

*На правах рукописи*

**БИКИНИЕВА ФИРЮЗА ФАНИСОВНА**

**РОЛЬ АУТОКРИННОЙ АКТИВАЦИИ FGF-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В  
РЕЗИСТЕНТНОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ  
ОПУХОЛЕЙ К ИМАТИНИБУ**

3.3.3 – Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Казань – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий кафедрой общей патологии  
член-корреспондент АН РТ

**Бойчук Сергей Васильевич**

**Официальные оппоненты:**

**Рукша Татьяна Геннадьевна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО КрасГМУ им.проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск

**Додохова Маргарита Авдеевна**, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, г.Ростов-на-Дону

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «14» марта 2024 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.012.02, созданном на базе ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д.49б, и на сайте организации: <https://kazangmu.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д-р мед. наук, доцент

**О.Р. Радченко**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) представляют собой мезенхимальные опухоли желудочно-кишечного тракта (Щеголев А.И. и др., 2007, Joensuu H. et al., 2013, Мазуренко Н.Н. и др., 2015), происходящие из интерстициальных клеток Кахала (пейсмейкеров желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)) или их клеток-предшественников. На протяжении многих лет данные опухоли ошибочно включали в группу лейомиом, лейомиосарком, лейомиобластом, что, в свою очередь, являлось одним из основных факторов плохого прогноза заболевания, в первую очередь, для пациентов с диссеминированными формами (DeMatteo R.P. et al., 2000, Heinrich M.C. et al., 2005). Данная ситуация изменилась кардинальным образом после обнаружения в ГИСО активирующей мутации гена тирозинкиназного рецептора *c-KIT* (Akahoshi K. et al., 2018, Скворцова Т.Э. и др., 2021, Casali P.G. et al., 2022). Именно поэтому в настоящее время в качестве лекарственного препарата первой линии терапии для пациентов с ГИСО используется иматиниб мезилат (ИМ, Гливек), который показал превосходные результаты по сравнению с ранее применявшимися химиопрепаратами (Din O. S. et al., 2008, Никулин М.П. и др., 2019). Несмотря на высокую эффективность применения ИМ в лечении ГИСО, спустя 2 года после начала проведения терапии ИМ у большинства пациентов развивается устойчивость опухолей к данному препарату (Serrano C. et al., 2020). В этом случае пациентам последовательно рекомендовано назначение препаратов второй, третьей и четвертой линии, а именно, сунитиниба, регорафениба и рипретиниба, соответственно (Blay J.Y. et al., 2022). Основанием для их назначения является клиническое прогрессирование на фоне продолжающейся терапии ИМ, а также обнаружение в ГИСО вторичных мутаций *c-KIT* или *PDGFRFA*, что существенным образом снижает эффективность ИМ (Casali P.G. et al., 2022). Несмотря на то, что применение вышеуказанных ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) приводит к положительному клиническому эффекту, у большинства пациентов с ГИСО достаточно быстро развивается прогрессирование заболевания (Mohammadi M. et al., 2021), что свидетельствует о многообразии путей формирования вторичной резистентности ГИСО к ИТК, и иллюстрирует актуальность исследований, направленных на понимание

механизмов патогенеза ГИСО и формирования их устойчивости к действию ИТК.

Нарушение регуляции FGF-сигнального пути при злокачественных новообразованиях является одним из наиболее активно изучаемых научных направлений как в области экспериментальной, так и практической онкологии. Показано, что активация FGF-сигнального пути способствует усилению пролиферативного индекса опухолей и способна модулировать их чувствительность к действию многих лекарственных препаратов, в том числе, таргетных (Turner N. et al., 2010, Voichuk S. et al., 2017, 2018, Astolfi A. et al., 2020). Поэтому изучение механизмов резистентности к вышеуказанным препаратам является одним из важных научных направлений в понимании процессов прогрессирования злокачественных новообразований и преодоления развивающейся лекарственной устойчивости опухолей (Weaver A. et al., 2021, Liu G. et al., 2021, Liu S. et al., 2022).

#### **Степень разработанности темы исследования**

Изучение роли FGF-сигнального пути в патогенезе и терапии злокачественных новообразований является одним из интенсивно изучаемых научно-практических направлений в онкологии. При многих злокачественных новообразованиях была показана важная роль активирующих мутаций и гиперэкспрессии одного из 4-х типов рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR) (Wesche J. et al., 2011, Brooks A.N. et al., 2012). Кроме этого, объектами научных исследований являются механизмы аутокринной и паракринной активации FGF-сигнального пути в опухолях, осуществляемые посредством гиперпродукции соответствующих лигандов, в первую очередь, FGF-2 (Dow J.K. et al., 2000, Akl M.R. et al., 2016). Результаты исследований нашей научной группы показали факт активации FGF-сигнального пути в ГИСО с фенотипическими признаками резистентности к ИМ (Voichuk S. et al., 2018, Voichuk S. et al., 2020). Тем не менее, механизмы активации FGF-сигнального пути в ИМ-резистентных ГИСО изучены недостаточно, что явилось основанием для проведения настоящего исследования.

#### **Цель исследования**

Исследовать механизмы активации FGF-сигнального пути в гастроинтестинальных стромальных опухолях и их роль в резистентности к иматинибу мезилату.

### **Задачи исследования**

1. Получить субклон клеточной линии ГИСО, резистентный к ИМ, и провести сравнительный анализ чувствительности к ИМ у ИМ-чувствительных и резистентных клеточных линий ГИСО.
2. Исследовать изменения в секрете ИМ-чувствительных и резистентных ГИСО на фоне ингибирования КИТ-сигнального пути.
3. Изучить роль аутокринных механизмов в регуляции FGF-сигналинга в ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО *in vitro*.
4. Оценить способность экзогенного FGF-2 лиганда регулировать процессы пролиферации, инвазии, миграции и апоптоза клеток ГИСО, подвергнутых воздействию таргетного препарата ИМ.
5. Выявить роль активации FGF-сигнального пути в процессах инвазии и миграции опухолевых клеток, а также на фоне ИМ-индуцированного ингибирования КИТ-сигнального пути.

### **Методы и методология**

В работе использовался ряд современных методов молекулярной биологии, биохимии и генетики: культивирование клеточных линий, оценка уровня экспрессии белков методами иммуноблоттинга и полимеразной цепной реакции в реальном времени, изучение апоптоза клеток TUNEL-методом, изучение процессов миграции и инвазии опухолевых клеток.

### **Научная новизна**

В результате проведенных исследований были впервые получены данные об изменениях секрета клеток ГИСО, находящихся под воздействием ИМ. Данные изменения проявлялись усилением продукции некоторых хемокинов и цитокинов под действием данного таргетного препарата. Были получены новые данные о том, что ИМ способен стимулировать синтез фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) в клетках ГИСО, резистентных к действию ИМ. Аналогичные изменения фенотипа опухолевых клеток наблюдались при ингибировании КИТ-сигнального пути с использованием соответствующих кИРНК. Кроме того, впервые было обнаружено, что ИМ стимулирует процессы инвазии, миграции и формирования колоний в ИМ-резистентных ГИСО. Эти эффекты являлись следствием аутокринной активации FGF-сигнального пути в ГИСО, так как нейтрализация FGF-2 лиганда нивелировала вышеуказанные эффекты ИМ. Таким образом, полученные результаты впервые иллюстрируют

процессы ИМ-индуцированной аутокринной активации FGF-сигнального пути в ГИСО, что, в свою очередь, обеспечивает их резистентность к ИМ. Данный факт открывает новые перспективы для изучения клинической эффективности ингибиторов FGF-сигнального пути в лечении пациентов с ГИСО, прогрессирующими на фоне продолжающейся таргетной терапии ИМ.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Представленные в диссертационной работе данные расширяют понимание патогенеза ГИСО и механизмов формирования резистентности ГИСО к ИМ. Данная резистентность может являться следствием аутокринной активации FGF-сигнального пути в опухолевых клетках, происходящей в результате способности ИМ индуцировать продукцию опухолевыми клетками FGF-2 и, таким образом, стимулировать процессы их инвазии и миграции. Полученные экспериментальные данные могут способствовать разработке новых стратегий лечения пациентов с ГИСО, у которых развилась вторичная резистентность к ИМ на фоне отсутствия вторичных мутаций *KIT* и/или *PDGFR2A*. Возможность блокирования FGF-сигнального пути с использованием соответствующих ИТК и моноклональных (АТ) может быть рассмотрена в качестве перспективного терапевтического подхода для данных пациентов. Кроме того, изменение уровня экспрессии и концентрации FGF-2 лиганда как в самих злокачественных новообразованиях, так и в сыворотке пациентов, может быть использовано в качестве предиктора формирующейся резистентности опухоли к таргетному препарату ИМ.

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

1. Активация FGF-сигнального пути в ГИСО, резистентных к иматинибу мезилату, происходит аутокринным путем и обусловлена гиперпродукцией FGF-2 лиганда опухолевыми клетками под действием данного таргетного препарата.

2. Иматиниба мезилат усиливает миграционные и инвазивные характеристики ИМ-резистентных ГИСО посредством FGF-2-опосредованной активации FGF-сигнального пути, что является новым механизмом прогрессирования ГИСО на фоне проводимой таргетной терапии иматинибом мезилатом.

### **Соответствие паспорту специальности**

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.3.3 – Патологическая физиология. Результаты диссертации соответствуют области исследования

специальности: 1. Изучение механизмов онкогенеза ГИСО сопряжено с фундаментальными достижениями в области молекулярной биологии, биохимии и генетики. 2. Исследование роли цитокинов в пролиферативной активности опухолевых клеток; 3. Изучение патогенетической роли аутокринной активации FGF-FGFR- сигнального пути в прогрессировании ГИСО.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, подтверждается обширным набором экспериментов, использованием современных методов исследования, которые были направлены на достижение поставленных целей и задач. Выводы, представленные в работе, а также практические рекомендации, опираются на фактические данные, наглядно представленные в виде иллюстративных рисунков и таблиц. Проведение статистического анализа и интерпретация полученных результатов осуществлялись с применением современных и соответствующих методов обработки информации. Эти факторы обеспечивают надежность и значимость диссертационного исследования.

Основные результаты исследования были представлены на следующих конференциях и конгрессах: 12-я ежегодная международная конференция общества клинических онкологов (г. Сеул, 2019 г.), 5-я Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (г. Москва, 2019 г.), 27-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Белые цветы» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (г. Казань, 2021г.), Поволжском онкологическом форуме КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (г. Казань, 2022г.).

Научные материалы, представленные в диссертации, активно применяются в учебном процессе кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (г.Пермь) при изучении дисциплин: «Патологическая физиология», «Патология», «Фармакология», «Биохимия злокачественного роста» и «Молекулярные основы канцерогенеза» у студентов 3 курса лечебного, педиатрического, медико-биологического и фармацевтического факультетов. Кроме того, они находят применение в исследовательской работе молодежной научной лаборатории «Молекулярных

механизмов химиорезистентности опухолей» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 представлены в научных изданиях, определенных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и 5 публикаций входит в международную научную базу цитирования (Scopus Q1). Получен патент Российской Федерации на изобретение (регистрационный номер: 2765545, дата регистрации: 01.02.2022).

### **Объем и структура работы**

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, заключения, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 122 источника, из которых 107 зарубежных авторов. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, иллюстрирована 8 таблицами и 18 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Методология и методы исследования**

Исследования проводились на опухолевых клеточных линиях: ГИСО Т-1, ГИСО Т-1R, ГИСО 430, которые культивировали в культуральной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с содержанием 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), 1% L-глутаминовой кислоты (ПанЭко, Россия) и 1% раствора пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В ряде случаев опухолевые клетки культивировали в присутствии ИМ, нейтрализующих анти-FGF-2 АТ или рекомбинантного FGF-2 (Мерк, Германия).

Уровень экспрессии белков в клеточных линиях ГИСО оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих первичных моно- и поликлональных АТ. В качестве вторичных АТ были использованы поликлональные АТ, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, США). Детекцию белков на мембране проводили с помощью хемилюминесценции на приборе Fusion Solo (Vilber Voutmart, Франция). Денситометрический анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения NIH ImageJ (Бетесда, США).

Оценку пролиферативной активности опухолевых клеток осуществляли в режиме реального времени с использованием системы iCELLigence (ACEA Biosciences, США). Изменения электрического сопротивления электрода, отражающие изменение количества клеток, измеряли с помощью программного обеспечения RTCA (Roche Diagnostics, Германия).

Определение показателей полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC50) для ИМ проводили с помощью колориметрического MTS-теста согласно общепринятому протоколу. Оценку результатов проводили на спектрофотометре MultiScan FC plate (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Значения IC50 рассчитывали в программе IC50 Tool Kit (<http://www.ic50.tk/>). Жизнеспособность клеток оценивали методом окрашивания чашек Петри красителем кристаллическим фиолетовым. При проведении количественных расчетов проводили оценку оптической плотности экстрагируемого раствора при длине волны 570 нм с помощью ридера MultiScan FC plate (Thermo Fisher Scientific, США).

Для оценки гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза использовали коммерческий набор (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Madison, США). Меченую флуоресцеином-12-дУДФ ДНК в клетках визуализировали при помощи флуоресцентной микроскопии на микроскопе Olympus BX63 (Olympus, Япония).

Оценку миграции и инвазии опухолевых клеток проводили с помощью методов скорости “заживления раны” и прохождения через полупроницаемую мембрану, соответственно. Клетки, мигрировавшие через поры вставок, фиксировали 70% этанолом, окрашивали красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США) и подсчитывали их количество методом флуоресцентной микроскопии Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Оценку уровня экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием соответствующих праймеров (Евроген, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Изучение секрета клеток ГИСО производили методом мультиплексного анализа с использованием магнитных частиц (MILLIPLEX MAP, Merck, США) на приборе MAGPIX (Bio-Rad, США) и соответствующего программного обеспечения xPONENT (Luminex, США).

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе исследования для изучения фенотипических характеристик чувствительных (ГИСО Т-1) и резистентных к ИМ клеточных линий (ГИСО Т-1R и ГИСО 430) был проведен анализ скорости пролиферации клеток ГИСО в присутствии ИМ. Представленные на Рисунке 1 кривые роста опухолевых клеточных культур иллюстрируют значимую разницу в скорости пролиферации между ИМ-чувствительной (Рисунок 1А) и ИМ-резистентными (Рисунок 1Б и В) ГИСО, культивируемыми с ИМ. Было показано, что пролиферативная активность резистентных к ИМ клеточных линий существенно не изменялась под действием препарата по сравнению с контролем (клетки, культивируемые в диметилсульфоксиде). Это свидетельствовало об устойчивости к данному препарату. На конечных сроках культивирования, скорость пролиферации ИМ-резистентной линии ГИСО Т-1R, культивируемой с ИМ, незначительно превышала контрольные значения (Рисунок 1Б), что свидетельствовало о способности ИМ усиливать скорость пролиферации опухолевых клеток. Ожидается, пролиферативная активность чувствительных к ИМ клеток ГИСО линии Т-1 снижалась в присутствии ИМ (Рисунок 1А), что свидетельствовало об их чувствительности к данному ИТК.

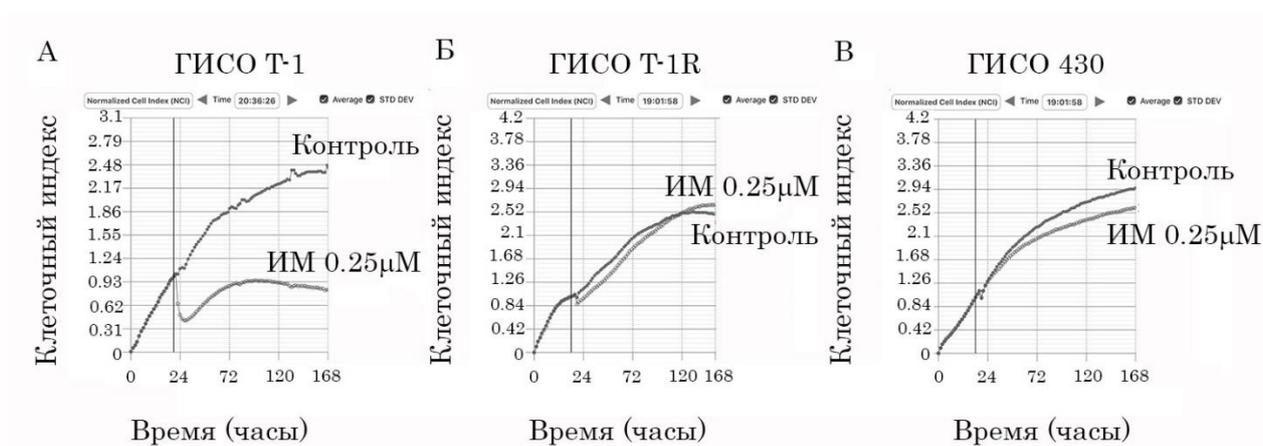


Рисунок 1 – Пролиферативная активность ИМ-чувствительных, культивируемых в присутствии ИМ в течение 7 дней: А – ГИСО Т-1, Б – ГИСО Т-1R, В – ГИСО 430

Снижение пролиферативной активности клеток ГИСО Т-1 под действием ИМ могло явиться следствием цитотоксического действия препарата, что подтверждали результаты колориметрического MTS-теста, показавшими значимые различия между чувствительными и резистентными клеточными

линиями ГИСО в значениях полу-максимальных ингибирующих концентраций (IC50). Данные, представленные в таблице 1, показывают, что концентрация ИМ, необходимая для индукции гибели ИМ-резистентных клеток линии ГИСО Т-1 выше в 772 раза по сравнению с их предшественниками (линия ГИСО Т-1). Аналогичным образом, различия в значениях IC50 между ИМ-чувствительной клеточной линией Т-1 и резистентной линией ГИСО 430 составляли более 850 раз.

Таблица 1 – Значения IC50 для ИМ в ИМ-чувствительных (Т-1) и ИМ-резистентных клеточных линиях (Т-1R и 430)

Клеточная линия	IC50 для ИМ (μМ)	Кратность увеличения значений IC50 для ИМ в ИМ-резистентных ГИСО по сравнению с линией ГИСО Т-1
ГИСО Т-1	0,061±0,002	-
ГИСО Т-1R	47,11±1,34	772
ГИСО 430	54,25±7,98	889

Данные, представленные на Рисунке 2, иллюстрируют цитотоксический эффект ИМ в отношении клеточной линии ГИСО Т-1. В то время, цитотоксическая активность ИМ в отношении ГИСО Т-1R и ГИСО 430 была минимальной. Было обнаружено, что основным механизмом гибели ИМ-чувствительных клеток ГИСО под действием ИМ являлся апоптоз, о чем свидетельствовало значимое повышение уровней экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы-3 (Рисунок 3). В отличие от ГИСО Т-1, в линиях ГИСО Т-1R и ГИСО 430 аналогичных изменений не наблюдалось, что подтверждало наличие их резистентности к ИМ.

Таким образом, ИМ снижал пролиферативный потенциал чувствительных к ИМ клеток ГИСО Т-1 и приводил к их гибели по механизму апоптоза, в то время как резистентная сублиния ГИСО Т-1 (также, как и ГИСО 430) обладала устойчивостью к данному таргетному препарату.

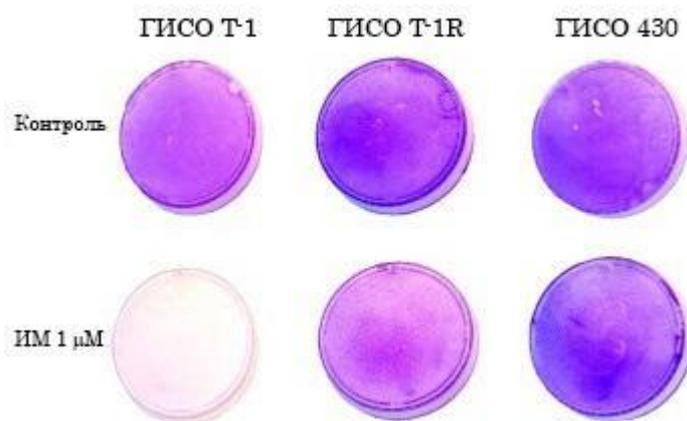


Рисунок 2 – Окрашивание кристаллическим фиолетовым ИМ-чувствительных (Т-1) и резистентных клеточных линий (Т-1R и 430), культивированных с ИМ (1  $\mu\text{M}$ ) в течение 96 ч.

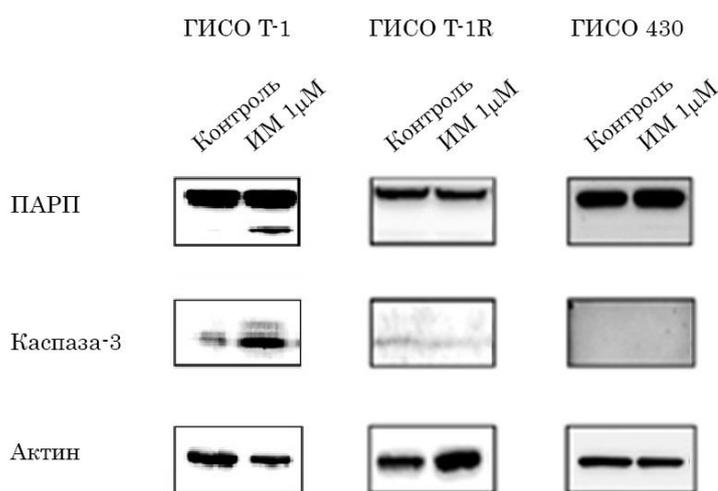


Рисунок 3 – Уровень экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 в ИМ-чувствительных (Т-1) и ИМ-резистентных клеточных линиях (Т-1R и 430) после инкубации ИМ (1 мкмоль/л) в течение 48 ч.

Следующим этапом исследования явилось выяснение механизмов вторичной резистентности к ИМ у клеток линий ГИСО Т-1R и ГИСО 430. В настоящее время описано несколько механизмов развития устойчивости клеток ГИСО к ИМ. Основным из них считается развитие вторичных мутаций *c-KIT* или *PDGFRA*. Помимо этого, описаны и другие механизмы, в том числе, активация альтернативных киназа-опосредованных сигнальных путей (например, Axl, c-Met, FAK и др.), усиливающая пролиферативную активность опухолевых клеток и ингибирующая их апоптоз.

На основании полученных нами ранее результатов, иллюстрирующих отсутствие в ГИСО T-1R вторичных мутаций *c-KIT* и *PDGFRA* (Voichuk S. et al., 2017), развитие резистентности к ИМ в этой клеточной линии могло явиться следствием активации вышеописанных альтернативных сигнальных путей, осуществляемых за счет гиперэкспрессии рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью, и/или аутокринной секреции опухолевыми клетками соответствующих лигандов.

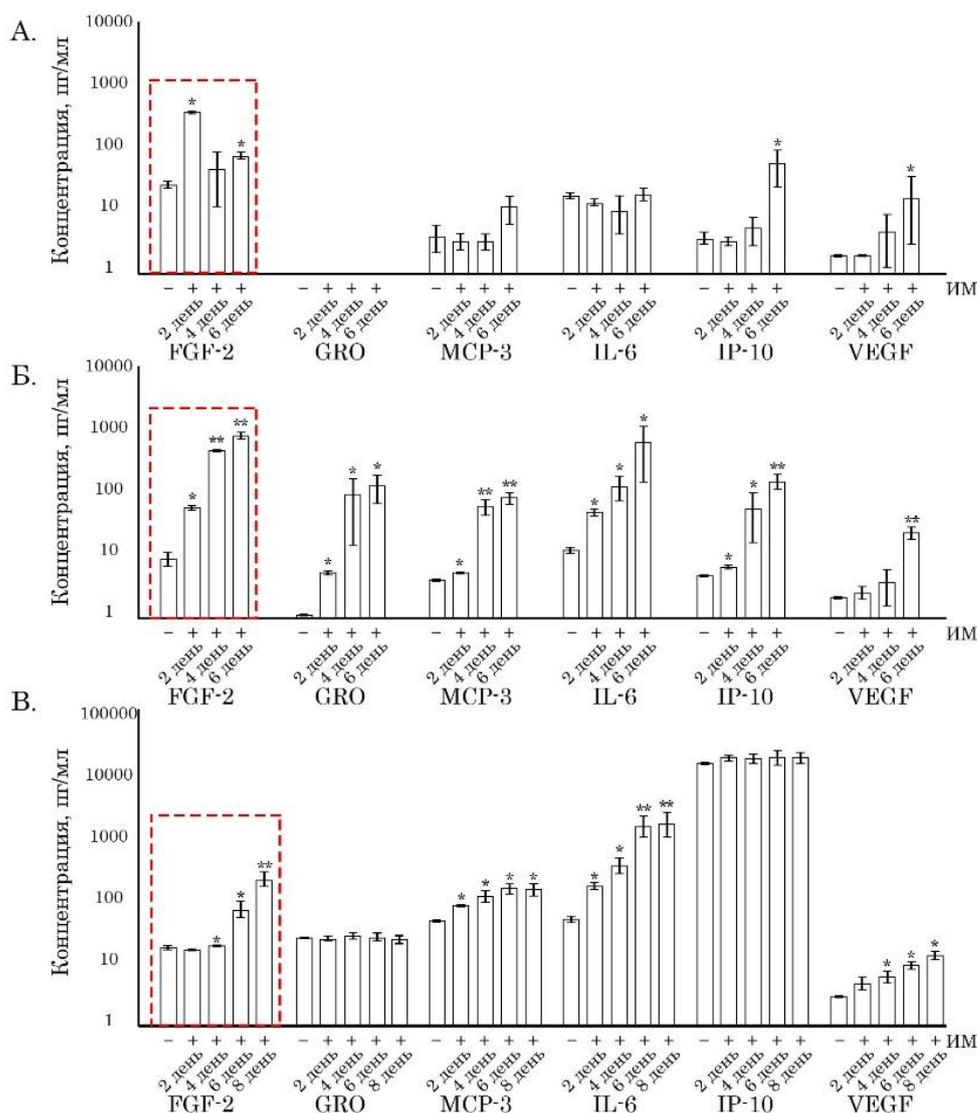


Рисунок 4 – Концентрация цитокинов в супернатантах ИМ-чувствительной и ИМ-резистентных клеточных линий, инкубированных с ИМ (1 мкмоль/л) в течение 2, 4 и 6 дней: А – ГИСО T-1, Б – ГИСО T-1R, В – ГИСО 430. Примечание – Статистически значимая разница значений между днями инкубации: (\*)  $p < 0,05$

Для изучения вышеуказанных механизмов было предпринято исследование секретома опухолевых клеток, чувствительных и резистентных к ИМ. Была изучена как спонтанная, так индуцированная ИМ секреция хемокинов и цитокинов данными клетками.

При анализе концентраций цитокинов и хемокинов в супернатантах клеточных культур достоверные различия между ИМ-чувствительной (Т-1) и 2 ИМ-резистентными клеточными линиями были обнаружены в отношении 6 цитокинов (FGF-2, GRO, MCP-3, IL-6, IP-10, и VEGF) (Рисунок 4). Важно, что ИМ-индуцированное увеличение концентрации FGF-2 и GRO было специфичным для клеточной сублинии Т-1R. Основываясь на данном факте, были проведены исследования по изучению механизмов активации FGF-сигнального пути в ГИСО и его роли в формировании их резистентности к ИМ. Было показано, что ИМ приводил к времени-зависимому усилению секреции FGF-2 в клетках сублинии Т-1R, тогда как в клетках Т-1 максимальные уровни FGF-2 были обнаружены только на 2-й день культивирования клеток, а в дальнейшем наблюдалось снижение концентрации FGF-2 в супернатантах, что могло являться результатом ИМ-индуцированной гибели клеток ГИСО Т-1 (Рисунок 5А). Аналогичная картина наблюдалась в клетках ГИСО Т-1R, трансфицированных кИРНК с-KIT (Рисунок 5Б), что указывало на важную роль ингибирования KIT-сигнального пути в гиперпродукции FGF-2 (Рисунок 5Г). “Выключение” KIT-опосредованного сигналинга в ГИСО Т-1R подтверждалось существенным снижением уровня фосфорилирования KIT как на фоне воздействия ИМ, так и в присутствии кИРНК с-KIT (Рисунок 5В).

Аналогично FGF-2, в супернатантах клеточных культур ГИСО, культивированных в присутствии ИМ или кИРНК KIT, было обнаружено повышение концентраций IL-6, MCP-3 и GRO. Эти данные подтверждали наличие функциональной взаимосвязи между секреторным фенотипом ГИСО и ингибированием в них KIT-сигнального пути (Рисунок 5Д). Эти данные коррелировали с изменением уровня экспрессии FGF-2 в ИМ-резистентных ГИСО (Рисунок 5Г), в то время как в клетках ГИСО Т-1 наблюдался обратный эффект ИМ, что могло являться свидетельством ИМ-индуцированной гибели клеток (Рисунок 5Г). ИМ-индуцированная секреция FGF-2 наблюдалась и в клетках линии ГИСО 430, что свидетельствует о том, что ИМ-индуцированная

секреция FGF-2 может являться общебиологическим феноменом, характерным для ИМ-резистентных ГИСО.

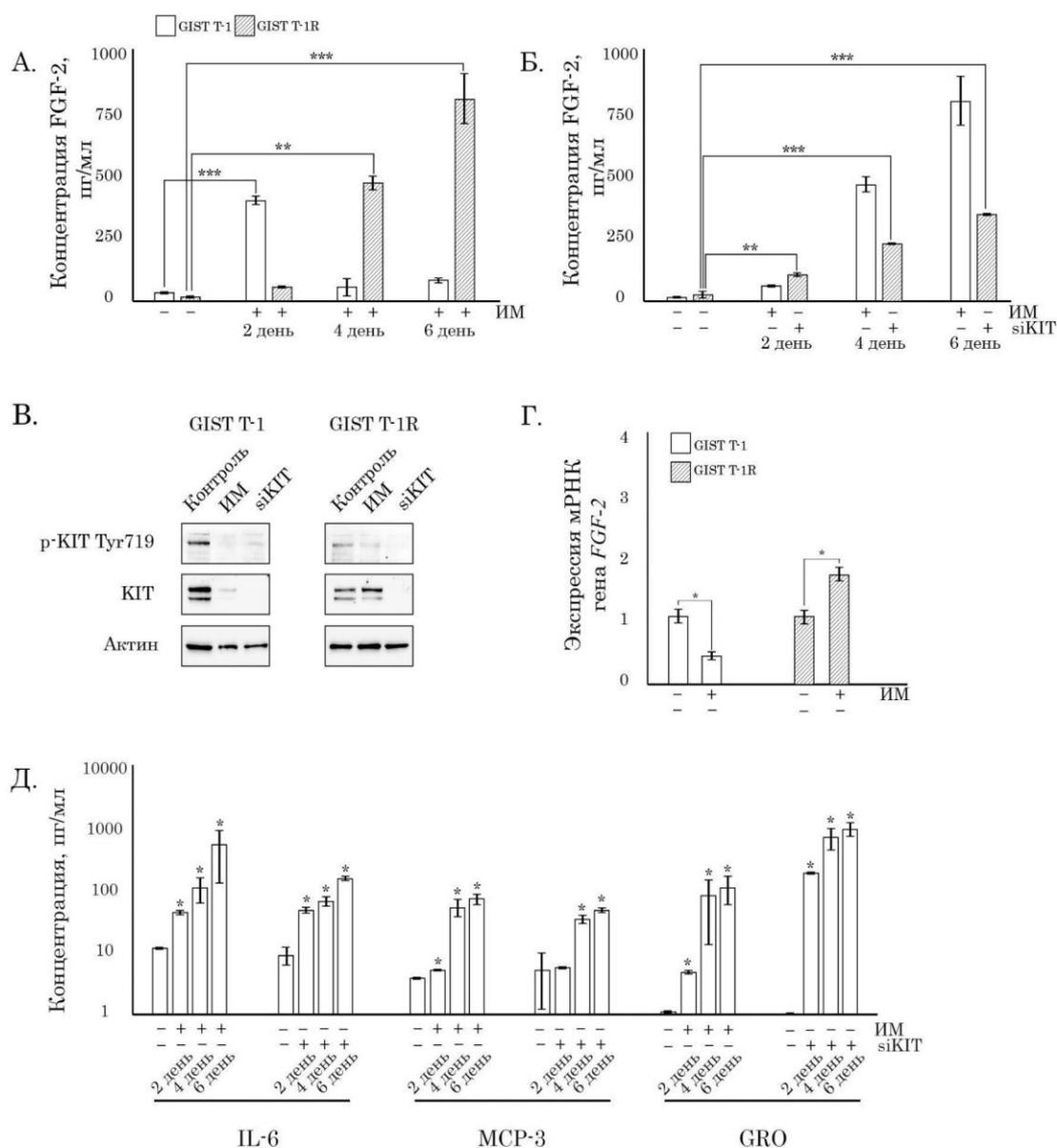


Рисунок 5 – А – Концентрация FGF-2 в супернатантах ИМ-чувствительных (Т-1) и ИМ-резистентных (Т-1R) клеточных линий, инкубированных с ИМ (1 мкмоль/л), Б – Концентрация FGF-2 в клетках линии Т-1R, трансфицированных киРНК КИТ, В – Экспрессия фосфорилированной и общей форм КИТ в клеточных линиях Т-1 и Т-1R, трансфицированных киРНК КИТ или под действием ИМ (1 мкмоль/л), Г – Данные ПЦР, показывающие изменения экспрессии *FGF2* в клеточных линиях Т-1 и Т-1R до и после инкубации с ИМ (1 мкмоль/л), Д – Содержание цитокинов в супернатантах клеток Т-1R, инкубированных с ИМ или трансфицированных киРНК *KIT*

Таким образом, была показана способность ИМ стимулировать продукцию FGF-2 ИМ-резистентными клетками ГИСО. В связи с этим, логичным было исследование активации FGF-сигнального пути в данных клетках, обусловленное связыванием вышеуказанного лиганда с рецепторами FGFR на поверхности опухолевых клеток. Для получения ответа на вопрос “вызывает ли продукция FGF-2 активацию FGFR-сигнального пути?” было проведено изучение уровня экспрессии активированных форм рецепторов FGFR, а также адаптерных сигнальных молекул, обеспечивающих трансляцию активационного сигнала (киназы АКТ и MAPK) в присутствии нейтрализующих анти-FGF-2 антител (НАТ к FGF-2).

Было показано, что инкубация клеток ГИСО с ИМ в присутствии анти-FGF-2 АТ полностью блокирует FGF-сигналинг. Это подтверждалось уменьшением уровня экспрессии фосфорилированной (т.е. активированной) формы FGFR1/2, а также нижележащих сигнальных киназ (MAPK и АКТ), участвующих в проведении активационного сигнала FGF-сигнального пути (Рисунок 6).

Таким образом, была показана способность ИМ вызывать изменения секрета у ИМ-резистентных ГИСО, что проявлялось гиперпродукцией ряда цитокинов и хемокинов. Наиболее значимым с патогенетической точки зрения является гиперпродукция FGF-2 лиганда, приводящая к активации FGF-сигнального пути.

В связи с вышеизложенным, было предпринято изучение влияния ИМ-индуцированной аутокринной активации FGF-сигнального пути на жизнеспособность ГИСО, а также их способности к инвазии и миграции. На начальном этапе исследования были изучена способность экзогенного FGF-2 лиганда модулировать цитотоксическую активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО.

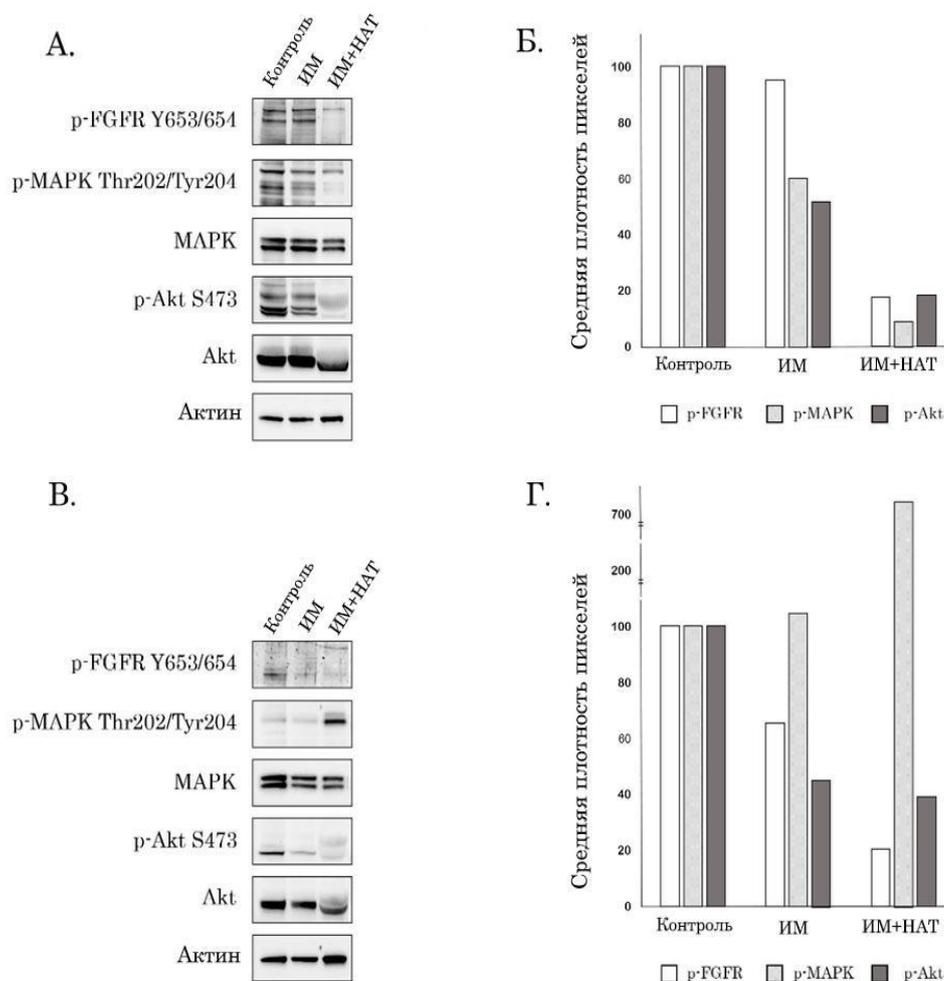


Рисунок 6 – Экспрессия сигнальных молекул FGF-сигнального пути в ИМ-резистентных культивированных с ИМ (1 мкмоль/л) без или в присутствии анти-FGF-2 НАТ (20 мкг/мл) в течение 72 ч.: А – ГИСО Т-1R, Б – Определение средней плотности пикселей ИМ-резистентных клеток ГИСО Т-1R, В – ГИСО 430, Г – Определение средней плотности пикселей ИМ-резистентных клеток ГИСО 430

Было обнаружено существенное повышение пролиферативной активности ИМ-чувствительных клеток ГИСО после внесения в культуру экзогенного FGF-2. Несмотря на то, что культивирование ИМ-чувствительных клеток ГИСО в присутствии ИМ приводило к значимому снижению пролиферативной активности вышеуказанных клеток, внесение в культуру экзогенного FGF-2 на фоне воздействия ИМ практически нивелировало анти-пролиферативный эффект препарата (Рисунок 7), доказывая, тем самым, способность лиганда усиливать пролиферативный потенциал опухолевых клеток, в том числе, на фоне воздействия на них лекарственных препаратов, обладающих выраженным анти-пролиферативным эффектом.

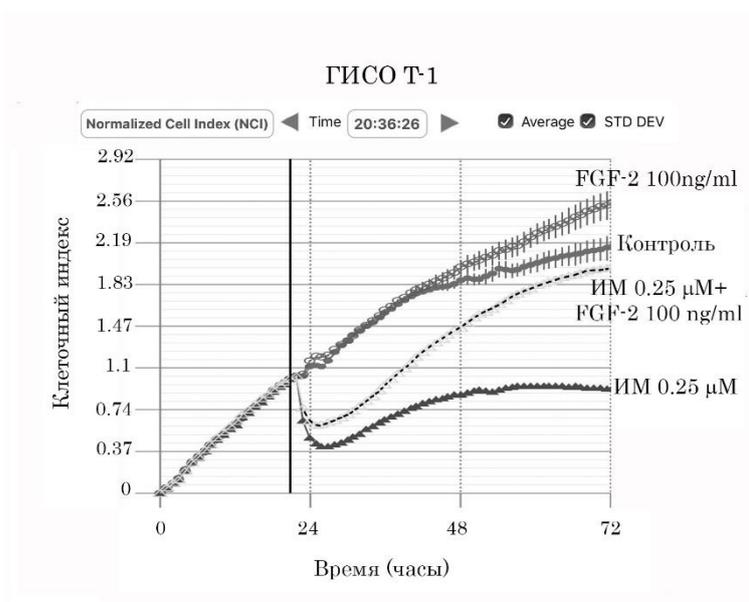


Рисунок 7 – Анализ пролиферативной активности ИМ-чувствительных (ГИСО Т-1) преинкубированных FGF-2 (100 нг/мл) в присутствии либо отсутствии ИМ в концентрации 0,25  $\mu\text{M}$  в течение 72 ч.

Эти данные коррелировали с результатами колориметрического MTS-теста, показавшими 1,5-кратное увеличение значений  $\text{IC}_{50}$  для ИМ при добавлении в культуру клеток экзогенного FGF-2. Важно, преинкубация клеток ГИСО с FGF-2 в течение 2 недель приводило к еще более выраженному стимулирующему пролиферативному эффекту и повышала жизнеспособность клеток в  $\sim 4,6$  раза (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительные значения  $\text{IC}_{50}$  для ИМ в ИМ-чувствительных (ГИСО Т-1), преинкубированных с FGF-2 (100 нг/мл) в течение 48 часов

	ИМ	ИМ+FGF-2	Кратность	Условия
$\text{IC}_{50}$ (нМ)	61,9 $\pm$ 2,7	93 $\pm$ 5,2	1,5	-
	61,9 $\pm$ 2,7	285,2 $\pm$ 46,3	4,6	Преинкубация с FGF-2 (14 дней)

Внесение ИМ в культуру ГИСО Т-1 приводило к снижению интенсивности окрашивания красителя кристаллического фиолетового по сравнению с контролем. Сокультивирование клеток ГИСО Т-1 с ИМ и FGF-2 достоверно увеличивало интенсивность окрашивания клеток красителем по сравнению с ГИСО Т-1, инкубированными с ИМ в отсутствие FGF-2 (Рисунок 8 А и Б).

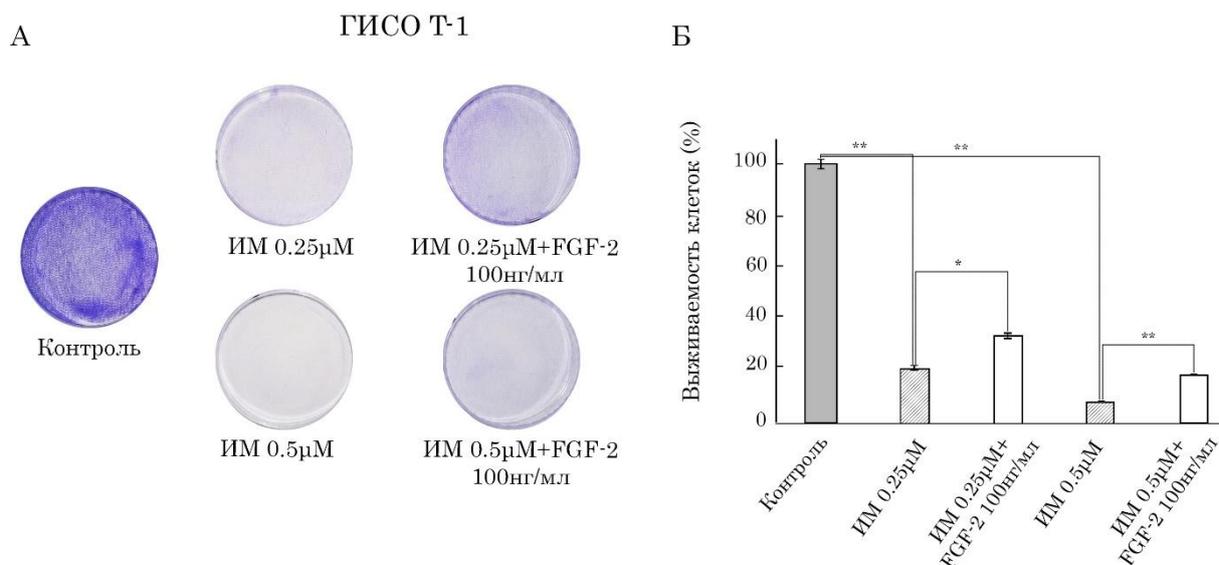


Рисунок 8 – Окрашивание кристаллическим фиолетовым культур ИМ-чувствительных клеток линии ГИСО Т-1, инкубированных с ИМ отдельно, либо в комбинации с FGF-2 в течение 72 ч.: А – микрофотография чашек Петри, Б – Выживаемость клеток, в %

Аналогичным образом, результаты оценки апоптоза клеток, полученные с помощью TUNEL-метода, показали, что культивирование ГИСО Т-1 с ИМ приводит к увеличению числа TUNEL-позитивных (т.е. апоптозных) клеток (Рисунок 9).

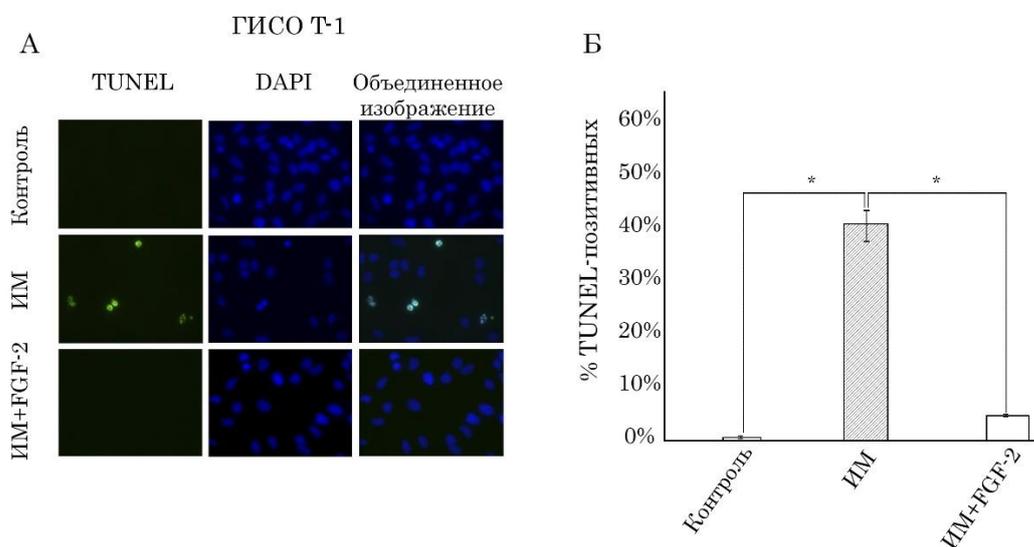
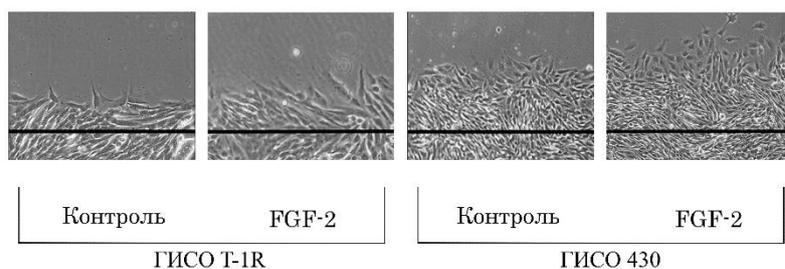


Рисунок 9 – Микрофотографии TUNEL-метода в ИМ-чувствительных клетках: А – ГИСО Т-1, инкубированные ИМ отдельно либо в присутствии FGF-2 (100нг/мл) в течение 72 ч., Б – Количественное определение TUNEL-позитивных клеток в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т-1, инкубированные с ИМ отдельно либо в присутствии FGF-2 (100 нг/мл) в течение 72 ч.

В то же время, внесение FGF-2 в культуру на фоне воздействия ИМ приводило к значимому снижению количеств апоптотных клеток. Таким образом, присутствие FGF-2 лиганда во внеклеточной среде оказывает выраженный протективный эффект в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО, находящихся под воздействием ИМ, препятствуя их массовой гибели и поддерживая их высокий пролиферативный потенциал.

В дальнейшем была изучена способность FGF-2 модулировать миграционные и инвазивные характеристики ИМ-резистентных клеток ГИСО (ГИСО T-1R и ГИСО 430). Внесение FGF-2 в культуру ИМ-резистентных клеточных линий ГИСО приводило к увеличению их миграционной активности. На репрезентативных микрофотографиях клеточного монослоя через 5 дней после начала инкубации клеток ГИСО T-1R и ГИСО 430 была обнаружена разница в площади царапин по сравнению с контролем (Рисунок 10).

А.



Б.

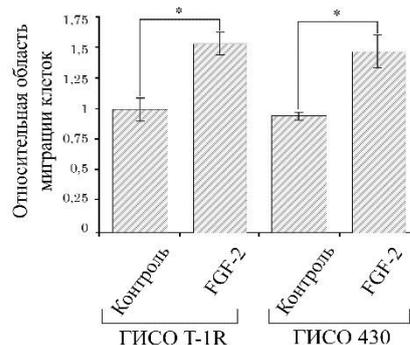


Рисунок 10 – Репрезентативные изображения заживления ран ИМ-резистентных клеток ГИСО: А – ГИСО T-1R и ГИСО 430 проинкубированные FGF-2 (100 нг/мл) в течение 5 дней, Б – Область миграции клеток ГИСО

Усиление миграционной активности ИМ-резистентных клеток ГИСО (T-1R и 430) при инкубации с FGF-2 было подтверждено увеличением количеств клеток, мигрировавших через полупроницаемые вставки соответствующих камер. Действительно, внесение FGF-2 в культуру ГИСО T-1R приводило к значительному увеличению количества мигрирующих клеток. Аналогичная (но менее выраженная тенденция) наблюдалась и в отношении клеток ГИСО 430 (Рисунок 11 А, Б).

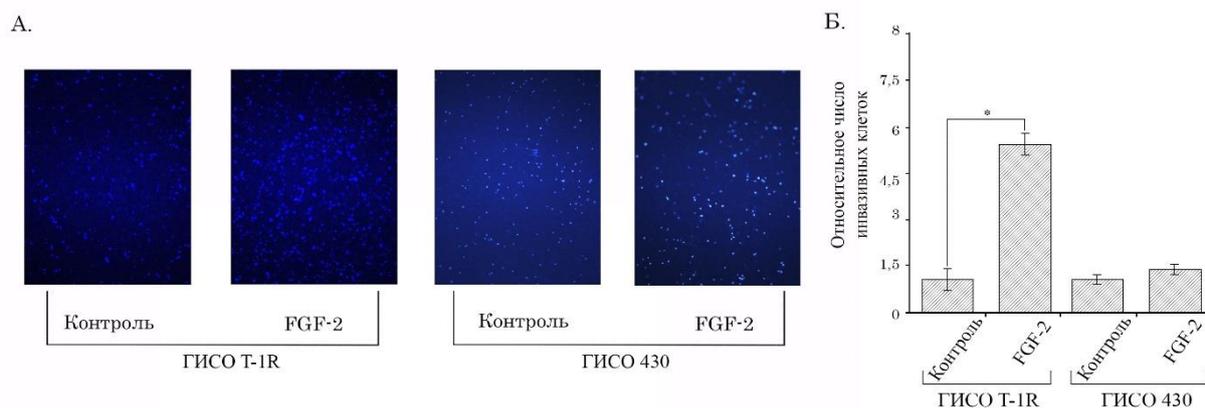


Рисунок 11 – Оценка инвазии ИМ-резистентных клеток ГИСО: А – ГИСО Т-1R и ГИСО 430 проинкубированные FGF-2 (100 нг/мл) в течение 5 дней, Б – Число инвазивных клеток

Таким образом, было показано, что FGF-2 лиганд стимулирует процессы миграции и инвазии опухолевых клеток ГИСО, что доказывает важную патогенетическую роль FGF-2 лиганда и активации FGF-сигнального пути в прогрессировании ГИСО.

Принимая во внимание полученные нами данные, свидетельствующие о способности ИМ стимулировать продукцию FGF-2 опухолевыми клетками, на заключительном этапе исследований были проведены эксперименты с использованием анти-FGF-2 НАТ. Было показано, что внесение НАТ в культуру ИМ-резистентных клеток ГИСО (ГИСО Т-1R) приводило к значительному снижению способности клеток к инвазии (Рисунок 12 А, Б). Было также отмечено незначительное, но статистически значимое снижение скорости инвазии ИМ-резистентными ГИСО (ГИСО 430) при одновременном внесении ИМ и НАТ по сравнению с контролем (Рисунок 12 В, Г).

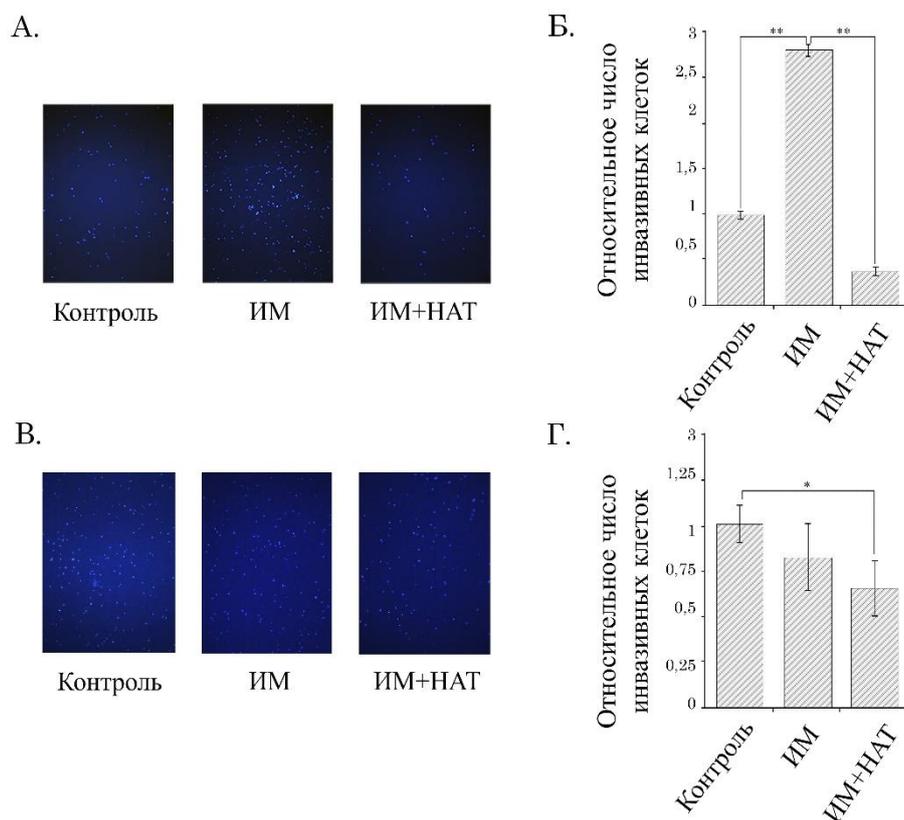


Рисунок 12 – Инвазия ИМ-резистентных клеток ГИСО: А – ГИСО Т-1R проинкубированные ИМ (1 мкмоль/л), и ИМ в комбинации с нейтрализующими анти-FGF-2 АТ (20 мкг/мкл), Б – Число инвазивных клеток ГИСО Т-1R, В – ГИСО 430, проинкубированные ИМ (1 мкмоль/л), и ИМ в комбинации с нейтрализующими анти-FGF-2 АТ (20 мкг/мкл), Г – Число инвазивных клеток ГИСО 430

Аналогичные результаты были обнаружены в тесте заращения раны. После нанесения царапины на монослой клеток было отмечено усиление их миграции после внесения ИМ в клеточную культуру, в то время как в присутствии НАТ данная способность ИМ существенным образом снижалась (Рисунок 13 А, Б). В отличие от этого, ИМ ингибировал миграцию клеток линии ГИСО 430, но тем не менее, более выраженное угнетение данной способности было отмечено в культурах, инкубированных с ИМ в комбинации с НАТ (Рисунок 13 В,Г).

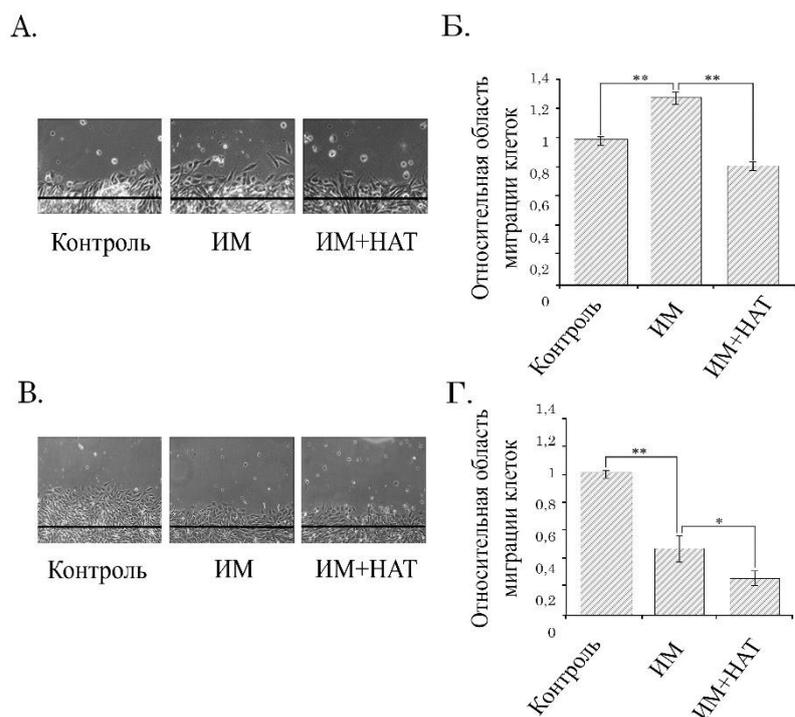


Рисунок 13 – Результаты заживления ран ИМ-резистентных клеток ГИСО после культивирования с ИМ (1 мкмоль/л) отдельно, и в комбинации с нейтрализующими анти-FGF-2 АТ (20 мкг/мл): А – Клеточная линия ГИСО T-1R, Б – Количественный анализ площади раны ГИСО T-1R после внесения ИМ, в комбинации с нейтрализующими анти-FGF-2 АТ, В – Клеточная линия ГИСО 430, Г – Количественный анализ площади раны ГИСО 430 после внесения ИМ, в комбинации с нейтрализующими анти-FGF-2 АТ

Таким образом, был выявлен новый молекулярный механизм развития вторичной резистентности ГИСО к ИМ. Этот механизм заключался в способности ИМ индуцировать изменения секрета опухолевых клеток, проявившимися гиперпродукцией FGF-2 лиганда. Это инициировало активацию FGF-сигнального пути и способствовало формированию опухолевыми клетками агрессивного фенотипа, заключающегося в усилении их способности к инвазии и миграции, а также блокированию программы апоптоза под действием ИМ. На наш взгляд, эти данные имеют важное клинико-патогенетическое значение, так как показывают, что в случае возникновения резистентности ГИСО к ИМ в результате активации FGF-сигнального пути, данный таргетный препарат не только не будет оказывать своего терапевтического эффекта, но и может ускорить прогрессирование заболевания за счет способности усиливать процессы миграции и инвазии опухолевых клеток.

## ВЫВОДЫ

1. Продолжительное (> 6 месяцев) воздействие иматиниба мезилата (ИМ) на клетки гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) индуцирует развитие вторичной резистентности опухолевых клеток к данному таргетному препарату и сопровождается активацией FGF-сигнального пути.

2. Ингибирование КИТ-сигнального пути в клетках ГИСО, резистентных к действию таргетного препарата ИМ, приводит к гиперпродукции хемокинов (FGF-2, GRO, MCP-3, VEGF, IL-6 и др.). Вышеописанные изменения не зависят от мутационного статуса *c-KIT* в ИМ-резистентных ГИСО.

3. Вторичная резистентность ГИСО к ИМ может являться следствием аутокринной активации FGF-сигнального пути, сопровождающейся гиперэкспрессией FGFR1/2 и гиперпродукцией FGF-2 лиганда.

4. Присутствие FGF-2 лиганда во внеклеточном пространстве ГИСО препятствует реализации цитотоксического и анти-пролиферативного эффекта ИМ, а антитело-опосредованная нейтрализация данного лиганда эффективно ингибирует активацию FGF-сигнального пути в ГИСО и вызывает их ресенситизацию к данному таргетному препарату.

5. Активация процессов инвазии и миграции в ИМ-резистентных ГИСО является следствием компенсаторной активации FGF-сигнального пути, развившейся на фоне ингибирования КИТ-сигнального пути, а ингибирование FGF-сигнального пути с помощью селективных FGFR-ингибиторов или нейтрализующих анти-FGF-2 антител существенным образом ингибирует процессы подвижности ИМ-резистентных ГИСО.

### Практические рекомендации

Обнаруженный новый механизм резистентности ГИСО к таргетным препаратам, заключающееся в активации FGF-опосредованного сигнального пути, будет способствовать внесению корректив в схемы терапии пациентов с ГИСО, прогрессирующих на фоне проводимой им таргетной терапии ИМ. В частности, это позволяет рассмотреть возможность для проведения исследований на предмет клинической эффективности комбинированного применения вышеуказанных ингибиторов FGF- и КИТ-сигнальных путей в лечении пациентов с ГИСО, прогрессирующими на фоне проводимой им таргетной терапии ИМ вследствие активации в опухолевых клетках FGF-сигнального пути.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

На основании полученных результатов, свидетельствующих об аутокринной активации FGF-сигнального пути в ГИСО, перспективными будут являться исследования по изучению характера лиганд-рецепторного взаимодействия между FGF-2 и одним из 4-х типов рецепторов FGFR в клетках ГИСО. После получения данных по этому научному вопросу станет возможным изучение активности селективных ингибиторов FGF-сигнального пути на процессы активации ИМ-резистентных ГИСО.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Inhibition of FGFR-signalling pathway modulates sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to imatinib / S. Boichuk, A. Galembikova, F. Bikinieva [et al.] // 12th Annual Meeting of the 2019 Korean Society of Medical Oncology & 2019 International Conference. – Seoul, 2019.- Pp.97.
2. Аутокринная активация FGF-сигнального пути как альтернативный путь вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к иматинибу / С.В. Бойчук, А.Р. Галембикова, Ф.Ф. Бикиниева и др. // Успехи молекулярной онкологии. – 2019. - Т.6, №4. – С.63.
3. Imatinib mesylate (IM) promotes malignant behaviour of IM-resistant gastrointestinal stromal tumours (GISTs) via activation of FGF-signaling / S. Boichuk, A. Galembikova, F. Bikinieva [et al.] // Molecular analysis for precision oncology. – 2020. - Vol. 31, Suppl. 5. – Pp.1230.
4. **Inhibition of AKT-Signaling Sensitizes Soft Tissue Sarcomas (STS) and Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) to Doxorubicin via Targeting of Homology-Mediated DNA Repair/ S. Boichuk, F. Bikinieva, A. Galembikova [et al.]. – Текст: электронный // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, No. 1. – Pp. 352.**
5. **Inhibition of FGF2-mediated signaling in GIST—promising approach for overcoming resistance to Imatinib / S. Boichuk, A. Galembikova, F. Bikinieva [et al.] // Cancers. – 2020. – Vol. 12, No. 6. – Pp. 1674.**
6. **Inhibition of FGFR2-Signaling Attenuates a Homology-Mediated DNA Repair in GIST and Sensitizes Them to DNA-Topoisomerase II Inhibitors / S. Boichuk, A. Galembikova, F. Bikinieva [et al.]. – Текст: электронный // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, No. 1. – Pp. 352.**

7. Inhibition of FGFR2-signaling sensitizes imatinib resistant gastrointestinal stromal tumor to DNA-topoisomerase II inhibitor by attenuating homology mediated DNA repair / S. Boichuk, P. Dunaev, F. Bikinieva [et al.] // 2nd UK-Russia Young Medics Conference. – Cambridge, 2020.- Pp.24-25.
8. Бикиниева Ф.Ф. Исследование роли интерлейкин 6-зависимой активации STAT3-сигнального пути в резистентности ГИСО к таргетному препарату иматинибу / Ф.Ф. Бикиниева // Сборник тезисов 27-й Международной научно-практической конференции молодых учёных. – Казань, 2021. – С. 1130-1131.
9. **Infigratinib (BGJ 398), a Pan-FGFR inhibitor, targets P-glycoprotein and increases chemotherapeutic-induced mortality of multidrug-resistant tumor cells / S. Boichuk, P. Dunaev, F. Bikinieva [et al.]. – Текст: электронный //Biomedicines. – 2022. – Vol. 10, No. 3. – Pp. 601.**
10. Патент № 2765545 С1 2-Амино-1-бензамидо-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид, вызывающий нарушения фаз клеточного цикла и проявляющий цитотоксическую активность в отношении сарком мягких тканей и гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО): № 2020133367: заявл.12.10.2020: опубл. 01.02.2022 / С. С. Зыкова, С. В. Бойчук, Ф.Ф. Бикиниева [и др.]; заявитель, патентобладатель ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.
11. **Unraveling the Mechanisms of Sensitivity to Anti-FGF Therapies in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) Lacking Secondary KIT Mutations / S. Boichuk, P. Dunaev, F. Bikinieva [et al.]. – Текст: электронный // Cancers. – 2023. – Vol. 15, No. 22. – Pp. 5354.**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ – антитела

ГИСО – гастроинтестинальные стромальные опухоли

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИМ – иматиниба мезилат

ИТК – ингибитор тирозинкиназ

киРНК – короткие интерферирующие РНК