная валидация определяют успех инновационной противоопухолевой интервенции, гарантируют оптимальные эффективность и скорость трансляции результатов доклинических изысканий в реальную клиническую практику.

Именно поэтому целью данной диссертационной работы явилась разработка эффективного способа контроля канцерогенеза, обусловленного активацией EGFR-ассоциированного драйверного механизма, на примере злокачественных опухолей желудка, молочной железы и легкого.

В связи с очевидной мультидисциплинарностью сформулированной цели исследования диссертация выполнялась на стыке научных специальностей патологическая анатомия и фармакология, клиническая фармакология, и потребовала привлечения, помимо классических методов патоморфологии и фармакологии, также биохимических, молекулярно-биологических и математических методов исследования.

Настоящее исследование было спланировано и выполнено в несколько этапов. На первом этапе была сформулирована научная гипотеза исследования, определены методы работы, а также необходимые материалы для ее успешного выполнения. Также в рамках первого этапа для формулирования гипотезы было выполнено реферирование широкого спектра зарубежных и отечественных периодических источников.

Второй этап был посвящен обоснованию эффективности контроля EGFR-ассоциированного драйверного пути в росте культуры опухолевых клеток желудка. Для этих целей была выбрана культура немутантного штамма опухоли. На этом же этапе произошел направленный цитологически-подтвержденный

отбор фармакологического агента – потенциального молекулярно-направленного таргетного анти-EGFR лекарственного средства.

Третий этап включал воспроизведение, патоморфологическую, иммунофенотипическую и молекулярно-генетическую валидацию трехмерной опухолеподобной органоидной модели EGFR-экспрессирующего рака молочной железы с последующим исследованием на этой модели противоопухолевых свойств нового молекулярно-направленного вещества – 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН 2-гидроксипропандиоата (соединение ЛХТ-17-19).

Четвертый этап состоял из определения клинко-патоморфологических особенностей течения ксенографтного гетеротопического опухолевого процесса немелкоклеточной карциномы легкого с наличием экспрессии EGFR сигнального пути и драйверных мутаций в соответствующем гене, а также особенности ответа опухоли на направленное молекулярно-биологическое воздействие таргетным веществом ЛХТ-17-19.

На заключительном – пятом – этапе проводились обработка и анализ полученных данных, формулировались основные положения работы, выводы диссертационного исследования.

Для ориентированной на рецепторы гибкой стыковки использовался программный пакет Autodock 4.2 с открытым исходным кодом. Для приготовления лигандов применялась программа MGL Tools 1.5.6 (The Scripps Research Institute, США). Оптимизация лиганда проводилась с использованием программного обеспечения Avogadro с открытым исходным кодом. Для расчетов в Autodock 4.2. исходные форматы данных о рецепторах и лигандах были преобразованы в специальный формат PDBQT. Использовались кристаллографические структуры активных центров макромолекулы рецептора EGFRK из банка данных белков (PDB ID: 1M17).

Способность исследуемого соединения молекулярно-направленного действия – производного дигидроакридона ЛХТ-17-19, а также препарата сравнения – ингибитора тирозинкиназы второго поколения эрлотиниба эффективно ингибировать активность фермент EGFR оценивалась на различных

EGFR-положительных опухолевых клетках культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующих киназу EGFR дикого типа. Для этого клетки обрабатывались возрастающими дозами соединений (от 0,5 до 10 мкМ) в течение 24 часов, и статус фосфорилирования EGFR оценивался как маркер его киназной активности с помощью молекулярного метода вестерн-блоттинга.

Противоопухолевые свойства молекулярно-направленного средства ЛХТ-17-19 в сравнении с коммерческим таргетным ингибитором тирозинкиназы эрлотинибом оценивались на органоидной модели рака молочной железы, экспрессирующего дикий тип EGFR. Для формирования органоидов использовалась свежая опухолевая ткань 68-летней пациентки с билатеральным раком молочной железы, ранее не подвергавшимся химиотерапии, подтвержденная морфологически и иммуногистохимически (ИГХ). Образец ткани объемом ~120 мм<sup>2</sup> был получен во время хирургической операции, проведенной в ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ» и разделен на три равные части. Одна часть образца фиксировалась и затем использовалась для патоморфологического исследования, второй фрагмент замораживался (до температуры -90°C) и подвергался молекулярному анализу.

Для проведения морфологической валидации срезы опухолевой ткани окрашивались гематоксилином и эозином, а также проводилось иммуногистохимическое исследование с применением кроличьих моноклональных антител к рецептору эстрогена (ER), рецептору прогестерона (PR) человека, анти-Her2/neu и анти-Ki67 антитела (DAKO, Agilent Technology, США). Для определения ИГХ экспрессии EGFR использовались первичные крысиные антитела к EGFR (клон EGFR.113, разведение 1/200, Novocastra Laboratories Ltd., Ньюкасл, Тайн-энд-Уир, Великобритания).

Лабораторный набор Therascreen® EGFR Pyro Kit использовался для выявления и количественного определения мутаций в экзоне 18 (кодон 719), экзоне 19 (делеция), экзоне 20 (кодоны 768 и 790) и экзоне 21 (кодоны 858 и 861) на основе последовательности гена *EGFR* (кат. № 971480, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) по протоколу производителя с использованием 10 нг геномной ДНК,

выделенной из опухолевой ткани. Использована полимеразную цепную реакцию в реальном времени (qPCR) для обнаружения мутаций гена *EGFR*.

В работе изучено соединение 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиоват (лабораторный номер ЛХТ-17-19), полученное в отделе химии, технологии и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна Московской области) и любезно предоставленное нам руководителем авторского коллектива – профессором С.Я. Скачиловой. В качестве препарата сравнения использовался ингибитор тирозинкиназы второго поколения эрлотиниб в виде субстанции (чистота > 98%, Merck SIGMA-Aldrich, Германия). Исследуемое соединение и препарат сравнения вводились животным внутривенно в вену хвоста в объеме растворителя 2 мл изотонического 0,9% раствора хлорида натрия.

Эффективное понимание направления научного поиска в контексте данной работы диктовало необходимость определения молекулярной структуры мишени – киназного домена внутриклеточной рецепторной тирозинкиназы *EGFR*. 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН показал высокое сродство к киназному домену *EGFR* (идентификатор PDB: 1M17) с показателем  $dG$  -7,9 ккал/моль,  $E_{Dос}$  -5,45 ккал/моль и  $K_i$  101,24 мкМ. Этот комплекс образовался за счет  $\pi$ - $\sigma$ -связей между ароматическими ядрами фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Leu820, Leu694 и Val702. Кроме того, алкильный и  $\pi$ -алкильный комплекс стабилизирован взаимодействиями метильных групп в положении 3 и фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Lys721, Met742, Ala719, Leu820, и Val702. Следует отметить, что пристыковка 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН к активному центру тирозинкиназы сопровождалась возникновением внутримолекулярной водородной связи между кислород карбонильного атома и протон водорода аминогруппы с межатомным расстоянием 2,21 Å.

Установлено, что инкубация культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующих киназу *EGFR* дикого типа с возрастающими

концентрациями ЛХТ-17-19, сопровождается формированием дозозависимой цитотоксичности. При изучении влияния экспериментального воздействия на активность внутриклеточного драйвера онкогенеза методом вестерн-блоттинга было установлено, что во всех трех культурах клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка обнаруживали снижение уровня фосфорилированной формы рецепторной тирозинкиназы, однако уровень подавления активности фермента варьировал между культурами. Так, в культуре Hs746T соединение ЛХТ-17-19 в зависимости от концентрации снижает концентрацию фосфорилированной формы тирозинкиназы (pEGFR) при экспозиции вещества уже в концентрации 0,0001 мкМ. В культуре AGS наблюдается подобная динамика с той лишь разницей, что уровень экспрессии активной формы pEGFR остается выше, чем в экспериментах с Hs746T клетками.

Результаты, полученные в культуре MKN1, являются молекулярным подтверждением феномена цитотоксичности на фоне инкубации клеток в присутствии 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-бутандиовата: хотя жизнеспособность клеток при воздействии высоких (10-100 мкМ) концентраций вещества подавлялась, соединение в меньших концентрациях не снижало метаболической активности клеток.

На следующем этапе диссертационного исследования противоопухолевые свойства молекулярно-направленного средства ЛХТ-17-19 в сравнении с коммерческим таргетным ингибитором тирозинкиназы эрлотинибом оценивали на органоидной модели рака молочной железы, экспрессирующего дикий тип EGFR.

Патоморфологический и иммуногистохимический анализ интраоперационного материала показал, что представленные клетки рака молочной железы характеризовались как ER-положительные, PR-отрицательные, Her2/neu-отрицательные, EGFR-положительные с индексом экспрессии Ki-67 40%. Экспрессия прогестероновых рецепторов, Her2/neu и EGFR исходной ткани рака молочной железы сохранялась в органоидах. Индекс экспрессии Ki-67 клеток органоидов также был близок к первичной ткани (35%).

Вместе с тем, установлено, что статус экспрессии рецептора эстрогена не сохранялся в сформированных органоидах. Однако это явление ранее наблюдалось группой исследователей под руководством Hans Clevers, одними из пионеров исследования органоидов, полученных от пациентов [158]. Ими также показано, что также ER-отрицательные опухоли могут генерировать ER-положительные органоиды [159].

Стоит особо отметить, что статус мембранной экспрессии эстрогеновых рецепторов не является конститутивным фенотипическим признаком опухолевых клеток. Многочисленные исследования показали гибкость эстрогеновых рецепторов на протяжении всей эволюции опухолевой прогрессии [160]. Более того, рецептор эстрогена- $\beta$  может быть активирован несколькими молекулами небольшой молекулярной массы, включая 3,30-дииндолилметан [161].

Полученные результаты патоморфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования позволили считать органоидную модель рака молочной железы валидированной как ER-отрицательную, PR-отрицательную, Her2/neu-отрицательную, EGFR-положительную с индексом экспрессии Ki-67 35%, что соответствует молекулярному профилю тройного негативного EGFR-экспрессирующего рака молочной железы.

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

Таким образом, на двухмерных и трехмерных культурах опухолевых клеток была показана возможность контроля онкогенной экспрессии EGFR соединением акридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (ЛХТ-17-19). Так, в частности было установлено, что инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка сопровождается развитием цитотоксического действия соединения при увеличении его концентрации. При этом, молекулярной основой формирования фармакологической активности служит снижение внутриклеточной концентрации активной – фосфорилированной – формы рецепторной тирозинкиназы в клетках.



Наименее чувствительной к действию соединения была культура MKN1. 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 транслокация клеток сопровождалась потерей экспрессии эстрогеновых рецепторов и смены молекулярного паттерна органоидной опухоли в сторону более агрессивного тройного негативного варианта. При этом фармакологический эффект соединения ЛХТ-17-19 не только тормозил пролиферацию клеток органоидов, но вызывал их гибель, что приводило к значительному сокращению размеров органоидных телец.

Рак легкого занимает второе место по распространённости в структуре онкологической заболеваемости и уровню смертности как у мужчин, так и у женщин [162]. На мелкоклеточный рак легкого приходится 10-15% случаев рака легкого и до 85% - на немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), основными подтипами которого являются аденокарцинома, плоскоклеточный рак и крупноклеточная карцинома [163]. С молекулярной точки зрения интерес представляет идентификация молекулярных драйверов НМРЛ, активируемых соматическими мутациями в генах TP53, KRAS, KEAP1, STK11 и EGFR [144]. Поэтому на следующем этапе в рамках выполнения работы проведена молекулярная и патоморфологическая валидация ксенографтной модели опухоли легкого. В результате проведения патоморфологической и молекулярной валидации модели было сделано заключение, что опухоль третьей генерации, развивающаяся в организме атимичных гуманизированных мышей, сохраняет морфологические, иммуногистохимические и молекулярные черты исходной опухоли легкого пациента. Описанный экспериментальный подход может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной онкологии.

Однако, учитывая, что в настоящее время не существует единой валидированной шкалы для оценки уровня экспрессии антител к EGFR, результаты были подтверждены методом ПЦР в режиме реального времени. Было установлено, что как и исходная опухолевая ткань, так и клетки ксенографта НМРЛ несут активирующую мутацию – делецию в экзоне 19 гена *EGFR* (Del19). В то же время, вставки в экзоне 20 гена *EGFR*, а также патогенные aberrации S768I, T790M, L858R, L861Q и aberrации в кодоне 719 не были обнаружены методом ПЦР в реальном времени.

После проведения экспериментальной терапии 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (ЛХТ-17-19) в суточной дозе 2 мг/кг внутривенно струйно в течение 7 суток в резидуальной опухоли отмечалось уменьшение количества опухолевых структур до 30% от осмотренных участков с дистрофическими изменениями клеток, очагами фиброза. Все это соответствовало II степени лекарственного патоморфоза по Миллеру. Окрашенная специфическими антителами опухоль показала отсутствие анти-EGFR окрашивания мембраны. Патологических вставок в экзоне 19 гена *EGFR* не обнаруживали. Подобные же изменения были зарегистрированы в группе препарата сравнения эрлотиниба.

Таким образом, в результате всестороннего изучения нового соединения дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (соединение ЛХТ-17-19), которое вводили гуманизированным животным со сформированным ксенографтом опухоли в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 2 суток, 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.

#### 4.1 Итоги выполнения диссертационного исследования

Настоящая диссертация явилась результатом комплексного мультидисциплинарного исследования по поиску и обоснованию эффективного пути контроля EGFR-ассоциированного канцерогенеза. На двухмерных и трехмерной культурах опухолевых клеток была показана возможность контроля онкогенной экспрессии EGFR соединением дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (ЛХТ-17-19). Так, в частности, было установлено, что инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка сопровождается развитием цитотоксического действия соединения при увеличении его концентрации. 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.

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 транслокация клеток сопровождалась потерей экспрессии эстрогеновых рецепторов и смены молекулярного паттерна органоидной опухоли в сторону более агрессивного тройного негативного варианта. Инкубация органоидов 0,5-60,0 мкМ ЛХТ-17-19 сопровождалась не только ингибированием их роста и пролиферации, но и существенной циторедукцией.

Исследование особенностей развития ксенографтной опухоли человека в организме гуманизированных иммунодефицитных мышей была использована в качестве трансляционной биологической платформы. В результате проведения патоморфологической и молекулярной валидации модели было сделано заключение, что опухоль третьей генерации, развивающаяся в организме

атимичных гуманизированных мышей, сохраняет морфологические, иммуногистохимические и молекулярные черты исходной опухоли легкого пациента. Описанный экспериментальный подход может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной патологии.

В результате всестороннего изучения нового соединения дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (соединение ЛХТ-17-19), которое вводили гуманизированным животным со сформированным ксенографтом опухоли в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 2 суток, 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*.

#### **4.2 Перспективы дальнейшего развития темы настоящего диссертационного исследования**

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-гидроксипутандивата требует объяснения. Также требует детальной и тщательной проработки в рамках самостоятельного исследования особенности ответа на экспериментальное молекулярно-направленное воздействие опухолей молочной железы и легкого различной морфологической структуры, а также несущих различные мутации в гене *EGFR*.

С практической точки зрения важным является выполнение комплекса фармакокинетических исследований, изучения безопасности новой молекулы (ЛХТ-17-19).

## ВЫВОДЫ

1. 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН показал высокое сродство к киназному домену EGFR. Комплекс связывания образовывается за счет  $\pi$ - $\sigma$ -связей между ароматическими ядрами фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Leu820, Leu694 и Val702, алкильный и  $\pi$ -алкильный комплекс стабилизируется взаимодействиями метильных групп в положении 3 и фрагмента 1,2,3,4-тетрагидроакридин-1-ОН с аминокислотными остатками Lys721, Met742, Ala719, Leu820, и Val702, а молекулярная стыковка становится возможной вследствие формирования внутримолекулярных водородных связей.

2. Инкубация клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка сопровождается развитием цитотоксического действия соединения при увеличении его концентрации. 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.

3. 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 транслокация клеток сопровождалась потерей экспрессии эстрогеновых рецепторов и смены молекулярного паттерна органоидной опухоли в сторону более агрессивного тройного негативного варианта.

4. На двухмерных и трехмерной культурах опухолевых клеток была показана возможность контроля онкогенной экспрессии EGFR соединением дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (ЛХТ-17-19). Инкубация органоидов 0,5-60,0 мкМ ЛХТ-

17-19 сопровождалась не только ингибированием их роста и пролиферации, но и существенной циторедукцией.

5. Исследование особенностей развития ксенографтной опухоли человека в организме гуманизированных иммунодефицитных мышей показало, 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).

6. В результате всестороннего изучения соединения дигидроакридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандивата (соединение ЛХТ-17-19), которое вводили гуманизированным животным со сформированным ксенографтом опухоли в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 2 суток, было показано, 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*.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Описанный экспериментальный подход может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной патологии.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественное новообразование

ИГХ – иммуногистохимия

НАДН - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

3-NBA - 3-Nitrobenzanthrone

ADAM - a disintegrin and metalloproteinases

AP-1 (AP-2) - Activator Protein-1 (Activator Protein-2)

APC - adenoma polyposis coli

AREG - amphiregulin

BRAF - B-raf proto-oncogene

BTC - betacellulin

COX2 - cyclooxygenases-2

CpG - cytosine-phosphate-guanine

CXCL1/KC - chemokine (C-X-C motif) ligand 1 / keratinocyte-derived chemokine

EGFR (ErbB-1) - epidermal growth factor receptor

ER - estrogen receptor

EREG - epieregulin

ERK - extracellular signal-regulated kinase

FOLFOX4 - oxaliplatin plus leucovorin and 5-fluorouracil

FOXM1 - forkhead box protein M1

GLUT3 - glucose transporter 3

GPCR - G-protein-coupled receptors

HB-EGF - heparin-binding epidermal growth factor

Her2/neu - human epidermal growth factor receptor 2  
HER3 - human epidermal growth factor receptor 3  
HK2 - hexokinase 2  
hTERT - human telomerase reverse transcriptase  
IGF-1R - insulin-like growth factor type 1 receptor  
IL – interleukin  
JAK2/STAT3 - Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3  
KAP1 - KRAB-associated protein 1  
KEAP1 - Kelch-like ECH-associated protein 1  
KRAS - Kirsten RA<sub>t</sub> Sarcoma  
LGR5 - leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5  
MEK (MAP2K) – mitogen-activated protein kinase kinase  
MET - MNNG HOS transforming gene  
MMP-1 - matrix metalloproteinase-1  
MUC1 - Mucin-1  
NF- $\kappa$ B - nuclear factor- $\kappa$ B  
NRAS - neuroblastoma rat sarcoma  
NRG – neuregulin  
PDK1 - pyruvate dehydrogenase kinase 1  
PDO – patient-derived organoid  
PDX – patient-derived xenograft  
PI3K/Akt - phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B  
PLC - phospholipase c  
PR - progesteron receptor  
PTEN - phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10  
qPCR - quantitative polymerase chain reaction  
Raf – rapidly accelerated fibrosarcoma  
Ras – retrovirus associated DNA sequences  
RTK - receptor tyrosine kinases  
Sp1 - specificity protein 1

STAT - signal transducer and activator of transcription

STK11 - Serine/threonine kinase 11

TGF- $\alpha$  - transforming growth factor alpha

TKI - tyrosine kinase inhibitor

TP53 - tumor protein p53

TYMS - thymidylate synthetase

VEGFR - vascular endothelial growth factor receptors

Yap - yes-associated protein

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Roskoski, R.J. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer / R.J. Roskoski // *Pharm. Res.* – 2014. – Vol. 79. – P. 34-74.
2. Sigismund, S. Emerging functions of the EGFR in Cancer / S. Sigismund, D. Avanzato, L. Lanzetti // *Mol. Oncol.* – 2018. – Vol. 12. – P. 3-20.
3. Lin, Y. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients, mechanisms and strategies / Y. Lin, X. Wang, H. Jin // *Am. J. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 4. – P. 411-435.
4. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity / Z. Weihua, R. Tsan, W.C. Huang et al. // *Cancer Cell.* – 2008. – Vol. 13. – P. 38-393.
5. Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy / J. Mendelsohn // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2001. – Vol. 8. – P. 3-9.
6. Sierra, J.R. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy / J.R. Sierra, V. Cepero, S. Giordano // *Mol. Cancer.* – 2010. – Vol. 9. – P. 1-13.
7. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer / X. Nan, C. Xie, X. Yu, J. Liu // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – P. 75712-75726.
8. Arteaga, C.L. ERBB receptors, from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics / C.L. Arteaga, J.A. Engelman // *Cancer Cell.* – 2014. – Vol. 25. – P. 282-303.
9. Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib / M.E. Irwin, K.L. Mueller, L. Bohin et al. // *J. Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 226. – P. 2316-2328.
10. EGFR kinase-dependent and kinase-independent roles in clear cell renal cell carcinoma / P. Cossu-Rocca, M.R. Muroi, F. Sanges et al. // *Am. J. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 6. – P. 71-83.

11. Riely, G.J. EGFR: The paradigm of an oncogene-driven lung cancer / G.J. Riely, H.A. Yu // Clin. Cancer Res. – 2015. – Vol. 21. – P. 2221-2226.
12. Molecular mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs in EGFR T790M-mutant lung cancer / C. Ricordel, L. Friboulet, F. Facchinetti, J.C. Soria // Ann. Oncol. – 2018. – Vol. 29. – P. 28-37.
13. Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer, mechanisms and therapeutic strategies / S.M. Lim, N.L. Syn, B.C. Cho, R.A. Soo // Cancer Treat. Rev. – 2018. – Vol. 65. – P. 1-10.
14. Targeted reduction of the EGFR protein, but not inhibition of its kinase activity, induces mitophagy and death of cancer cells through activation of mTORC2 and Akt / R.R. Katreddy, L.R. Bollu, F. Su et al. // Oncogenesis. – 2018. – Vol. 7. – P. 1-13.
15. Autophosphorylation of the carboxy-terminal domain is not required for oncogenic transformation by lung cancer derived mutants / J. Cho, S. Kim, J. Du, M. Meyerson // Int. J. Cancer. – 2018. – Vol. 143. – P. 679-685.
16. Дудина, М.О. Антибластомная активность и безопасность 4-алкил-замещенного производного аминохромена / М.О. Дудина // Москва. – 2019. – С. 132.
17. Сулова, И.Р. Изучение механизмов противоопухолевого действия производного 4-аминохромена (*in vivo* и *in vitro* исследование) / И.Р. Сулова // Москва. – 2021. – С. 128.
18. Самышина, Е.А. Биологические *in vivo* и *in vitro* опухолевые платформы для доклинических и персонализированных исследований в онкофармакологии / Е.А. Самышина // Москва. – 2022.
19. Кудрявцев, М.Ю. Противоопухолевая активность некоторых производных пиридинкарбоновых кислот (*in vitro* и *in vivo* исследование) / М.Ю. Кудрявцев // Москва. – 2023. – С. 148.
20. Дерябина, О.Н. Пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в коренной популяции жителей Республики

Мордовия (экспериментально-морфологическое и молекулярно-генетическое исследование) / О.Н. Дерябина // Саранск. – 2023. – С. 283.

21. Jin, W. ErBb Family Proteins in Cholangiocarcinoma and Clinical Implications / W. Jin // J. Clin. Med. – 2020. – Vol. 9. – P. 2255.

22. The Role of EREG/EGFR Pathway in Tumor Progression / W.-L. Cheng, P.-H Feng, K.-Y Lee [et al.] // International journal of molecular sciences. - 2021. - Vol. 22, №23. - P. 12828. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12828>. – Дата публикации: 27.11.2021.

23. Yarden, Y. The ERBB network: At last, cancer therapy meets systems biology / Y. Yarden, G. Pines // Nat. Rev. Cancer. – 2012. – Vol. 12. – P. 553-563.

24. Ledonne, A. On the Modulatory Roles of Neuregulins/ErbB Signaling on Synaptic Plasticity / A. Ledonne, N.B. Mercuri // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 21. – P. 275.

25. Stromal NRG1 in luminal breast cancer defines pro-fibrotic and migratory cancer-associated fibroblasts / M. Berdiel-Acer, A. Maia, Z. Hristova, et al. // Oncogene. – 2021. – Vol. 40. – P. 2651-2666.

26. Zhao, W.J. Integrative Analysis of Neuregulin Family Members-Related Tumor Microenvironment for Predicting the Prognosis in Gliomas / W.J. Zhao, G.Y. Ou, W.W. Lin // Front. Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 682415.

27. Tumor Microenvironment-Derived NRG1 Promotes Antiandrogen Resistance in Prostate Cancer / Z. Zhang, W.R. Karthaus, Y.S. Lee et al. // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 38. – P. 279-296.

28. Falls, D.L. Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies / D.L. Falls // Exp. Cell Res. – 2003. – Vol. 284. – P. 14-30.

29. Ou, G.Y. Neuregulins in Neurodegenerative Diseases / G.Y. Ou, W.W. Lin, W.J. Zhao // Front. Aging Neurosci. – 2021. – Vol. 13. – P. 662474.

30. Harris, R.C. EGF receptor ligands / R.C. Harris, E. Chung, R.J. Coffey // Exp. Cell Res. – 2003. – Vol. 284. – P. 2-13.

31. EREG-driven oncogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma exhibits higher sensitivity to Erlotinib therapy / S. Liu, Y. Wang, Y. Han et al. // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10. – P. 10589-10605.
32. Schneider, M.R. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance / M.R. Schneider, E. Wolf // *J. Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 218. – P. 460-466.
33. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF / N. Prenzel, E. Zwick, H. Daub et al. // *Nature*. – 1999. – Vol. 402. – P. 884-888.
34. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: The juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency / C.L. Hinkle, S.W. Sunnarborg, D. Loiselle et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 24179-24188.
35. Brown, C.L. The proamphiregulin cytoplasmic domain is required for basolateral sorting, but is not essential for constitutive or stimulus-induced processing in polarized Madin-Darby canine kidney cells / C.L. Brown, R.J. Coffey, P.J. Dempsey // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 29538-29549.
36. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: Beyond receptor ligands / S. Higashiyama, H. Iwabuki, C. Morimoto et al. // *Cancer Sci.* – 2008. – Vol. 99. – P. 214-220.
37. Arteaga, C.L. ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics / C.L. Arteaga, J.A. Engelman // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25. – P. 282-303.
38. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes / H. Toyoda, T. Komurasaki, D. Uchida et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 7495-7500.
39. Ornskov, D. Insulin induces a transcriptional activation of epiregulin, HB-EGF and amphiregulin, by a PI3K-dependent mechanism: Identification of a specific insulin-responsive promoter element / D. Ornskov, E. Nexø, B.S. Sørensen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 354. – P. 885-891.

40. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program / X. Li, P.E. Massa, A. Hanidu et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 45129-45140.
41. AP-2alpha and AP-2gamma regulate tumor progression via specific genetic programs / F. Orso, E. Penna, D. Cimino et al. // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – P. 2702-2714.
42. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands / U. Sahin, G. Weskamp, K. Kelly et al. // *J. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 164. – P. 769-779.
43. Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4 / T. Komurasaki, H. Toyoda, D. Uchida, S. Morimoto // *Oncogene.* – 1997. – Vol. 15. – P. 2841-2848.
44. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin / D.S. Taylor, X. Cheng, J.E. Pawlowski et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 1633-1638.
45. Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage / S. Shirasawa, S. Sugiyama, I. Baba et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 13921-13926.
46. Role of epiregulin in peptidoglycan-induced proinflammatory cytokine production by antigen presenting cells / S. Sugiyama, K. Nakabayashi, I. Baba et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 337. – P. 271-274.
47. Characterization of the acute temporal changes in excisional murine cutaneous wound inflammation by screening of the wound-edge transcriptome / S. Roy, S. Khanna, C. Rink et al. // *Physiol. Genom.* – 2008. – Vol. 34. – P. 162-184.
48. Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development / H. Toyoda, T. Komurasaki, Y. Ikeda et al. // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 377. – P. 403-407.



49. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family / H. Toyoda, T. Komurasaki, D. Uchida, S. Morimoto et al. // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 326 – P. 69-75.
50. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer / D. Aguilar-Cazares, R. Chavez-Dominguez, A. Carlos-Reyes et al. // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1399.
51. Oncogenic KRAS-induced epiregulin overexpression contributes to aggressive phenotype and is a promising therapeutic target in non-small- cell lung cancer / N. Sunaga, K. Kaira, H. Imai et al. // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32. – P. 4034-4042.
52. Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: Activation of the epiregulin gene / C. Lindvall, M. Hou, T. Komurasaki et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1743-1747.
53. Differentiation of human airway epithelia is dependent on erbB2 / P.D. Vermeer, L. Panko, P. Karp et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. L17-L180.
54. Bronchial epithelial compression regulates epidermal growth factor receptor family ligand expression in an autocrine manner / E.K. Chu, J.S. Foley, J.L. Cheng // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 32. – P. 373-380.
55. HER family receptor and ligand status in thymic carcinoma / A. Weissferdt, H. Lin, D. Woods et al. // *Lung Cancer.* – 2012. – Vol. 77. – P. 515-521.
56. Epiregulin as a marker for the initial steps of ovarian cancer development / A. Amsterdam, E. Shezen, C. Raanan et al. // *Int. J. Oncol.* – 2011. – Vol. 39. – P. 1165-1172.
57. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway / Y. Wang, Y. Jing, L. Ding et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2019. – Vol. 38. – P. 274.

58. Epiregulin contributes to breast tumorigenesis through regulating matrix metalloproteinase 1 and promoting cell survival / M. Farooqui, L.R. Bohrer, N.J. Brady et al. // *Mol. Cancer.* – 2015. – Vol. 14. – P. 138.
59. LINC00885 a Novel Oncogenic Long Non-Coding RNA Associated with Early Stage Breast Cancer Progression / M.C. Abba, R. Canzoneri, A. Gurruchaga et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 7407.
60. The Relationship Between Air Pollution and Lung Cancer in Nonsmokers in Taiwan / C.H. Tseng, B.J. Tsuang, C.J. Chiang et al. // *J. Thorac. Oncol.* – 2019. – Vol. 14. – P. 784-792.
61. The aryl hydrocarbon receptor directly regulates expression of the potent mitogen epiregulin / R.D. Patel, D.J. Kim, J.M. Peters, G.H. Perdew // *Toxicol. Sci.* – 2006. – Vol. 89. – P. 75-82.
62. Epiregulin is required for lung tumor promotion in a murine two-stage carcinogenesis model / A.K. Bauer, K. Velmurugan, K.N. Xiong et al. // *Mol. Carcinog.* – 2017. – Vol. 56. – P. 94-105.
63. Nicotinic-nAChR signaling mediates drug resistance in lung cancer / W.L. Cheng, K.Y. Chen, K.Y. Lee et al. // *J. Cancer.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1125-1140.
64. 3- Nitrobenzanthrone promotes malignant transformation in human lung epithelial cells through the epiregulin-signaling pathway / K.J. Chen, C.H. Tseng, P.H. Feng et al. // *Cell Biol. Toxicol.* – 2021.
65. Transformation of polarized epithelial cells by apical mistrafficking of epiregulin / B. Singh, G. Bogatcheva, M.K. Washington, R.J. Coffey // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 8960-8965.
66. Epiregulin is not essential for development of intestinal tumors but is required for protection from intestinal damage / D. Lee, R.S. Pearsall, S. Das et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 8907-8916.
67. Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK / C. Neufert, C. Becker, O. Tureci et al. // *J. Clin. Investig.* – 2013. – Vol. 123. – P. 1428-1443.

68. Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer / A. Gregorieff, Y. Liu, M.R. Inanlou et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 526. – P. 715-718.
69. The Hippo pathway effector YAP is an essential regulator of ductal progenitor patterning in the mouse submandibular gland / A.D. Szymaniak, R. Mi, S.E. McCarthy et al. // *Elife*. – 2017. – Vol. 6. – P. e23499.
70. Riese, D.J. Epiregulin: Roles in normal physiology and cancer / D.J. Riese, R.L. Cullum // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2014. – Vol. 28. – P. 49-56.
71. A subclass of HER1 ligands are prognostic markers for survival in bladder cancer patients / V.B. Thogersen, B.S. Sorensen, S.S. Poulsen et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 6227-6233.
72. Profiling the evolution of human metastatic bladder cancer / B.E. Nicholson, H.F. Frierson, M.R. Conaway et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 7813-7821.
73. Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the mouse urinary bladder induces the expression of immune- and cell proliferation-related genes / X. Wang, J.K. Colby, R.C. Rengel et al. // *Mol. Carcinog.* – 2009. – Vol. 48. – P. 1-13.
74. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor / G. Auf, A. Jabouille, M. Delugin et al. // *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – P. 597.
75. Epiregulin enhances tumorigenicity by activating the ERK/MAPK pathway in glioblastoma / S. Kohsaka, K. Hinohara, L. Wang et al. *Neuro-Oncology*. – 2014. – Vol. 16. – P. 960-970.
76. Identification of Glioma Cancer Stem Cell Characteristics Based on Weighted Gene Prognosis Module Co-Expression Network Analysis of Transcriptome Data Stemness Indices / P. Xia, Q. Li, G. Wu, Y. Huang // *J. Mol. Neurosci.* – 2020. – Vol. 70. – P. 1512-1520.
77. Rab27b contributes to radioresistance and exerts a paracrine effect via epiregulin in glioblastoma / S. Nishioka, P.H. Wu, T. Yakabe et al. *Neurooncol. Adv.* – 2020. – Vol. 2.

78. ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis / F. Revillion, V. Lhotellier, L. Hornez et al. // *Ann. Oncol.* – 2008. – Vol. 19. – P. 73-80.
79. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung / A.J. Minn, G.P. Gupta, P.M. Siegel et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 436. – P. 518-524.
80. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis / G.P. Gupta, D.X. Nguyen, A.C. Chiang et al. // *Nature.* – 2007. – Vol. 446. – P. 765-770.
81. KAP1 promotes proliferation and metastatic progression of breast cancer cells / J.B. Addison, C. Koontz, J.H. Fugett et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. – P. 344-355.
82. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters / K.J. Cheung, V. Padmanaban, V. Silvestri et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – Vol. 113. – P. E854-E863.
83. The miR-186-3p/EGFR axis orchestrates tamoxifen resistance and aerobic glycolysis in breast cancer cells / M. He, Q. Jin, C. Chen et al. // *Oncogene.* – 2019. – Vol. 38. – P. 5551-5565.
84. Nagy, A. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes / A. Nagy, G. Munkacsy, B. Gyorffy // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – P. 6047.
85. Amphiregulin and epiregulin expression in colorectal carcinoma and the correlation with clinicopathological characteristics / X.D. Li, S.Y. Miao, G.L. Wang et al. // *Onkologie.* – 2010. – Vol. 33. – P. 353-358.
86. Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes / T. Watanabe, T. Kobunai, Y. Yamamoto et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 46. – P. 2119-2126.
87. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features / E. Missiaglia, B. Jacobs, G. D'Ario et al. // *Ann. Oncol.* – 2014. – Vol. 25. – P. 1995-2001.
88. Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or

irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial) / A. Stahler, V. Heinemann, C. Giessen-Jung et al. // *Int. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 138. – P. 739-746.

89. Amphiregulin (AREG) and Epiregulin (EREG) Gene Expression as Predictor for Overall Survival (OS) in Oxaliplatin/Fluoropyrimidine Plus Bevacizumab Treated mCRC Patients-Analysis of the Phase III AIO KRK-0207 / S. Stintzing, B. Ivanova, I. Ricard et al. // *Trial. Front. Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 474.

90. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis reverses acquired resistance to 5-FU through miR-215-5p-EREG/TYMS axis in colon cancer cells / S. Chen, T. Yue, Z. Huang et al. // *Cancer Lett.* – 2019. – Vol. 466. – P. 49-60.

91. High EREG Expression Is Predictive of Better Outcomes in Rectal Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Concurrent Chemoradiotherapy / C.Y. Lin, P.L. Hsieh, C.L. Chou et al. // *Oncology.* – 2020. – Vol. 98. – P. 549-557.

92. Epithelium-derived Indian Hedgehog restricts stromal expression of ErbB family members that drive colonic tumor cell proliferation / F. Westendorp, O.N. Karpus, P.J. Koelink et al. // *Oncogene.* – 2021. – Vol. 40. – P.1628-1643.

93. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas / H. Shigeishi, K. Higashikawa, M. Hiraoka et al. // *Oncol. Rep.* – 2008. – Vol. 19. – P. 1557-1564.

94. Prognostic role of epiregulin/amphiregulin expression in recurrent/metastatic head and neck cancer treated with cetuximab / Y. Kogashiwa, H. Inoue, K. Kuba et al. // *Head Neck.* – 2018. – Vol. 40. – P. 2424-2431.

95. Epiregulin promotes migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83 through activation of ERK and Akt / Y. Kogashiwa, H. Inoue, E. Kuba et al. // *Oral Oncol.* – 2009. – Vol. 45. – P. 156-163.

96. Autocrine epiregulin activates EGFR pathway for lung metastasis via EMT in salivary adenoid cystic carcinoma / S. Liu, D. Ye, D. Xu et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7. – P. 25251-25263.

97. Dual knockdown of N-ras and epiregulin synergistically suppressed the growth of human hepatoma cells / M. Zhao, H.W. He, H.X. Sun et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 387. – P. 239-244.

98. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 / D.H. Dapito, A. Mencin, G.Y. Gwak et al. // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 21. – P. 504-516.
99. Sunaga, N. Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer / N. Sunaga, K. Kaira // *Lung Cancer*. – 2015. – Vol. 6. – P. 91-98.
100. Intratumoral epiregulin is a marker of advanced disease in non-small cell lung cancer patients and confers invasive properties on EGFR-mutant cells / J. Zhang, K. Iwanaga, K.C. Choi et al. // *Cancer Prev. Res.* – 2008. – Vol. 1. – P. 201-207.
101. Muc1 knockout potentiates murine lung carcinogenesis involving an epiregulin-mediated EGFR activation feedback loop / X. Xu, W. Chen, S. Leng et al. // *Carcinogenesis*. – 2017. – Vol. 38. – P. 604-614.
102. Epiregulin confers EGFR-TKI resistance via EGFR/ErbB2 heterodimer in non-small cell lung cancer / S. Ma, L. Zhang, Y. Ren et al. // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40. – P. 2596-2609.
103. Epiregulin is Up-regulated in pancreatic cancer and stimulates pancreatic cancer cell growth / Z. Zhu, J. Kleeff, H. Friess et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 273. – P. 1019-1024.
104. Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines / N. Topping, P.E. Jorgensen, B.S. Sorensen, E. Nexø // *Anticancer Res.* – 2000. – Vol. 20. – P. 91-95.
105. Gene silencing of EREG mediated by DNA methylation and histone modification in human gastric cancers / J. Yun, S.H. Song, J. Park et al. // *Lab. Investig.* – 2012. – Vol. 92. – P. 1033-1044.
106. Elevated epiregulin expression predicts poor prognosis in gastric cancer / Q. Xia, Y. Zhou, H. Yong et al. // *Pathol. Res. Pract.* – 2019. – Vol. 215. – P. 873-879.
107. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer / S.V. Sharma, D.W. Bell, J. Settleman, D.A. Haber // *Nat. Rev. Cancer*. – 2007. – Vol. 7. – P. 169-181.

108. Sharma, S.V. ErbBs in lung cancer / S.W. Sharma, J. Settleman // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315. – P. 557-571.
109. ErbB Family Signalling: A Paradigm for Oncogene Addiction and Personalized Oncology / N. Jacobi, R. Seeboeck, E. Hofmann, A. Eger // *Cancers.* – 2017. – Vol. 9. – P. 33.
110. Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: Mechanisms and potential regimens of drug resistance / Q.H. Li, Y.Z. Wang, J. Tu et al. // *Gastroenterol. Rep.* – 2020. – Vol. 8. – P. 179-191.
111. Potentiating Therapeutic Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer / K.S. You, Y.W. Yi, J. Cho et al. // *Pharmaceuticals.* – 2021. – Vol. 14. – P. 589.
112. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies: A meta-analysis / Z.Y. Yang, W.X. Shen, X.F. Hu et al. // *J. Hematol. Oncol.* – 2012. – Vol. 5. – P. 52.
113. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer / B. Zhao, L. Wang, H. Qiu et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – P. 3980-4000.
114. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets / A.K. Witkiewicz, E.A. McMillan, U. Balaji et al. // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 6744.
115. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future / M. Chevallier, M. Borgeaud, A. Addeo, A. Friedlaender // *World J. Clin. Oncol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 217-237.
116. Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer / J.F. Seligmann, F. Elliott, S.D. Richman, et al. // *JAMA Oncol.* – 2016. – Vol. 2. – P. 633-642.
117. Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer / J.B. Baker, D. Dutta, D. Watson et al. // *Br. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 104. – P. 488-495.

118. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab / S. Khambata-Ford, C.R. Garrett, N.J. Meropol et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 3230-3237.

119. Does anti-EGFR therapy improve outcome in advanced colorectal cancer / C.L. Vale, J.F. Tierney, D. Fisher et al. // *A systematic review and meta-analysis. Cancer Treat. Rev.* – 2012. – Vol. 38. – P. 618-625.

120. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer / J.Y. Douillard, K.S. Oliner, S. Siena et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369. – P. 1023-1034.

121. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): A prospectively stratified randomised trial / M.T. Seymour, S.R. Brown, G. Middleton et al. // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 749-759.

122. Epigenetic regulation of Amphiregulin and Epiregulin in colorectal cancer / F. Bormann, S. Stinzinger, S. Tierling et al. // *Int. J. Cancer.* – 2019. – Vol. 144. – P. 56-581.

123. Prognostic value of amphiregulin and epiregulin mRNA expression in metastatic colorectal cancer patients / C. Jing, Y.H. Jin, Z. You et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7. – P. 55890-55899.

124. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab / B. Jacobs, W. DeRoock, H. Piessevaux et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 5068-5074.

125. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: Interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes / G. Pentheroudakis, V. Kotoula, W. DeRoock et al. // *BMC Cancer.* – 2013. – Vol. 13. – P. 49.

126. Epiregulin gene expression as a biomarker of benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer / D.J. Jonker, C.S. Karapetis, C. Harbison et al. // *Br. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 110. – P. 648-655



127. Association of Tumor HER3 Messenger RNA Expression With Panitumumab Efficacy in Advanced Colorectal Cancer / J.F. Seligmann, A.J. Hatch, S.D. Richman et al. // *JAMA Oncol.* – 2018. – Vol. 4. – P. 564-568.

128. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17 / S.Y. Brule, D.J. Jonker, C.S. Karapetis et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 51. – P. 1405-1414.

129. Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer / M.S. Lee, E.J. McGuffey, J.S. Morris et al. // *Br. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 114. – P. 1352-1361.

130. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer / S. Misale, R. Yaeger, S. Hobor et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 486. – P. 532-536.

131. PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis / C. Mao, Z.Y. Yang, H.F. Hu et al. // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23. – P. 1518-1525.

132. The S492R EGFR ectodomain mutation is never detected in KRAS wild-type colorectal carcinoma before exposure to EGFR monoclonal antibodies / C. Esposito, A.M. Rachiglio, M.L. LaPorta et al. // *Cancer Biol. Ther.* – 2013. – Vol. 14. – P. 1143-1146.

133. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients / F. Perrone, A. Lampis, M. Orsenigo // *Ann. Oncol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 84-90.

134. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma / X.T. Ma, S. Wang, Y.J. Ye, et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 10. – P. 1569-1573.

135. Over expression of the insulin-like growth factorI receptor in human colon carcinomas / M.M. Weber, C. Fottner, S.B. Liu et al. // *Cancer.* – 2002. – Vol. 95. – P. 2086-2095.

136. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer / A. Bardelli, S. Corso, A. Bertotti et al. // *Cancer Discov.* – 2013. – Vol. 3. – P. 658-673.
137. HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: Analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials / S.D. Richman, K. Southward, P. Chambers et al. // *J. Pathol.* – 2016. – Vol. 238. – P. 562-570.
138. Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells / R. Bianco, R. Rosa, V. Damiano et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 5069-5080.
139. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck / J.A. Bonner, P.M. Harari, J. Giralt et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354. – P. 567-578.
140. Artificial Intelligence-Assisted Amphiregulin and Epiregulin IHC Predicts Panitumumab Benefit in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer / C.J.M. Williams, J.W. Seligmann, F. Elliott et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2021. – Vol. 27. – P. 3422-3431.
141. Preferential Response of Basal-Like Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines to EGFR-Targeted Therapy Depending on EREG-Driven Oncogenic Addiction / S. Job, A. Reynies, B. Helle et al. // *Cancers.* – 2019. – Vol. 11. – P. 795.
142. Epiregulin-blocking antibody inhibits epiregulin-dependent EGFR signaling / M. Iijima, M. Anai, T. Kodama, Y. Shibasaki // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 489. – P. 83-88.
143. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution / S. Kobayashi, H. Yamada-Okabe, M. Suzuki et al. // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30. – P. 2631-2644.
144. The clinicopathological significance of Lgr5 expression in lung adenocarcinoma / S. Ryuge, Y. Sato, S.X. Jiang et al. // *Lung Cancer.* – 2013. – Vol. 82. – P. 143-148.

145. Efficacy according to blind independent central review: Post-hoc analyses from the phase III, randomized, multicenter, IPASS study of first-line gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in Asian patients with EGFR mutation-positive advanced NSCLC / Y.L. Wu, N. Saijo, S. Thongprasert et al. // *Lung Cancer*. – 2017. – Vol. 104. – P. 119-125.
146. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers / H.A. Yu, M.E. Arcila, N. Rekhtman et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19. – P. 2240-2247.
147. Emergin grole of tumor cell plasticity in modifying therapeutic response / S. Qin, J. Jiang, Y. Lu et al. // *Signal. Transduct. Target. Ther.* – 2020. – Vol. 5. – P. 228.
148. EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics / D.M. Freed, N.J. Bessman, A. Kiyatkin et al. // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – P. 683-695.
149. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs / M.G. Kris, B.E. Johnson, L.D. Berry et al. // *JAMA*. – 2014. – Vol. 311. – P. 1998-2006.
150. Research, N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma / N. Research // *Nature*. – 2014. – Vol. 511. – P. 543-550.
151. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer / L. Regales, Y. Gong, R. Shen et al. // *J. Clin. Investig.* – 2009. – Vol. 119. – P. 3000-3010.
152. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice / E.V. Blinova, M.O. Dudina, I.R. Suslova et al. // *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. – 2018. – Vol. 9(4). – P. 130-134.
153. 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена подавляет рост и метастазирование ксенографтной аденокарциномы легкого / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова и др. // *Сеченовский Вестник*. – 2019. – Т. 2(2). – С. 15-20.

154. Langford, D.J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse / D.J. Langford, A.L. Bailey, M.L. Chanda et al. // *Nat Methods*. – 2010. – Vol. 7. – P. 447-449.
155. Nefopam and ketoprofen synergy in rodent models of antinociception / P. Girard, D. Verniers, M.C. Coppé et al. // *Eur J Pharmacol*. – 2008. – Vol. 584. – P. 263-271.
156. Carbone, L. Pain in laboratory animals: The ethical and regulatory imperatives / L. Carbone // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – P. e21578.
157. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity / N. Sachs, J. de Ligt, O. Kopper et al. // *Cell*. – 2018. – Vol. 172. – P. 373-386.
158. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity / O. Kopper, C.J. de Witte, K. Lo~hmussaar et al. // *Nat. Med*. – 2019. – Vol. 25. – P. 838-849,
159. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progres- sion / L.S. Lindstro€m, E. Karlsson, U.M. Wilking et al. // *J. Clin. Oncol*. – 2012. – Vol. 30. – P. 2601-2608,
160. Lo, R. A new class of estrogen receptor beta-selective activators / R. Lo, J. Matthews // *Mol. Interv*. – 2010. – Vol. 10. – P. 133-136
161. Breast cancer organoid model allowed to reveal potentially beneficial combination of 3,3'-diindolylmethane and chemotherapy drugs / S. Nikulin, B. Alekseev, N. Sergeeva et al. // *Biochimie*. – 2020. – Vol. 179. – P. 217-227.
162. Siegel R.L. Cancer Statistics, 2019 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin*. – 2019. – Vol. 69(1). – P. 7-34.
163. Host-Microbiome Interaction in Lung Cancer / Q. Dong, E.S. Chen, C. Zhao, C. Jin // *Front. Immunol*. – 2021. – Vol. 202. – P. 679-829.
164. Cancer Genome Atlas Research Network Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas / Campbell, J.D. Alexandrov, A. Kim et al. // *Nat. Genet*. – 2016. – Vol. 48. – P. 607-616.

165. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening / M. Kim, H. Mun, C.O. Sung et al. // Nat. Commun. – 2019. – Vol. 10(1). – P. 39-91.

166. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice / T. Chijiwa, K. Kawai, A. Noguchi et al. // Int. J. Oncol. – 2015. – Vol. 47. – P. 61-70.

167. 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.