

*На правах рукописи*



**Епишкина Анна Алексеевна**

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

3.3.2. Патологическая анатомия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор

**Демура Татьяна Александровна**

доктор медицинских наук, профессор

**Блинова Екатерина Валериевна**

**Официальные оппоненты:**

**Забозлаев Федор Георгиевич** - доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», патологоанатомическое отделение, заведующий отделением

**Сипров Александр Владимирович** - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», кафедра фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, профессор кафедры

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «18» декабря 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

**Блинова Екатерина Валериевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 (Roskoski R.J., 2014; Sigismund S. et al., 2018).

Изменения EGFR (гиперэкспрессия или соматические мутации, активирующие киназу) часто встречаются при злокачественных новообразованиях (ЗНО) (Lin Y. et al., 2014). Гиперэкспрессия EGFR связана с увеличением выживаемости опухолевых клеток, метастазированием, инвазией, резистентностью к химиотерапии и плохим прогнозом (Weihua Z. et al., 2008; Mendelsohn J., 2001). 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) (Roskoski R.J., 2014; Sigismund S. et al., 2018; Mendelsohn J., 2001).

Ингибиторы тирозинкиназы представляют собой небольшие молекулы хиназолинового происхождения, которые ингибируют активность киназы EGFR путем обратимого или необратимого связывания с карманом связывания аденозинтрифосфата (АТФ) в киназном домене (Sierra J.R. et al., 2010). Однако в клинике препараты эффективны только у 10-40% пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) с мутациями EGFR (Nan X. et al., 2017; Arteaga C.L. et al., 2014; Irwin M.E. et al., 2011; Cossu-Rocca P. et al., 2016). Возникновение приобретенной резистентности приводит к прогрессированию заболевания у всех пациентов, получавших ингибиторы тирозинкиназы, со средней выживаемостью без прогрессирования от 9 до 13 месяцев (Riely G.J. et al., 2015). 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 (Ricordel C. et al., 2018). 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) (Lim S.M. et al., 2018).

Исследования последних лет показали, что С-концевой нефосфорилируемый мутантный вариант EGFR является онкогенным (Katreddy R.R. et al., 2018), 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 (Cho J. et al., 2018).

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**

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) является известным драйвером развития и прогрессирования опухоли. Тирозинкиназа EGFR модулирует рост и дифференцировку эпителиальных клеток посредством фосфорилирования внутриклеточных субстратов (Sigismund S. et al., 2018).

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. (Mendelsohn J., 2001; Sierra J.R. et al., 2010; Nan X. et al., 2017). 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 (Cossu-Rocca P. et al., 2016; Riely G.J. et al., 2015). 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 (Ricordel C. et al., 2018; Lim S.M. et al., 2018). 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 (Дудина М.О., 2019; Суслова И.Р., 2021; Самышина Е.А., 2022; Кудрявцев М.Ю., 2023; Дерябина О.Н., 2023).

Производные акридина являются хорошо известным источником многих противоопухолевых препаратов (Дудина М.О., 2019; Сулова И.Р., 2021; Самышина Е.А., 2022). 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® 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.

б. 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-гидроксипутандиватом (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 ксенографта.

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 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. Гетеротопическая животная модель ксенографта (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 ксенографтом, 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.

### **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 ксенографтов, их патологоанатомической валидации, самостоятельно регистрировала результаты исследования, выполняла свод, обобщение и анализ данных, деятельно участвовала в написании научных публикаций по теме диссертационной работы.

### **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 паспортам научных специальностей**

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, геной 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).

### **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.

### **Структура и объем диссертации**

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.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнялась в Институте морфологии и цифровой патологии и на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Протокол настоящего исследования включал использование в научных целях лабораторных животных, а также живых тканей и клеток пациентов, в связи с чем 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).

Настоящее исследование было спланировано и выполнено в несколько этапов (рисунок 1).

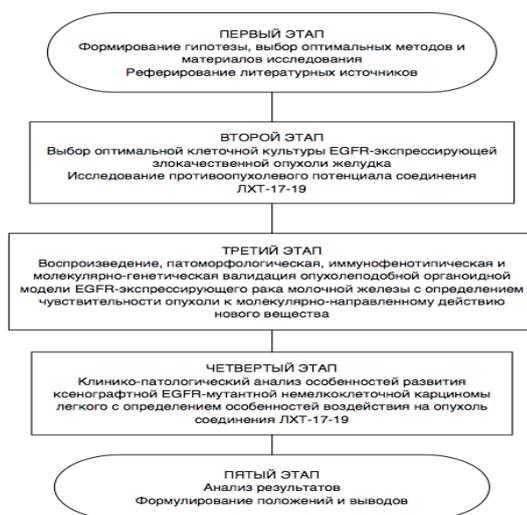


Рисунок 1 – Дизайн и структура исследования

В работе изучено соединение 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидрокси-бутандиоват (лабораторный номер ЛХТ-17-19) (рисунок 2), 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.

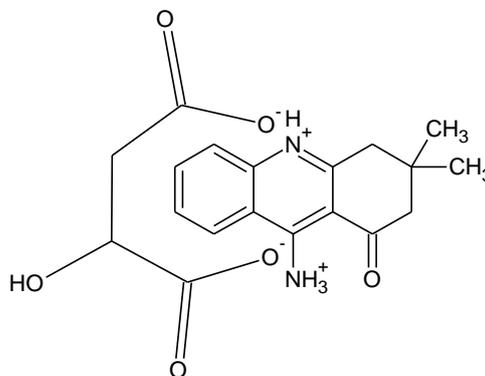


Рисунок 2 – Химическая структура 9-аминия-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она L-2-гидрокси-бутандиовата (лабораторный номер ЛХТ-17-19)

Способность исследуемого соединения молекулярно-направленного действия – производного акридина ЛХТ-17-19 эффективно ингибировать активность киназы EGFR оценивалась на различных EGFR-положительных опухолевых клетках культур рака желудка человека AGS, Hs746T и MKN1, экспрессирующих киназу EGFR дикого типа (таблица 1), на органоидной (patient-derived organoid – PDO) модели рака молочной железы, экспрессирующего дикий тип EGFR (рисунок 3), а так же на гетеротопической животной модели ксенографта (PDX) EGFR-экспрессирующей ALK-позитивной аденокарциномы легкого совместно с препаратом

сравнения -ингибитора тирозинкиназы первого поколения эрлотиниба (чистота > 98%, Merck SIGMA-Aldrich, Германия) (рисунок 4). Гетеротопическая животная модель ксенографта (PDX) экспрессирующей EGFR карциномы легкого, полученной от пациента, была воспроизведена у самцов мышей BALB/c nu/nu в возрасте 10 недель. 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.

Исследуемое соединение и препарат сравнения вводились животным внутривенно в вену хвоста в объеме растворителя 2 мл изотонического 0,9% раствора хлорида натрия.

Таблица 1 - Сводная информация о линиях клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка человека, использованных в настоящем исследовании.

Клеточная культура	Источник	Среда культивации	Дополнительно
AGS (ECACC, каталожный номер 89090402)	Европейская коллекция клеточных культур	RPMI 1640 (Life Technologies, Дармштадт, Германия) с добавлением 2 мМ L-глутамина (Life Technologies, Дармштадт, Германия)	10% фетальной сывороткой (FBS) Sera Plus (PAN-Biotech, Германия) с содержанием пенициллина и стрептомицина (Merck Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 100 МЕ/мл, 100 мкг/мл соответственно. Инкубация в CO <sub>2</sub> инкубаторе при температуре 37°C.
MKN1 (каталожный номер RCB1003 и каталожный номер RCB1062)	Банк клеток RIKEN BioResource Center (Цукуба, Япония)		
Hs746T (LGC Standards GmbH, Везель, Германия, каталожный номер ATCC HTB-135)	Коллекция клеточной биологии ATCC	Модифицированная среда Дульбекко (DMEM) с прибавлением GlutaMAX™-I, 4500 мг/л D-глюкозы и пирувата натрия (Life Technologies, Дармштадт, Германия)	

Для статистического анализа использовалось программное обеспечение STATA версии 17 (StataCorp. LLC, США). 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 ± 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.

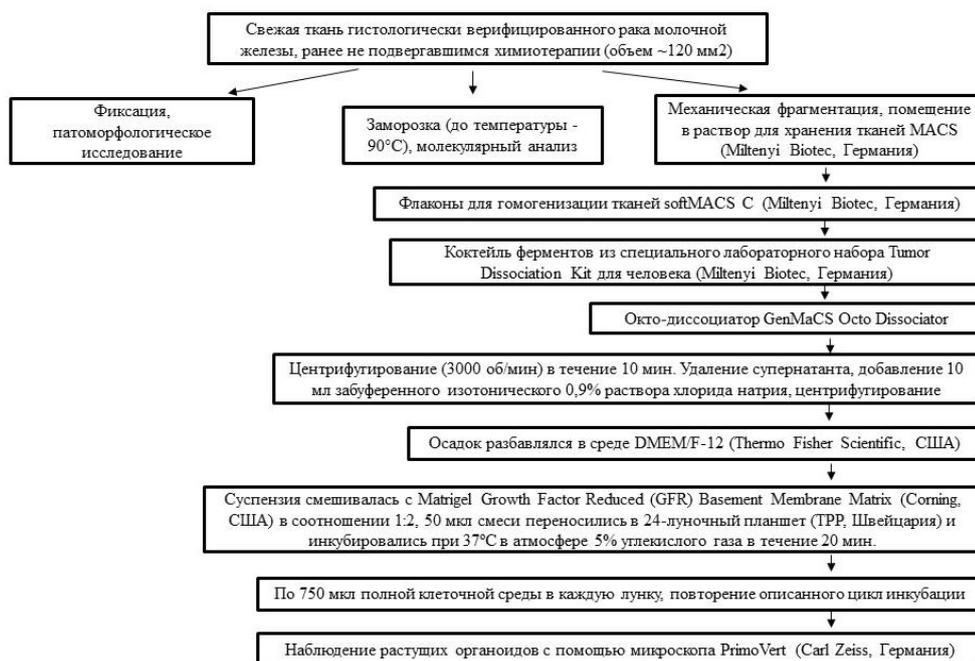


Рисунок 3 – Схема формирования органоидной опухолеподобной модели EGFR-позитивного рака молочной железы

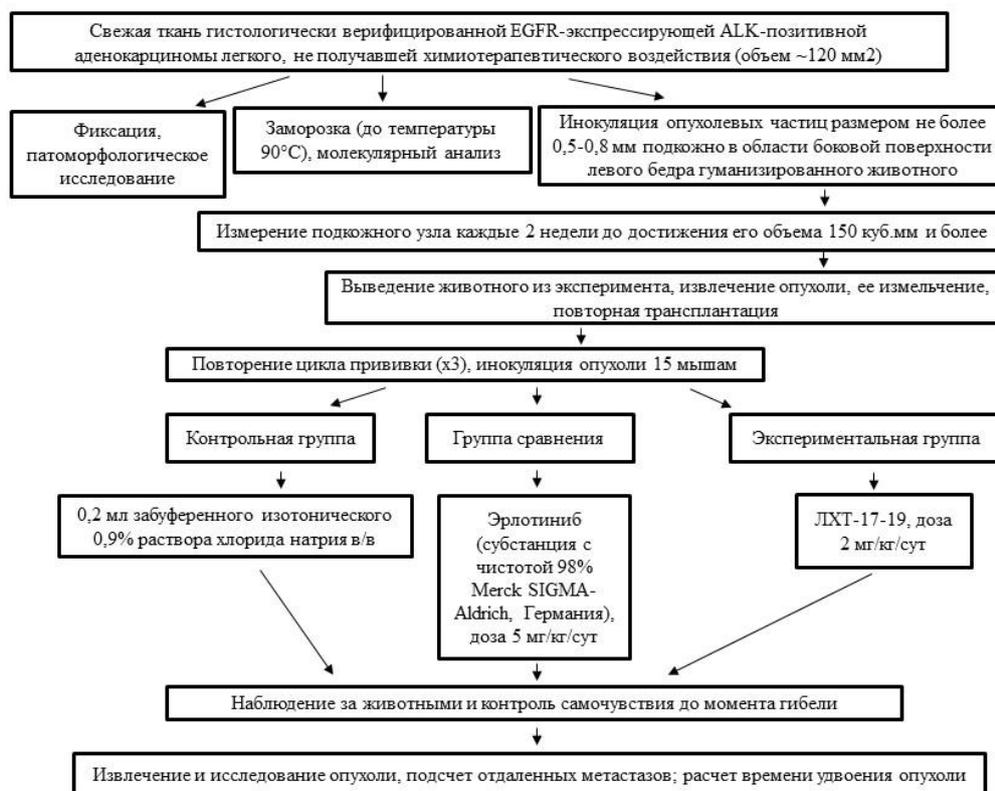


Рисунок 4 – Схема формирования ксенографтной животной модели EGFR-экспрессирующего немелкоклеточного рака легкого

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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. Ингибиторы киназ рассматриваются как эффективная основа стратегий лечения рака легкого, поджелудочной железы, молочной железы и других видов рака. Химически они происходят из различных органических структур, таких как 4-хиназолиномин (эрлотиниб гидрохлорид, gefitinib), 2-бутенамид (афатиниб), 2-пропенамид (осимертиниб) и т. д. 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-гидроксипутандиовая кислота. Добавление остатка карбоновой кислоты увеличивает растворимость молекулы в воде и позволяет использовать ее в виде водного раствора.

При выполнении докинговых исследований 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 за счет формирования  $\pi$ - $\sigma$ -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.

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.

Как хорошо видно (рисунок 5А), 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. 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 (рисунок 5Б).

Однако, в случае клеток культуры МKN1 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.

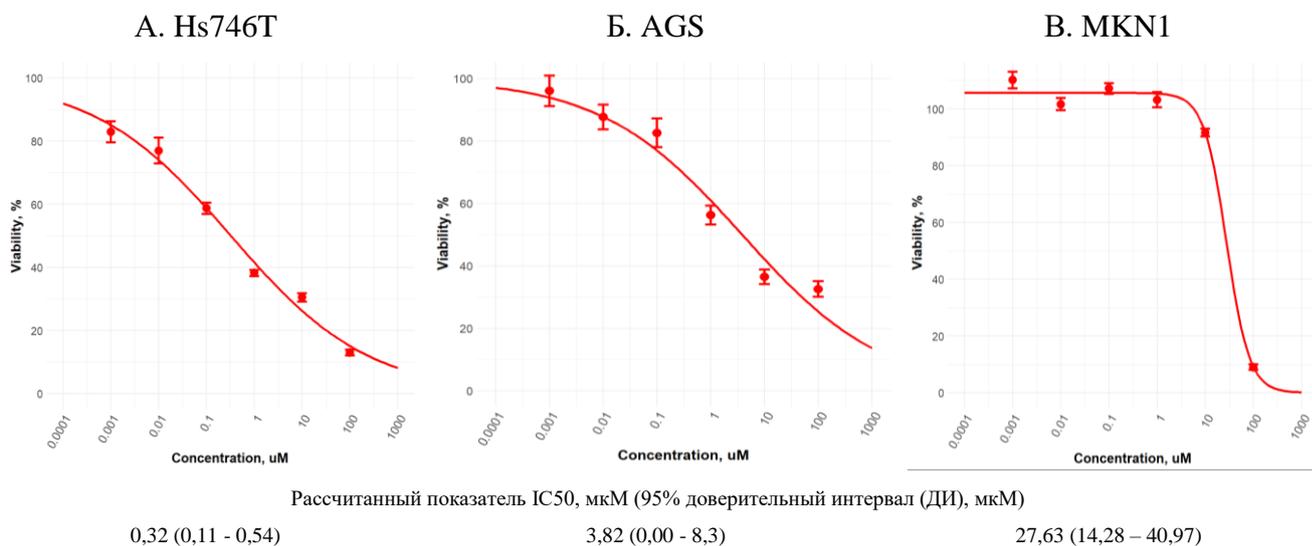


Рисунок 5 – Цитотоксическое действие 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН в отношении клеток рака желудка Hs746T (А), AGS (Б) и MKN1 (В)

Изучение влияния экспериментального воздействия на активность внутриклеточного драйвера онкогенеза методом вестерн-блоттинга продемонстрировало снижение уровня фосфорилированной формы рецепторной тирозинкиназы во всех трех культурах клеток EGFR-экспрессирующего рака желудка с разным уровнем подавления активности фермента в различных культурах. 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.

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 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. 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 6).

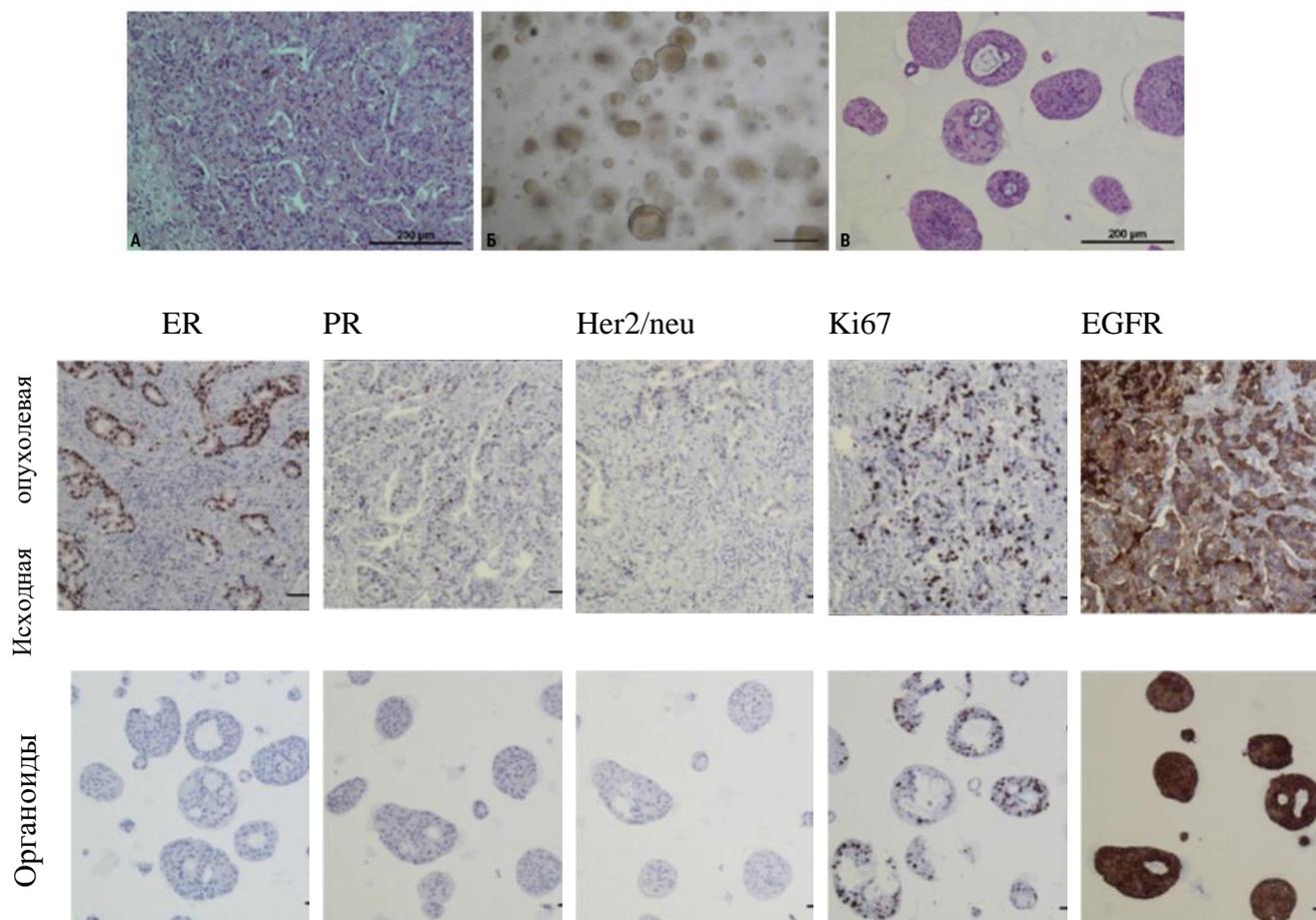


Рисунок 6 – Микропрепараты исходного образца опухоли пациентки 68 лет (А), органоидных культур после 7 суток их инкубирования в питательной среде (Б, В): А и В – окрашивание гематоксилином и эозином; Б – нативные препараты в проходящем свете; экспрессия клеточных маркеров рака молочной железы в исходной опухолевой ткани и в органоидах, ИГХ,  $\times 200$

Также определялся уровень экспрессии рецепторной тирозинкиназы EGFR. 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. Ими также показано, что также ER-отрицательные опухоли могут

генерировать ER-положительные органоиды. При проведении анализ экспрессии гена *EGFR* в клетках исходной опухолевой ткани и выращенных органоидных культур (рисунок 7) 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.

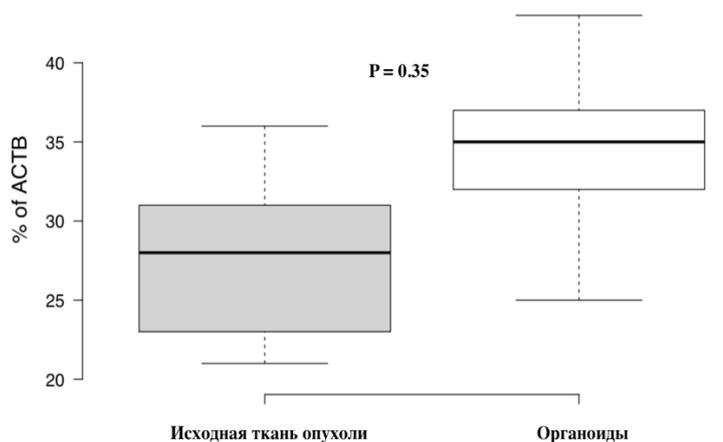


Рисунок 7 – Экспрессия гена *EGFR* в клетках исходной опухолевой ткани и выращенных органоидных культур (достоверность различий оценивали после проверки нормальности распределения с помощью двустороннего критерия t Стьюдента)

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-гидроксибутандивата до 250 и 1000 мкМ привело к существенному уменьшению размера органоидов. Циторедукция свидетельствовала не только об ингибировании пролиферации, но и формировании цитотоксического эффекта соединения. Вычисленный индекс ингибирования роста органоидов (growth inhibition, GI50) составил 0,32 мкМ (95% ДИ 0,11–0,54 мкМ).

Гетеротопическая животная модель ксенографта (PDX) экспрессирующей EGFR карциномы легкого, полученной от пациента, была воспроизведена у самцов мышей BALB/c nu/nu в возрасте 10 недель. Перед ксенографта все животные подвергались процедуре гуманизации, включавшей сублетальное рентгеновское облучение и трансплантацию CD8+ лимфоцитов человека. Морфологическая картина опухолевого узла третьей генерации животных при окраске гематоксилином и эозином соответствовала аденокарциноме ацинарного строения, G II (рисунок 8А).

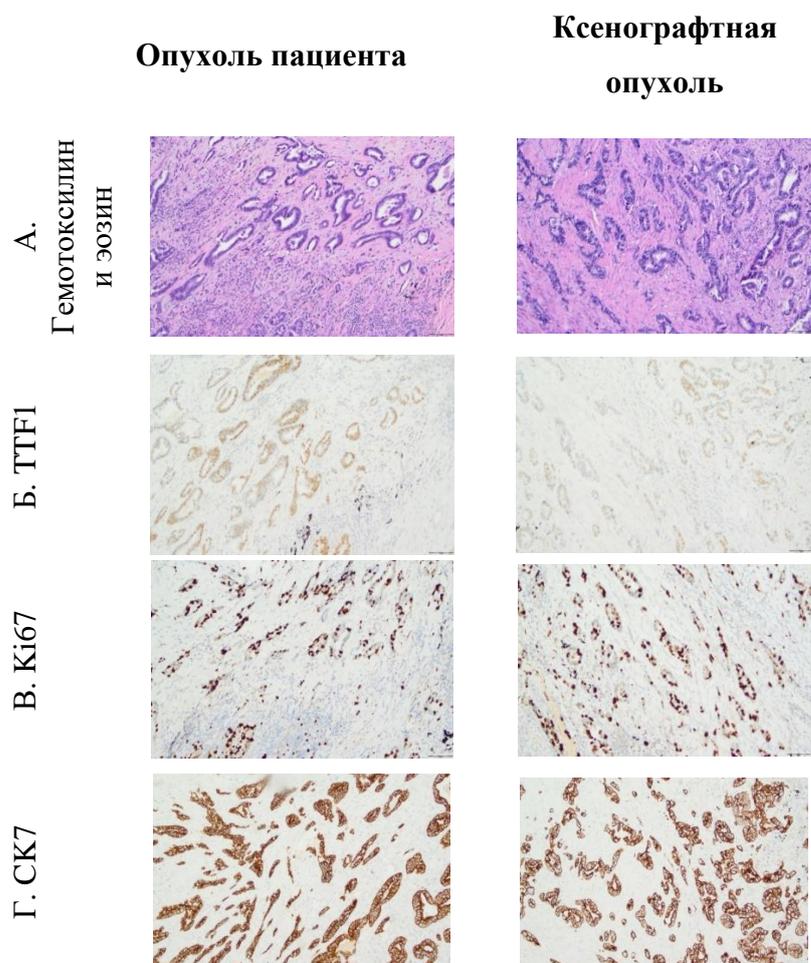


Рисунок 8 – Микропрепараты опухоли пациента и ксенографтной опухоли третьей генерации, развивавшейся в организме гуманизированных мышей BALB/c nu/nu,  $\times 200$ ; гематоксилин и эозин, ИГХ; пояснения в тексте

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 8Б), что доказывает иммунофенотипическую принадлежность к карциноме легкого. Диффузное позитивное субмембранное окрашивание 90% клеток карциномы пациента анти-СК7 антителами и 75% клеток ксенографтной опухоли (рисунок 8Г) доказывает аденогенный генез карциномы. Индекс пролиферации Ki67 в контрольной опухоли был равен 73%, в ксенографтной опухоли – 85% (рисунок 8В).

С целью установления соответствия экспрессии драйвера онкогенной трансформации – рецепторной киназы EGFR ксенографтного узла образцу исходного опухолевого материала, было выполнено ПЦР в режиме реального времени. Было установлено, что, как и исходная опухолевая ткань, так и клетки ксенографта немелкоклеточного рака легкого 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, что может быть использован в доклинических и персонализированных исследованиях в фундаментальной фармакологии и молекулярной онкологии.

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 9). Патологических вставок в экзоне 19 гена EGFR не обнаруживали. Подобные же изменения были зарегистрированы в группе препарата сравнения эрлотиниба.

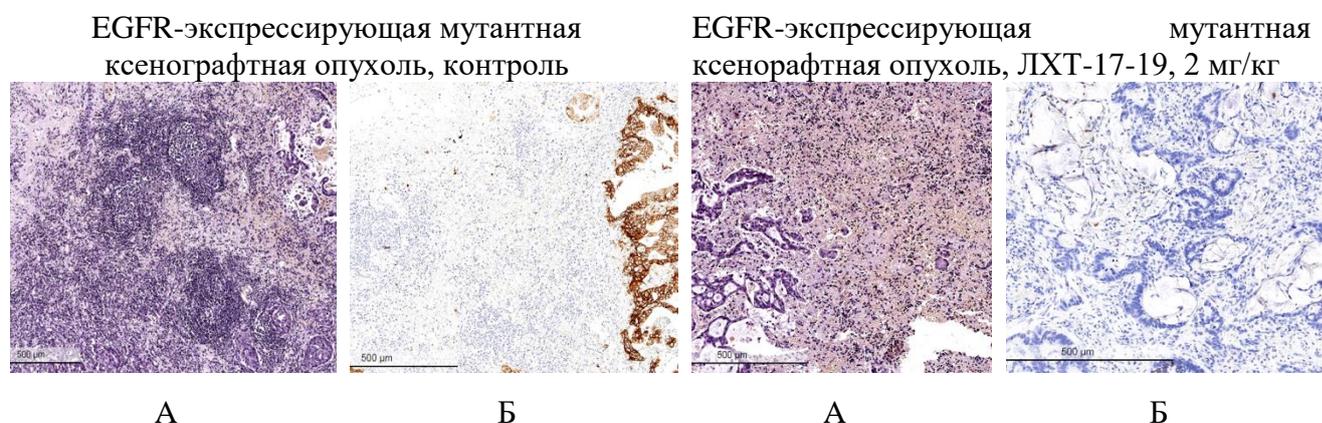
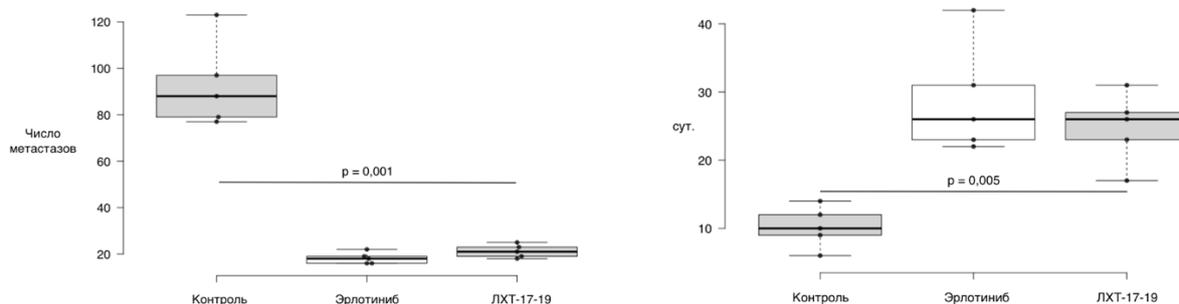


Рисунок 9 – Микропрепараты EGFR-экспрессирующей мутантной ксенографтной опухоли третьей генерации, развивавшейся в организме гуманизированных мышей BALB/c nu/nu, в контроле и на фоне экспериментальной терапии ЛХТ-17-19 в дозе 2 мг/кг в сутки в течение 7 суток: А – гематоксилин и эозин; Б – анти-EGFR ИГХ окрашивание;  $\times 500$

Экспериментальная терапия мышей-носителей мутантного генотипа экспрессирующего EGFR ксенографта карциномы легкого соединением акридона 9-аммоний-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-ОН L-2-гидроксипутандиватом (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 10А), увеличению 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 10Б), к увеличению выживаемости лабораторных мышей.



Достоверность различий определена после проверки нормальности распределения с помощью критерия t Стьюдента с поправкой Бонферрони.

А

Достоверность различий определена после проверки нормальности распределения с помощью критерия t Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Б

Рисунок 10 – А 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. Б. 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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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).

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. 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.

## 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. К вопросу о противоопухолевой активности нового соединения – производного пиридина / М.Ю. Кудрявцев, Е.А. Самышина, О.Н. Дерябина, К.К. Арутюнян, **А.А. Епишкина** // **Вестник «Биомедицина и социология»** – 2021. – Т. 6. – №4. – С. 52-59.
2. Получение и механизм противоопухолевого действия соединения 4Н-аминохромена /Е.В. Блинова, М.Ю. Кудрявцев, Д.Н. Шимановский, С.Я. Скачилова, **А.А. Епишкина**, Д.С. Блинов, О.М. Тумутолова, Е.А. Симакина, Ю.А. Шифрин, О.Н. Дерябина, Е.В. Шилова, А.А. Махрова, К.К. Арутюнян // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2022. – Т. 56. – №1. – С. 15-18 [**Scopus**]
3. Внеэкспериментальный поиск молекул с противоопухолевой активностью и молекулярный докинг в ряду производных пиридинкарбоновых кислот / О.Н. Дерябина, М.Ю. Кудрявцев, О.М. Тумутолова, Е.В. Блинова, **А.А. Епишкина**, С.Я. Скачилова, А.А. Махрова, Д.С. Блинов // **Вестник «Биомедицина и социология»** – 2022. – Т. 7. № 3. – С. 37-42.
4. Морфологическая оценка сосудистого микроокружения плоскоклеточных карцином легкого / **А.А. Епишкина**, А.М. Авдалян, Е.В. Гребенкин, Д.С. Кобяков, Д.Н. Проценко, О.В. Зайратьянц// **Клиническая и экспериментальная морфология**. – 2022. – Т. 11, № 2. - С. 54–62. [**Scopus**]
5. Изучение фармакологической активности производного аминохромена при лечении рака молочной железы (экспериментальное исследование) // О.Н. Дерябина, Е.В. Блинова, Е.А. Самышина, Т.А. Демура, **А.А. Епишкина**, М.О. Дудина, О.М. Тумутолова // **Вестник «Биомедицина и социология»**. - 2022 - Т. 6, № 2. - С. 12-19.

6. Противоопухолевое действие нового производного дигидроакридина на экспериментальной модели рака мочевого пузыря / Е.В. Блинова, О.Н. Дерябина, М.Ю. Кудрявцев, О.М. Тумутолова, А.А. Махрова, Д.С. Блинов, **А.А. Епишкина**, Ю.С. Гилевская, Е.А. Самышина, С.Я. Скачилова, К.К. Арутюнян // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2022. – Т. 85, №9. – С. 22–26. [Scopus]
7. Изучение фармакологической активности лхт-17-19 в культурах клеток эпителиальных опухолей, экспрессирующих EGFR / М.Ю. Кудрявцев, О.Н. Тумутолова, О.Н. Дерябина, **А.А. Епишкина**, О.С. Вавилова, Ю.С. Гилевская, Е.В. Блинова // **Вестник «Биомедицина и Социология»**. – 2022 Т.7№3. – С.70-74.
8. Antitumor activity of the novel pyridine derivative / Ekaterina V. Blinova, **Anna V. Epishkina**, Oksana M. Tumutolova, Olga N. Deryabina, Sofia Ya. Skachilova, Mihail Yu. Kudriavtsev , Evgenia V. Shikh , Olga S. Vavilova , Yulia S. Gilevskaya , Gordey V. Brykin , Anna A. Makhrova, Dmitry S. Blinov // **Research Results in Pharmacology**. – 2022. – Vol. 8(3). – P. 81-85. [Scopus]
9. Морфологическая и иммуногистохимическая валидация персонализированной биологической in vivo платформы немелкоклеточного рака легкого человека / **А.А. Епишкина**, О.Н. Дерябина, О.Н. Тумутолова, Д.С. Блинов, А.А. Махрова, Г.В. Брыкин, Д.Н. Шимановский, Е.В. Блинова // Журнал Анатомии и гистопатологии. - 2022. - Т. 11, № 4. - С. 53-57.
10. Противоопухолевая активность некоторых перспективных соединений пиридинкарбоновых кислот в опухолевых клеточных культурах / **А.А. Епишкина**, О.Н. Дерябина, Д.С. Блинов, Е.А. Куторкина, О.Н. Тумутолова, В.А. Пакина, Е.В. Блинова // **Вестник «Биомедицина и социология»**. - 2023. - Т. 8, № 2. - С. 10-15.
11. Противоопухолевый потенциал производного пиридинкарбоновых кислот на in vivo модели тройного негативного рака молочной желез / **А.А. Епишкина**, О.Н. Дерябина, Е.В. Блинова, Е.А. Курмышева, О.С. Вавилова // материалы Всероссийского конгресса с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии». - 2023. – Т. 22, № 2. - С. 37.
12. Изучение противоопухолевого действия нового соединения пиридинкарбоновой кислоты на инновационной модели немелкоклеточного рака легкого / **А.А. Епишкина**, Е.В. Блинова, О.Н. Дерябина, М.Ю. Кудрявцев, Д.С. Блинов, С.Я. Скачилова // материалы IX Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2023» «Вопросы онкологии». - 2023. – Т. 69, № 3. - С. 460-461.
13. Изучение фармакологической эффективности производных пиридинкарбоновых кислот in vitro / **А.А. Епишкина**, Е.В. Блинова, О.Н. Дерябина, Н.Р. Рубаданова // Огарёв-Online. - 2023. - № 3 (188).

## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ - аденозинтрифосфат

ИГХ - иммуногистохимия

НМРЛ - немелкоклеточный рак легкого

DNA (ДНК) – дезоксирибонуклеиновая кислота

EGFR (ErbB-1) - epidermal growth factor receptor

ER - estrogen receptor

Her2/neu - human epidermal growth factor receptor 2

PDO - patient-derived organoid

PDX - patient-derived xenograft

PI3K/Akt - phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinaseB

PR - progesteron receptor

qPCR (ПЦР) - quantitative polymerase chain reaction (полимеразная цепная реакция)

Ras/Raf/MEK - retrovirus associated DNA sequences/ rapidly accelerated fibrosarcoma/ mitogen-activated protein kinase kinase

RTK-c-Met - receptor tyrosine kinases-c-MNNG HOS transforming gene