

На правах рукописи

Дунаев Павел Дмитриевич

**МЕХАНИЗМЫ ВТОРИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТАРГЕТНЫМ
ПРЕПАРАТАМ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Казань – 2025

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

Научный консультант:

Бойчук Сергей Васильевич – доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент АН РТ

Официальные оппоненты:

Афанасьева Галина Александровна – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии имени академика А.А. Богомольца Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рукша Татьяна Геннадьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кирсанов Кирилл Игоревич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией канцерогенных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Защита состоится «___» _____ 2025 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 «___» _____ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Радченко О.Р.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) представляют собой злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), имеющие мезенхимальное происхождение. ГИСО развиваются из интерстициальных клеток Кахаля, обладающих пейсмейкерной активностью и задающих ритм сокращений (перистальтики) полых органов ЖКТ (Hirota S. et al., 1998; Jakhetiya A., 2016). ГИСО составляют до 3% всех злокачественных опухолей ЖКТ. Типичной локализацией ГИСО является желудок (60-70%), тонкая кишка (25-35%), толстая и прямая кишка (5%). В редких случаях опухоль может выявляться в пищеводе, брыжейке, сальнике, забрюшинном пространстве. Средний возраст больных с ГИСО составляет 55-60 лет (Demetri G. D. et al., 2007; Королева А.М. и соавт., 2019).

Главным механизмом развития ГИСО являются активирующие мутации *KIT* или *PDGFRA*. Данные мутации являются взаимоисключающими. В большинстве случаев в клетках ГИСО отмечается мутация *KIT* (78,5%). Мутация *PDGFRA* отмечается в 7,5% случаев ГИСО. В некоторых случаях ГИСО не обнаруживаются мутации *KIT* или *PDGFRA*, такой вариант ГИСО обозначается как «ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа» (Corless C.L. et al., 2008; Ахметзянов Ф. Ш. и соавт., 2019). За счет активирующих мутаций *KIT* или *PDGFRA* возникает гиперактивация соответствующих тирозинкиназных рецепторов с-KIT (CD117, рецептор фактора роста стволовых клеток – SCF) или PDGFR α (α -рецептор тромбоцитарного фактора роста – PDGF). В результате в клетках ГИСО возникает лиганд-независимая активация внутриклеточных сигнальных каскадов (JAK-STAT; RAS-RAF-MAPK; PI3K-AKT-mTOR), обеспечивающий жизнеспособность, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток (Liu P. et al., 2020; Strauss G., George S., 2025).

В качестве первой линии терапии пациентов с ГИСО используется таргетный препарат иматиниба мезилат (ИМ), являющийся неселективным ингибитором тирозинкиназных рецепторов с-KIT и PDGFR α . Тем не менее, через 1,5- 2 года после начала таргетной терапии более чем у 50% пациентов с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими формами ГИСО развивается вторичная (приобретенная) резистентность к ИМ (Gramza A.W. et al., 2009; Zhou S. et al., 2024).

После развития резистентности ГИСО к ИМ, пациентам назначаются таргетные препараты второй и третьей линии – сунитиниб (СУ) и регорафениб (РЕГО), соответственно. СУ и РЕГО представляют собой мультикиназные ингибиторы, блокирующие рецепторы с-KIT и PDGFR α , а также рецепторы

фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1-3) и другие рецепторные и нерецепторные тирозинкиназы. Тем не менее, на фоне терапии СУ и РЕГО у больных возникают тяжелые побочные эффекты (например, гепатотоксичность, сердечная недостаточность, геморрагический синдром и др.). Кроме того, в клетках ГИСО развивается вторичная резистентность к указанным таргетным препаратам (Boichuk S. et al., 2014; Blay J.Y. et al., 2021; Lorenc P. et al., 2024).

В настоящее время показана важная роль FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в патогенезе различных злокачественных новообразований: рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка, рак толстой кишки, рак печени и желчевыводящих путей (Fukumura D. et al., 2018; Miao J.L. et al., 2020; Peng M. et al., 2023). Показано, что за счет активации FGFR- и VEGFR-сигналинга развивалась вторичная резистентность опухолевых клеток к таргетным и химиопрепаратам (Apte R.S. et al., 2019; Liu D. et al., 2022; Ghalehbandi S. et al., 2023). Пр продемонстрирована активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО на фоне развития их вторичной резистентности к ИМ (Бойчук С.В., 2017; Галембикова А.Р., Бойчук С.В., 2018). Тем не менее, роль фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) и его рецепторов FGFR1-2, а также фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и его рецепторов VEGFR1-2 в механизмах резистентности клеток ГИСО к таргетным препаратам остаются не изученными. Вышеизложенное обуславливает актуальность настоящего диссертационного исследования по изучению роли FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в механизмах резистентности клеток ГИСО к таргетным препаратам.

Степень разработанности темы исследования

ГИСО считаются одним из первых примеров успешной таргетной терапии солидных опухолей ингибиторами тирозинкиназ. Таргетный препарат ИМ был синтезирован в 1999г. для ингибирования тирозинкиназы BCR-ABL и успешно применен для терапии пациентов с хроническим миелолейкозом. В 2000 г. ИМ был впервые применен для терапии метастатической формы ГИСО, в клетках которой была обнаружена активирующая мутация *KIT*. Лечение оказалось успешным, ИМ индуцировал цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении клеток ГИСО. В 2002 году ИМ зарегистрирован в качестве препарата первой линии таргетной терапии ГИСО, имеющих мутации *KIT* или *PDGFRA* (Joensuu H. et al., 2001; van Oosterom A.T. et al., 2002).

Вследствие развития резистентности ГИСО к ИМ, в 2000-е годы были зарегистрированы препараты второй линии терапии – сунитиниб и третьей линии терапии – регорафениб. Тем не менее, продемонстрировано развитие вторичной резистентности ГИСО к сунитинибу и регорафенибу (Boichuk S. et al., 2014; Blay J.Y. et al., 2021; Lorenc P. et al., 2024). Механизмы вторичной

резистентности клеток ГИСО к указанным таргетным препаратам остаются до конца не изученными. В частности, отсутствует информация о взаимосвязи между FGFR- и VEGFR-сигнальными путями в ИМ-резистентных клетках ГИСО. Вышеизложенное явилось основанием для проведения настоящего диссертационного исследования по изучению механизмов вторичной резистентности клеток ГИСО к таргетным препаратам.

Цель исследования

Изучить механизмы активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в гастроинтестинальных стромальных опухолях (ГИСО) и их роль в формировании вторичной резистентности к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ киназного профиля иматиниб-чувствительных и иматиниб-резистентных клеточных линий ГИСО.
2. Исследовать механизмы активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО и охарактеризовать его роль в формировании вторичной резистентности опухолевых клеток к таргетному препарату иматинибу.
3. Охарактеризовать структурную и функциональную взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами c-KIT и FGFR1-2 в иматиниб-резистентных клетках ГИСО и оценить возможность модуляции их чувствительности к данному таргетному препарату посредством ингибирования FGFR-сигнального пути.
4. Изучить механизмы активации FGFR-сигнального пути в иматиниб-резистентных ГИСО со сниженной экспрессией KIT и оценить возможность модуляции их чувствительности к селективным ингибиторам FGFR-сигнального пути.
5. Исследовать роль фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) в механизмах активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО и провести анализ их чувствительности к VEGFR-ингибиторам.
6. Изучить структурную и функциональную взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в иматиниб-резистентных клетках ГИСО и охарактеризовать их чувствительность к VEGFR-ингибиторам посредством ингибирования FGFR-сигнального пути.

Научная новизна

Впервые установлено, что в процессе развития вторичной резистентности к таргетному препарату иматинибу в клетках ГИСО происходит изменение киназного профиля, заключающегося в снижении уровней экспрессии общей и

фосфорилированной форм с-KIT, что сопровождается утратой молекулярной мишени для иматиниба. Кроме этого, в иматиниб-резистентных клетках ГИСО обнаружены признаки активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что проявлялось повышением экспрессии рецепторных (FGFR1-2, VEGFR1-2) и нерецепторных (STAT1, MAPK- и AKT) тирозинкиназ. Впервые обнаружено, что активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, возникающая на фоне ингибирования KIT-сигналинга, происходит аутокринным путем и является результатом гиперпродукции FGF-2 и VEGF-A лигандов опухолевыми клетками.

Впервые была продемонстрирована структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами с-KIT и FGFR1-2 в клетках ГИСО с признаками вторичной резистентности к иматинибу. В связи с этим, была показана способность селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) восстанавливать чувствительность иматиниб-резистентных клеток ГИСО к иматинибу. Также впервые было продемонстрировано, что пролиферация иматиниб-резистентных клеток ГИСО происходит, главным образом, за счет активации MAPK-киназного каскада.

Впервые было обнаружено, что на фоне иматиниб-опосредованного ингибирования тирозинкиназного рецептора с-KIT развивается гетерогенность ГИСО с формированием клонов опухолевых клеток, имеющих различный уровень экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT. В KIT-негативных клетках ГИСО отмечается гиперактивация FGFR-сигнального пути, что сопровождается повышением их чувствительности к селективным ингибиторам рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547 и TAS-120). Впервые было показано, что FGF-2 лиганд индуцирует продукцию VEGF-A в иматиниб-чувствительных и резистентных клетках ГИСО. FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A лиганда была значимо более выражена в клетках ГИСО с признаками вторичной резистентности к иматинибу. Впервые была продемонстрирована структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО с признаками вторичной резистентности к иматинибу. В связи с этим, впервые была показана способность селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) восстанавливать чувствительность иматиниб-резистентных клеток ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути (сунитиниб, регорафениб).

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные в диссертационной работе результаты позволяют углубить современные представления о механизмах резистентности ГИСО к таргетным препаратам. В отсутствии вторичных мутаций *KIT* в клетках ГИСО на фоне таргетной терапии иматинибом развивается активация FGFR- и VEGFR-

сигнальных путей, сопровождаемая снижением KIT-сигналинга. Следовательно, в иматиниб-резистентных клетках ГИСО отмечается переключение киназно-опосредованного сигналинга, регулирующего процессы жизнеспособности, пролиферации и апоптоза. Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО обусловлена аутокринной продукцией FGF-2 и VEGF-A лигандов. Важно отметить, что VEGF-A-индуцированная активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО является вторичным событием, обусловленным гиперпродукцией FGF-2 лиганда и последующей активацией FGFR-сигналинга.

Полученные результаты могут способствовать разработке новых стратегий таргетной терапии пациентов с ГИСО, у которых резистентность к иматинибу возникла в отсутствии вторичных мутаций *KIT*. В частности, наличие в иматиниб-резистентных клетках ГИСО признаков активации FGFR-сигнального пути является предпосылкой для возможной активации VEGFR-сигнального пути в опухолевых клетках и обоснованием для назначения препаратов второй и третьей линии таргетной терапии – сунитиниба и регорафениба, эффективно ингибирующих VEGFR-сигналинг. В качестве таргетной терапии иматиниб-резистентных ГИСО с отсутствием вторичных мутаций *KIT* и обнаруженными признаками активации FGFR-сигнального пути может быть рассмотрена комбинация иматиниба с селективными ингибиторами FGFR-рецепторов (инфигратиниб).

Полученные в диссертационной работе результаты могут быть использованы для уточнения прогностических признаков прогрессирования ГИСО и развития их вторичной резистентности к иматинибу. В частности, обнаруженная в иматиниб-резистентных ГИСО гиперэкспрессия FGF-2 и VEGF-A лигандов может быть рассмотрена в качестве маркера формирующейся резистентности опухоли к данному таргетному препарату и являться основанием для проведения повторного молекулярно-генетического исследования опухолевого материала с целью последующей коррекции таргетной терапии.

Методология и методы исследования

В диссертационной работе использовался ряд современных методов молекулярной биологии, биохимии и генетики: культивирование клеток ГИСО, оценка их жизнеспособности (МТТ-тест) и пролиферативной активности; изучение синергизма комбинации таргетных препаратов в отношении клеток ГИСО; анализ экспрессии белков методом иммуноблоттинга и их взаимодействия с помощью ко-иммунопреципитации; оценка экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции; анализ вторичных мутаций *KIT* в клетках ГИСО с помощью секвенирования по методу Сэнгера;

иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназных рецепторов в клетках ГИСО; нокдаун гена KIT с помощью трансфекции короткой интерферирующей РНК; исследование концентрации FGF-2 и VEGF-A в супернатантах ГИСО методом иммуноферментного анализа.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-34-01-005, № 17-04-00158, № 20-015-00034) и грантов Российского научного фонда (№ 14-15-00342, № 20-15-00001).

Положения, выносимые на защиту

1) Развитие вторичной резистентности клеток ГИСО к таргетному препарату иматинибу сопровождается изменением их киназного профиля, проявляющегося снижением уровня экспрессии тирозинкиназы c-KIT и активацией FGFR- и VEGFR-сигнальных путей.

2) Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО происходит аутокринным путем и обусловлена гиперпродукцией FGF-2 и VEGF-A лигандов опухолевыми клетками на фоне ингибирования в них KIT-сигналлинга.

3) VEGF-A-индуцированная активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО с фенотипическими признаками резистентности к иматинибу является вторичным событием, обусловленным гиперпродукцией FGF-2 лиганда и последующей активацией FGFR-сигналлинга.

Степень достоверности результатов

Механизмы резистентности ГИСО к таргетным препаратам изучались с использованием четырех сертифицированных лабораторных клеточных линий указанных опухолевых клеток: ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R, ГИСО T1-IM-R-2, ГИСО 430. Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз. За счет анализа большого фактического материала и применения современных методов исследования были сформулированы выводы, соответствующие поставленным задачам. Для статистической обработки данных использовалось современное программное обеспечение GraphPad Prizm 7 (GraphPad Software, США) и NIH Image J software version 1.49 (National Institutes of Health, США). Первичная документация и материалы статистической обработки проверены и признаны достоверными. Полученные результаты отражены в таблицах и рисунках, наглядно показывающих степень обоснованности, достоверности и доказательности выводов, практических рекомендаций и основных положений, сформулированных в диссертации.

Апробация работы

Основные результаты исследования представлены на конференциях и конгрессах: 3-й и 4-й Всероссийский научный медицинский форум студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2016, 2017); 22-я и 23-я Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии» (Санкт-Петербург, 2016, 2017); 52-я Ежегодная научная конференция Европейского общества клинических исследований (Барселона, 2018); Ежегодная научная конференция Американского общества клеточной биологии (Сан-Диего, 2018); 5-я Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии – 2019» (Судак, 2019); 12-я Ежегодная международная конференция общества клинических онкологов (Сеул, 2019); Всероссийская конференция с международным участием «Онкология 21 века – инновации медицинской науки в практическом здравоохранении» (Казань, 2021); Всероссийская конференция «Поволжский онкологический форум» (Казань, 2022); 2-я, 5-я, 7-я, 8-я, 9-я Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (г. Москва, 2016, 2019, 2022, 2023, 2024).

Апробация работы проведена на заседании научно-проблемной комиссии «Фундаментальные медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол №2 от 08 апреля 2025 г.).

Результаты диссертационного исследования внедрены: а) в учебный процесс кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России; кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (г. Пермь); б) в научно-исследовательскую работу лаборатории цитогенетики НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (г. Москва).

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертация посвящена изучению механизмов резистентности клеток ГИСО к таргетным препаратам, что соответствует п. 1, 2, 6, 11 паспорта научной специальности 3.3.3. – Патологическая физиология (медицинские науки).

Личный вклад автора

Автор самостоятельно проанализировал отечественные и зарубежные литературные данные по проблеме, определил дизайн необходимых экспериментов и сформулировал концепцию диссертационной работы. Автором были освоены современные методы патологической физиологии, молекулярной

биологии, биохимии и генетики для изучения механизмов резистентности клеток ГИСО к таргетным препаратам. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования. Анализ и статистическая обработка полученных данных также осуществлена непосредственно автором. Автором были сформулированы выводы, практические рекомендации и основные положения, выносимые на защиту.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ по специальности 3.3.3. – Патологическая физиология, в том числе 15 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и входящих в международные базы цитирования (Scopus, Web of Science), из которых 2 – в журналах ВАК (K1, K2) и 9 – в журналах Scopus и Web of Science (Q1, Q2).

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов), заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, списка иллюстративного материала. Работа изложена на 268 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 таблицами и 60 рисунками. Список литературы включает 247 источников, из них 26 отечественных и 221 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Объект и предмет исследования

Эксперименты проводились на сертифицированных лабораторных клеточных линиях ГИСО:

1) ГИСО T1 – клеточная линия ГИСО, чувствительная к ИМ, полученная из плеврального метастаза ГИСО желудка человека (Kochi Medical School, Nankoku, Kochi, Япония). В клетках ГИСО T1 присутствует первичная гетерозиготная мутация в виде делеции V570-Y578 в 11 экзоне *KIT* (Taguchi T. et al., 2002).

2) ГИСО T1-IM-R – клеточная линия ГИСО, имеющая вторичную резистентность к ИМ, не связанную с возникновением вторичных мутаций *KIT*. В клетках ГИСО T1-IM-R отмечается первичная гетерозиготная мутация в виде делеции V570-Y578 в 11 экзоне *KIT*, вторичные мутации *KIT* отсутствуют.

Клеточная линия была получена в лаборатории кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Boichuk S. et al., 2017).

3) ГИСО T1-IM-R-2 – *KIT*-негативная ИМ-резистентная клеточная линия ГИСО, полученная в лаборатории кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России путем клонирования клеточной линии ГИСО T1-IM-R (Boichuk S. et al., 2023).

4) ГИСО 430 – клеточная линия ГИСО, имеющая вторичную резистентность к ИМ за счет возникновения вторичной мутации *KIT*. Клеточная линия ГИСО 430 была получена из ГИСО желудка человека, прогрессирующей на фоне терапии иматинибом (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, США). В клетках ГИСО 430 отмечается первичная гетерозиготная мутация в виде делеции V560_L576del в 11 экзоне *KIT* и вторичная гетерозиготная миссенс-мутация V654A в 13 экзоне *KIT* (Bauer S. et al., 2007).

Для культивирования клеточных линий ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 использовалась питательная среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия), в которую была добавлена 15% эмбриональная телячья сыворотка (Biosera, Южная Америка), антибиотики пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия). Для культивирования клеточной линии ГИСО 430 использовалась питательная среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия), в которую была добавлена 15% эмбриональная телячья сыворотка (Biosera, Южная Америка), 1% экстракт гипофиза крупного рогатого скота (Bovine Pituitary Extract – Thermo Fisher Scientific, США), 0,5% питательная добавка MTO+ Serum extender (Discovery Labware Inc., США), антибиотики пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия). Клеточные линии ГИСО культивировались в пластиковых чашках Петри диаметром 100 мм (Servicebio, Китай), имеющих специальное адгезивное покрытие для прикрепления клеток. Чашки Петри с клетками ГИСО помещались в CO₂-инкубаторы (Lamsystems, Россия; Binder, США), где поддерживались оптимальные условия: $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$, концентрация CO₂ – 5%, относительная влажность воздуха 95-96%.

Анализ цитотоксической активности таргетных препаратов в отношении клеток ГИСО и синергизма их комбинаций

ГИСО засевали в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов (Servicebio, Китай) и культивировали в присутствии различных концентраций таргетных препаратов ИМ, СУ, РЕГО, BGJ398, AZD4547, TAS-120 в течение 72 часов. Далее выполнялся колориметрический МТТ-тест с использованием реагентов MTS (Promega, Madison, США) и феназинметосульфат (PMS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, США). Оптическую плотность культуральной среды

анализировали с помощью планшетного фотометра MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. На основании результатов МТТ-теста были определены эффективные концентрации таргетных препаратов, вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC₅₀) клеток ГИСО с использованием компьютерной программы IC 50 Tool Kit (<http://ic50.tk/>, дата обращения 12.05.2025).

Для вычисления показателя синергизма комбинаций препаратов (ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120, BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО) использовалась компьютерная программа Synergy Finder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html>, дата обращения 12.05.2025). Интерпретация показателей синергизма: > 10 (синергетическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < - 10 (антагонистическое взаимодействие) (Yadav B., et al. 2015).

Оценка пролиферации клеток ГИСО

Клетки ГИСО засеивали в лунки кассет E-Plate L8 PET (ACEA Biosciences, США), которые устанавливались в прибор iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США). Клетки ГИСО культивировали в присутствии таргетных препаратов и их комбинаций (ИМ, СУ, РЕГО, BGJ398, AZD454, TAS-120; ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120, BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО). С помощью программного обеспечения RTCA Version 1.0 (ACEA Biosciences, США) осуществлялась визуализация кривой пролиферации клеток ГИСО на экране компьютера.

Пролиферативная активность клеток ГИСО оценивалась также с помощью окрашивания чашек Петри фиксирующим раствором кристаллического фиолетового с последующим фотографированием чашек и исследованием оптической плотности раствора с помощью планшетного фотометра MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 540 нм.

Анализ экспрессии белков ГИСО методом иммуноблоттинга и их взаимодействия методом ко-иммунопреципитации

Клеточные лизаты ГИСО готовили с использованием RIPA-буфера с добавлением ингибиторов протеаз – protease inhibitor cocktail solution и PMSF (Sigma-Aldrich, США). Лизаты ГИСО загружали в лунки 10-луночного коммерческого полиакриламидного геля NuPAGE (Invitrogen, США) и выполняли вертикальный электрофорез белков при напряжении 80V. Далее осуществляли трансфер белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с последующей блокировкой мембраны (5% обезжиренное молоко или 5% бычий сывороточный альбумин) и инкубацией с соответствующими

первичными антителами (АТ). После инкубации мембраны со вторичными АТ, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, США), выполнялась детекция мембраны хемоллюминесцентным методом с использованием растворов Clarity Western ECL Substrate или Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) с помощью гель-документирующей системы Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Франция). Количественный анализ экспрессии изучаемых белков в пикселях (денситометрию) выполняли с помощью компьютерной программы NIH Image J Version 1.49 (National Institutes of Health США).

Скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 осуществлялся методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих наборов реагентов Proteome Profiler Human Phospho-Receptor tyrosine kinase Array Kit и Proteome Profiler Human Phospho-kinase Array Kit (R&D Systems, ARY003B, США).

Для изучения ко-иммунопреципитации белков готовили клеточные лизаты ГИСО с использованием ТЕВ-буфера с добавлением ингибиторов протеаз – protease inhibitor cocktail solution и PMSF (Sigma-Aldrich, США). Полученные образцы инкубировали с соответствующими преципитирующими АТ и специальными гранулами сефарозы – protein A and G Sepharose beads (Santa Cruz Biotechnology, США). В дальнейшем лизаты загружали в лунки 10-луночного коммерческого полиакриламидного геля NuPAGE (Invitrogen, США) и выполнялся вертикальный электрофорез белков, трансфер и детекция мембраны как при иммуноблоттинге (см. выше).

Иммунофлуоресцентная микроскопия клеток ГИСО

Клетки ГИСО засевали в лунки плоскодонных 6-луночных планшетов (Servicebio, Китай), в которые были заранее помещены покровные стекла, покрытые адгезивным раствором L-полилизина (Sigma-Aldrich, США). В дальнейшем клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида (Thermo Fisher Scientific, США) при комнатной t° и инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 5% козью сыворотку, 0,3% Triton X-100. В случае иммунофлуоресцентного окрашивания рецептора FGFR2 после фиксации клеток параформальдегидом выполняли их пермеабелизацию ледяным раствором 100% метанола при $t^{\circ} = -20^{\circ}\text{C}$. Далее покровные стекла с фиксированными клетками ГИСО инкубировали с соответствующими первичными АТ: FGFR1-2, Cell Signaling, США; VEGFR1, Santa Cruz Biotechnology, США; VEGFR2, Abcam, Великобритания; c-KIT, Dako, США; FGF-2, Santa Cruz Biotechnology, США. После этого выполнялась инкубация клеток ГИСО со вторичными АТ,

конъюгированными с флуорохромами Alexa Fluor 488 или TexRed (Invitrogen, США). Микроскопия клеток ГИСО осуществлялась с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX63 (Япония) при помощи программного обеспечения CellSens Dimension 1.9. Ядра клеток ГИСО визуализировали с помощью красителя DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Нокдаун *KIT* в клетках ГИСО

Для нокдауна *KIT* в клетках ГИСО использовалась соответствующая короткая интерферирующая РНК киРНК *KIT* (Dharmacon RNA Technologies, США) и реагент для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, США), которые растворяли в культуральной среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США). Нокдаун *KIT* в клетках ГИСО подтверждался методом иммуноблоттинга (по отсутствию экспрессии фосфорилированной и общей формы с-KIT) и методом полимеразной цепной реакции (по отсутствию экспрессии *KIT*).

Анализ экспрессии генов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей и вторичных мутаций *KIT* в клеточных линиях ГИСО

Выделение матричной РНК (мРНК) из клеток ГИСО осуществляли с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США), хлороформа и изопропилового спирта. Экспрессию генов FGFR-сигнального пути (*FGF-2*, *FGFR1-2*) и VEGFR-сигнального пути (*VEGF-A*, *VEGFR1-3*) исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием соответствующих праймеров (Евроген, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Амплификация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) использовалась в качестве контроля.

Для определения вторичных мутаций *KIT* осуществляли выделение ДНК из клеточной линии ГИСО T1-IM-R с помощью набора реагентов NucleoSpinTissuekit (MachereyNagel, Германия). Уровень качества подготовленной библиотеки ДНК для последующего секвенирования оценивали с помощью флуориметрической системы Qubit (ThermoFisher Scientific, США). Определение последовательности нуклеотидов *KIT* осуществлялось методом Сэнгера с помощью секвенатора Illumina MiSeq (Illumina, США) и набора реагентов TruSight™ Cancer Sequencing Panel (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка экспрессии с-KIT в клетках ГИСО методом проточной цитометрии

Клетки ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 фиксировали 4% раствором параформальдегида (Thermo Fisher Scientific, США) при комнатной t°. Далее

выполнялась пермеабелизация клеток ледяным раствором 100% метанола. После этого клетки инкубировали с первичными АТ к белку с-KIT (Cell Signaling, США) и со вторичными АТ, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, США). Флуоресценцию с-KIT анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, США) с помощью программного обеспечения BD FACSDiva, Version 7.0.

Исследование концентрации FGF-2 и VEGF-A в супернатантах ГИСО методом иммуноферментного анализа

Концентрацию FGF-2 (пг/мл) и VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью соответствующих наборов реагентов – Human FGF basic Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США) и Human VEGF-A ELISA Kit (Sigma-Aldrich, США) – в соответствии с инструкциями производителя. Детекцию образцов осуществляли с помощью планшетного фотометра MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка результатов

В представленной диссертационной работе анализировались количественные значения признаков, которые были представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. В некоторых случаях (что указано отдельно) полученные результаты приравнены в виде: среднее арифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка средней. При интерпретации полученных результатов уровень статистической значимости (p) считали равным 0,05. Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз. Для статистической обработки данных использовалось программное обеспечение GraphPad Prizm 7 (GraphPad Software, США) и NIH Image J software version 1.49 (National Institutes of Health, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Киназный профиль ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линий ГИСО

В ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1, отмечают: а) повышенная экспрессия FGF-2, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2, фосфорилированной формы белка FRS-2 (Рисунок 1); б) повышенная экспрессия VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (Рисунок 2); в) сниженная экспрессия

фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора с-KIT (Рисунок 3); г) повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (Рисунок 4). Вероятно, вследствие аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A лигандов в клетках ГИСО T1-IM-R отмечается гиперактивация JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR-сигнальных путей.

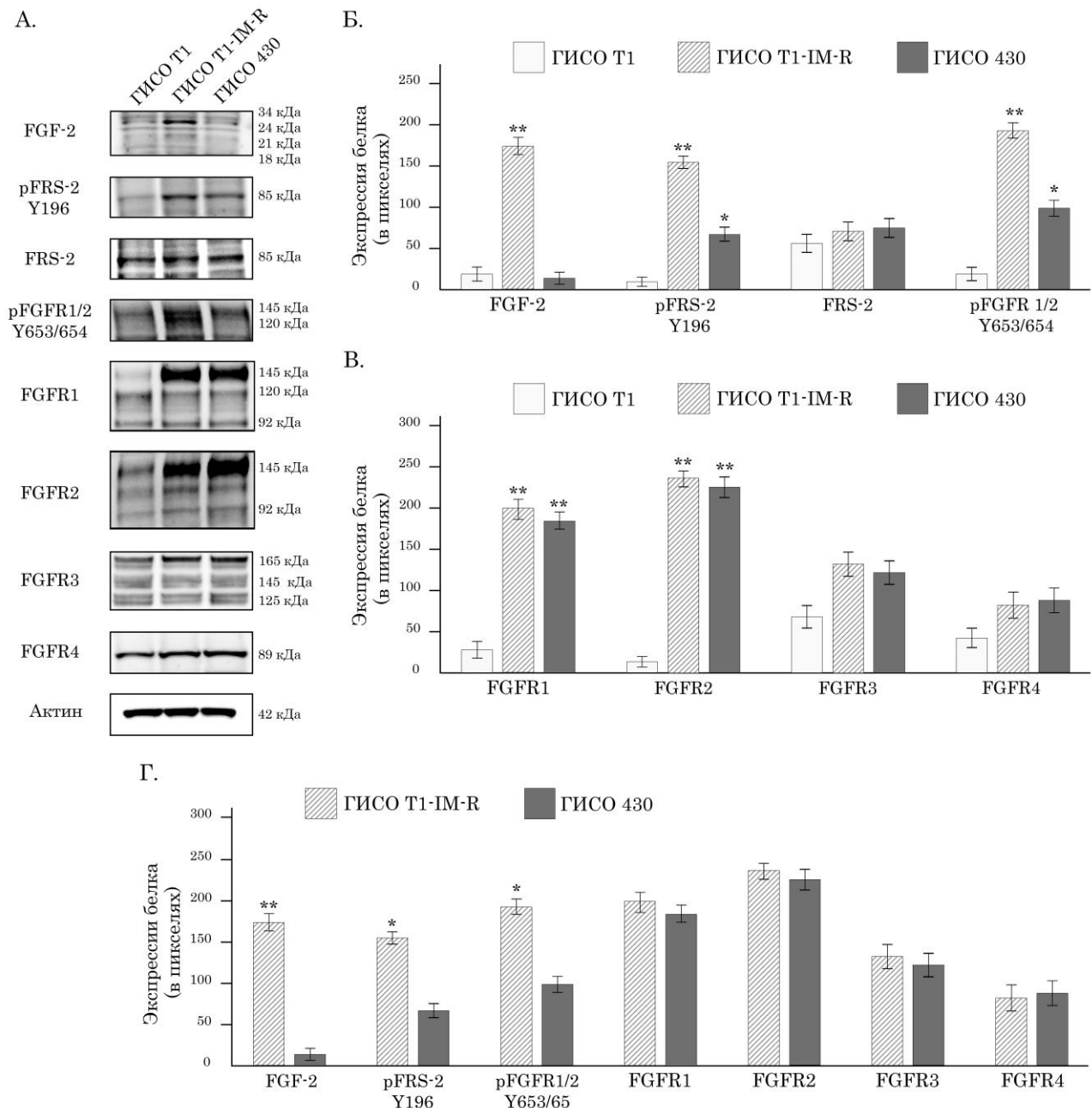


Рисунок 1 – Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. А – Оценка экспрессии белков FGFR-сигнального пути (FGF-2, pFRS-2, FRS-2, pFGFR1/2, FGFR1-4) методом иммуноблоттинга. На графиках – количественный анализ экспрессии белков FGF-2, pFRS-2, FRS-2, pFGFR1/2 (Б); FGFR1-4 (В); FGF-2, pFRS-2, pFGFR1/2, FGFR1-4 (Г); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

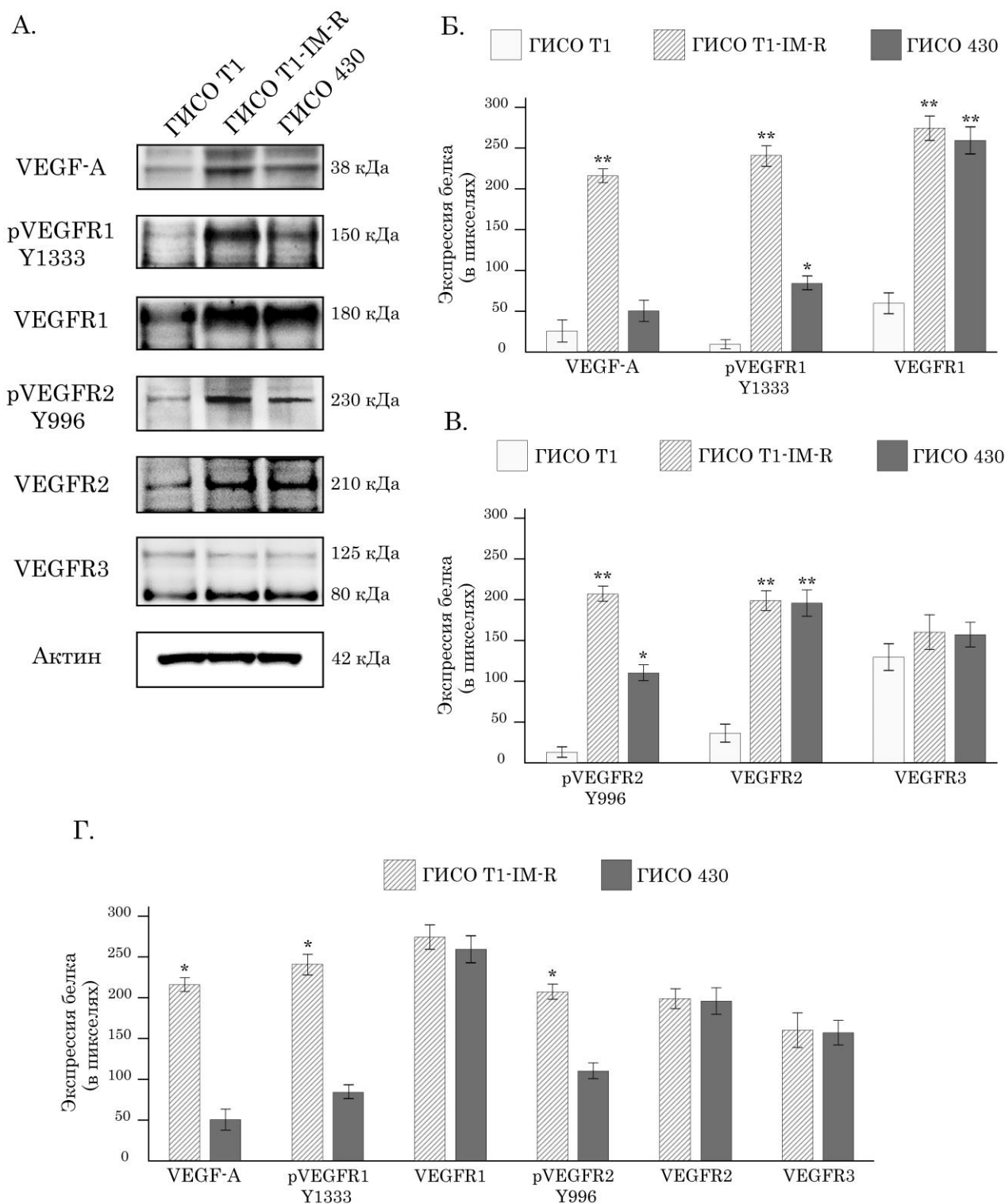


Рисунок 2 – Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430. А – Оценка экспрессии белков VEGFR-сигнального пути (VEGF-A, VEGFR1-3) методом иммуноблоттинга. На графиках – количественный анализ экспрессии белков VEGF-A, pVEGFR1, VEGFR1 (Б); pVEGFR2, VEGFR2, VEGFR3 (В); VEGF-A, pVEGFR1, VEGFR1, pVEGFR2, VEGFR2, VEGFR3 (Г); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

В клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, экспрессия pFGFR1/2 и pFRS-2 и лиганда FGF-2 значимо ниже, чем в клетках ГИСО T1-ИМ-R (см. Рисунок 1). Кроме того, в клетках ГИСО 430, по сравнению с клетками ГИСО T1-ИМ-R, значимо ниже экспрессия pVEGFR1-2 и лиганда VEGF-A (см. Рисунок 2). Важно отметить, что в клетках ГИСО 430, как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1, отмечалась гиперэкспрессия фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы c-KIT (Рисунок 3). Кроме того, в клетках ГИСО 430 была обнаружена повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (Рисунок 4).

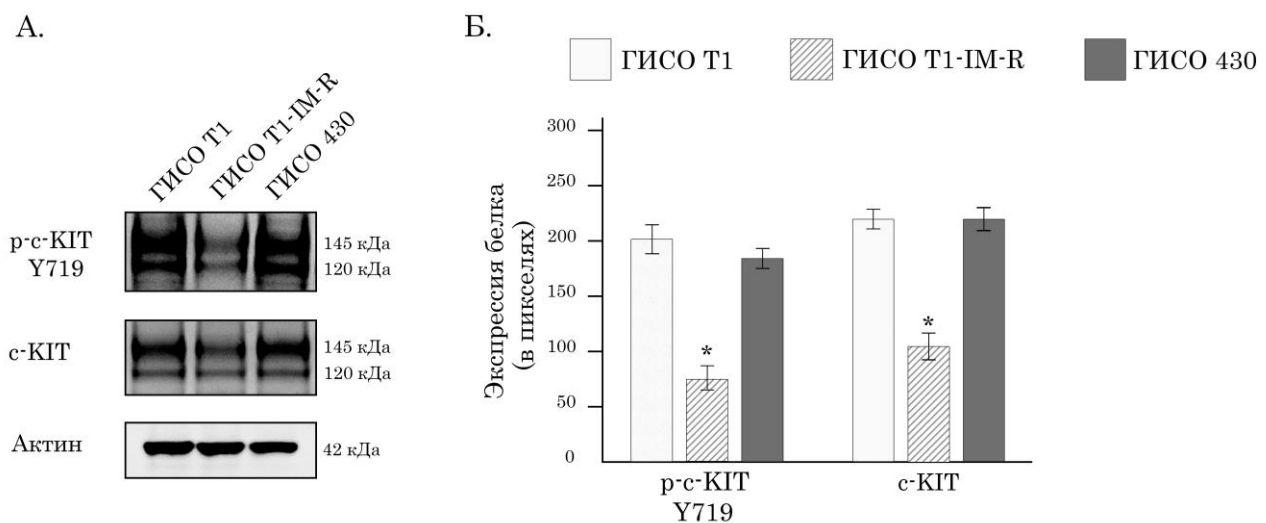


Рисунок 3 – Активация c-KIT-сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430. А – Оценка экспрессии фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы c-KIT методом иммуноблоттинга. Б – Количественный анализ экспрессии белков p-c-KIT, c-KIT; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Экспрессия фосфорилированных форм STAT1, MAPK и AKT была существенно выше в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентными к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 4). Вероятно, вследствие отсутствия аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A лигандов в клетках ГИСО 430 активация сигнальных путей (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) была значимо ниже, чем в клетках ГИСО T1-ИМ-R.

Таким образом, в ИМ-резистентных клетках ГИСО с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* обнаружены признаки активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что проявляется повышенной экспрессией общих и

фосфорилированных форм рецепторных (FGFR1-2, VEGFR1-2) и нерецепторных (STAT1, MAPK и AKT) тирозинкиназ, адаптерных белков FGFR-сигналинга (FRS-2), а также соответствующих лигандов FGF-2 и VEGF-A. Данные процессы происходят на фоне снижения уровней экспрессии общей и фосфорилированной форм с-KIT, что свидетельствует о переключении киназно-опосредованного сигналинга, регулирующего процессы жизнеспособности, пролиферации и апоптоза ИМ-резистентных ГИСО.

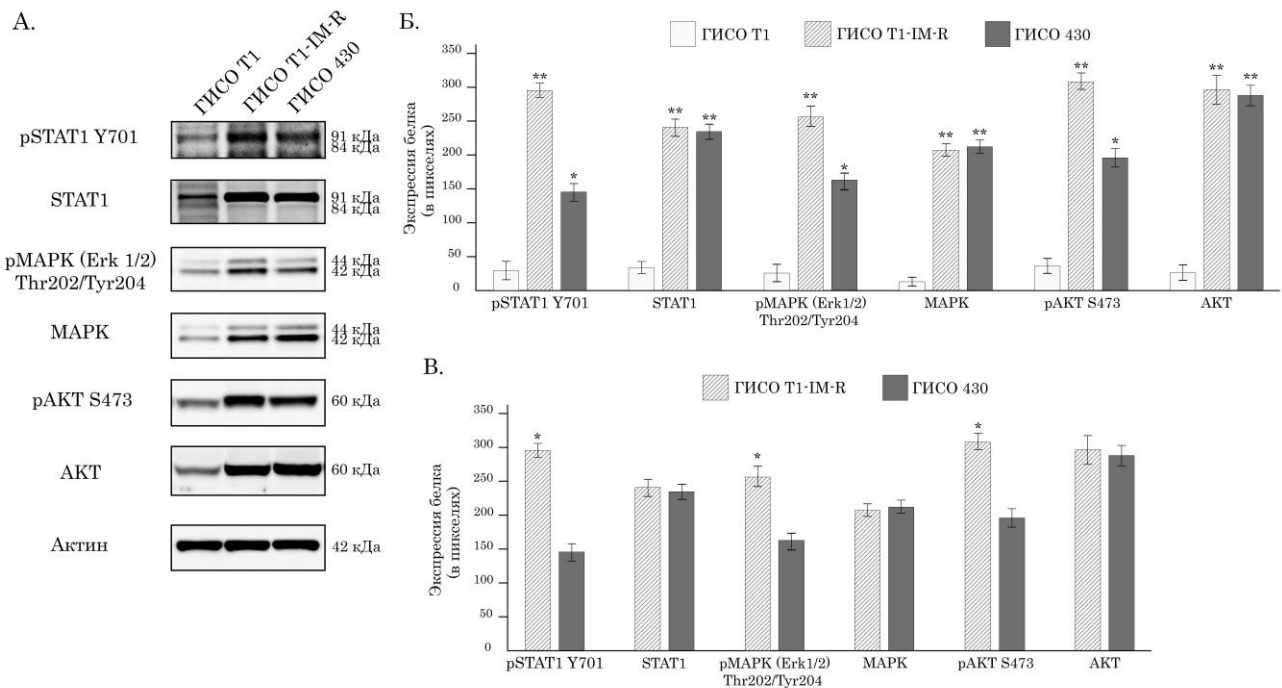


Рисунок 4 – Экспрессия нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм STAT1, MAPK и AKT методом иммуноблоттинга. На графиках – количественный анализ экспрессии белков pSTAT1, STAT1, pMAPK, MAPK, pAKT, AKT (Б); pSTAT1, STAT1, pMAPK, MAPK, pAKT, AKT (В); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Механизмы активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО

В условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием субтоксической концентрации ИМ 0,02 мкмоль/л или кнРНК *KIT*) в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 отмечалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии лиганда FGF-2, фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2, фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2 (Рисунок 5 А-Г). Кроме того, при ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием субтоксической концентрации ИМ 0,02 мкмоль/л или кнРНК *KIT*) в опухолевых клетках ГИСО T1 повышалась экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2* (Рисунок 5Д).

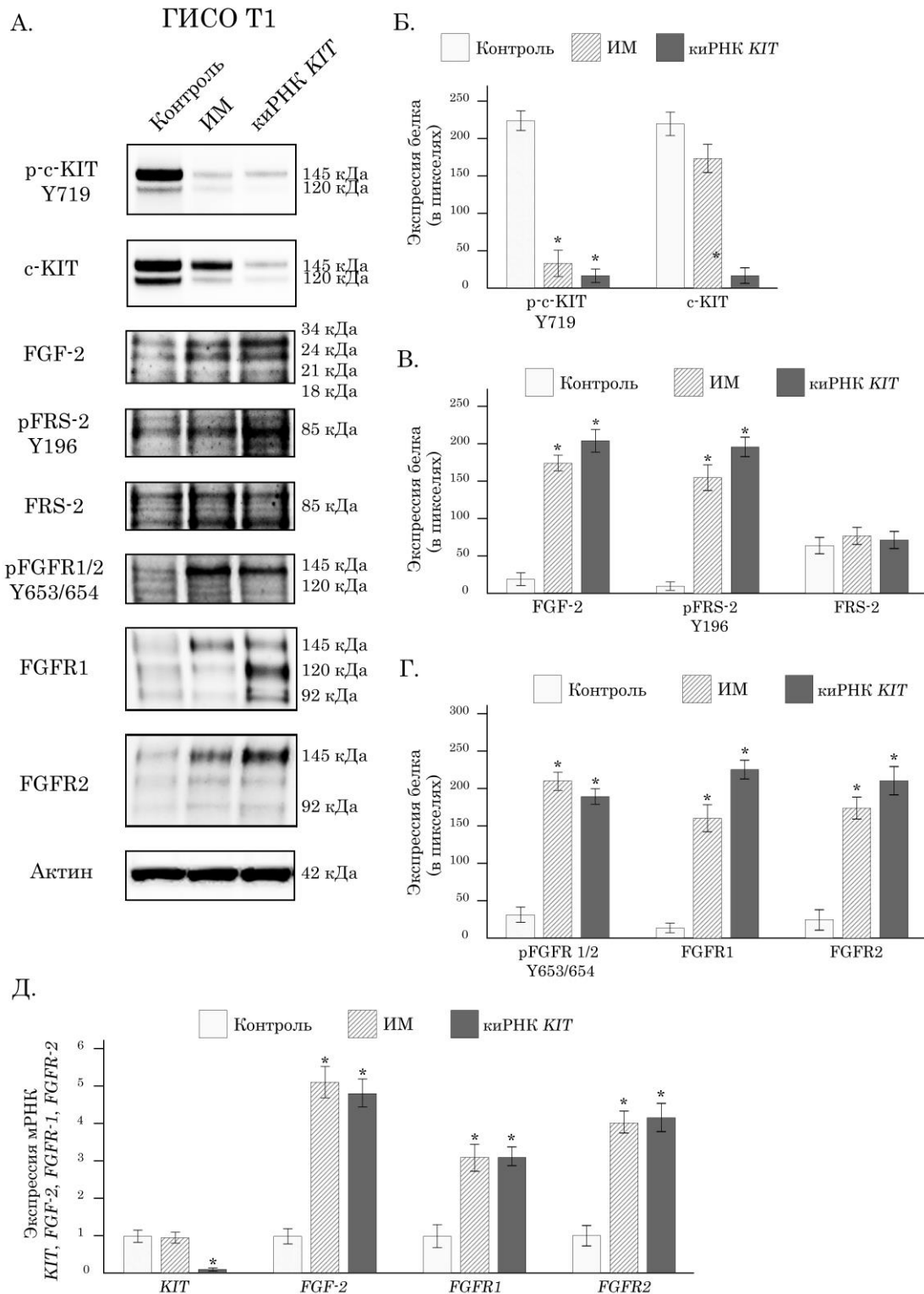


Рисунок 5 – Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях ингибирования с-KIT с помощью ИМ (0,02 мкмоль/л) или киРНК KIT. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм с-KIT, FGF-2, FRS-2, FGFR1-2 методом иммуноблоттинга. На графиках – количественный анализ экспрессии белков p-c-KIT, с-KIT (Б); FGF-2, pFRS-2, FRS-2 (В); pFGFR1/2, FGFR1-2 (Г); * - $p < 0,001$. Д – Оценка экспрессии *KIT*, *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR-2* в клетках ГИСО методом ПЦР; * - $p < 0,001$.

FGF-2 лиганд индуцировал в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 активацию сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), обеспечивающие их пролиферацию и выживаемость (Рисунок 6).

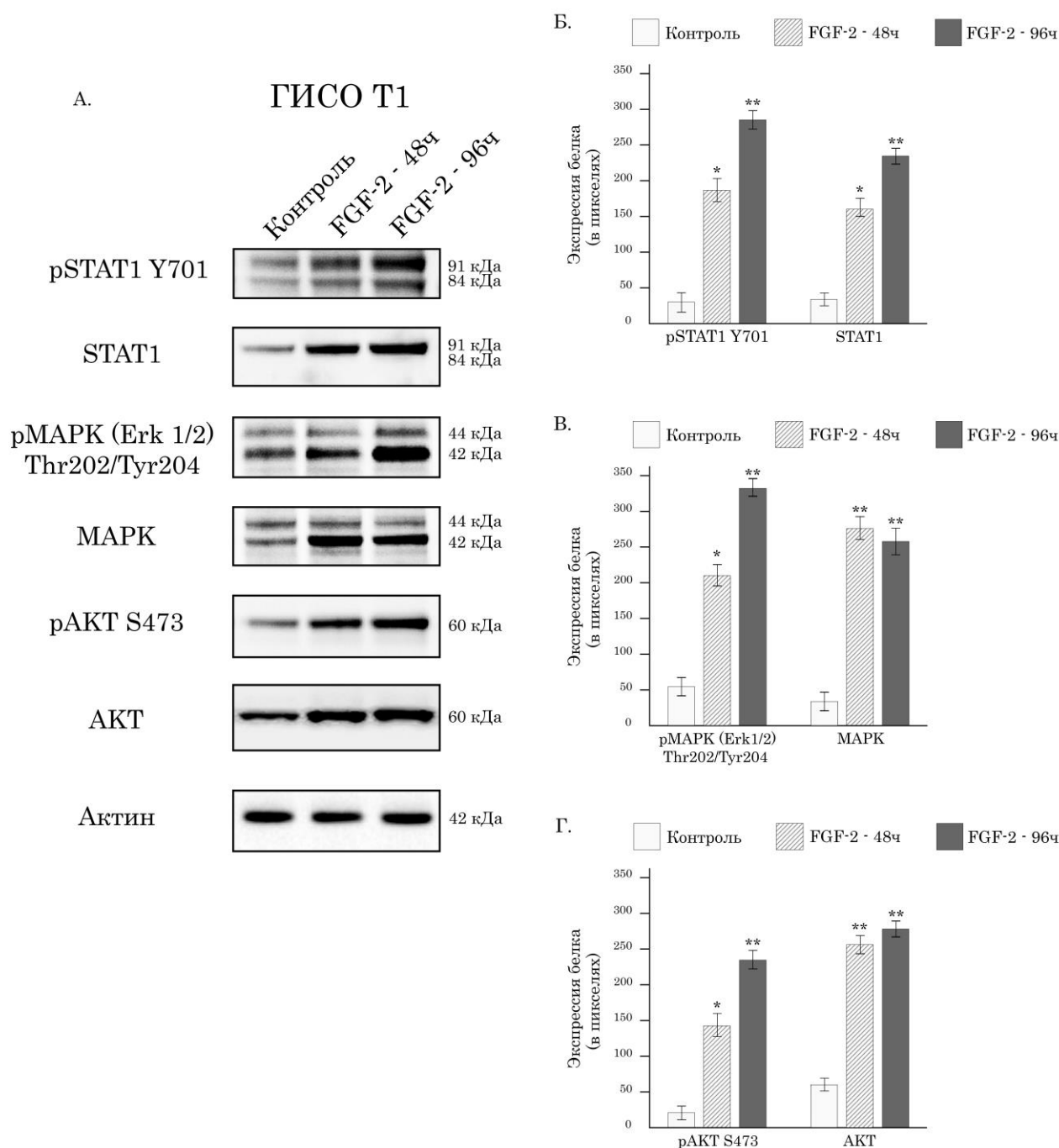


Рисунок 6 – Влияние FGF-2 (100 нг/мл) на экспрессию STAT1, MAPK и AKT в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм STAT1, MAPK и AKT методом иммуноблоттинга. На графиках – количественный анализ экспрессии белков pSTAT1, STAT1 (Б); pMAPK, MAPK (В); pAKT, AKT (Г); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

В условиях ингибирования с-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 также отмечалось повышение активности FGFR-сигнального пути. В частности, под влиянием ИМ (1 мкмоль/л) или киРНК *KIT* в супернанатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 отмечалось время-зависимое увеличение концентрации FGF-2 лиганда. При ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ в концентрации 1 мкмоль/л или киРНК *KIT*) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 повышалась экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2*.

Таким образом, активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО происходит аутокринным путем и является результатом гиперпродукции FGF-2 лиганда опухолевыми клетками, возникающей в результате ингибирования с-KIT-сигналинга. За счет FGFR-сигналинга в клетках ГИСО возникает альтернативная активация внутриклеточных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), способствующих их пролиферации и развитию вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ.

Структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами с-KIT и FGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО

В ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R обнаружена структурная и функциональная взаимосвязь между рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2, что подтверждается ко-иммунопреципитацией рецепторов (Рисунок 7) и высокой степенью их ко-локализации (Рисунок 8).

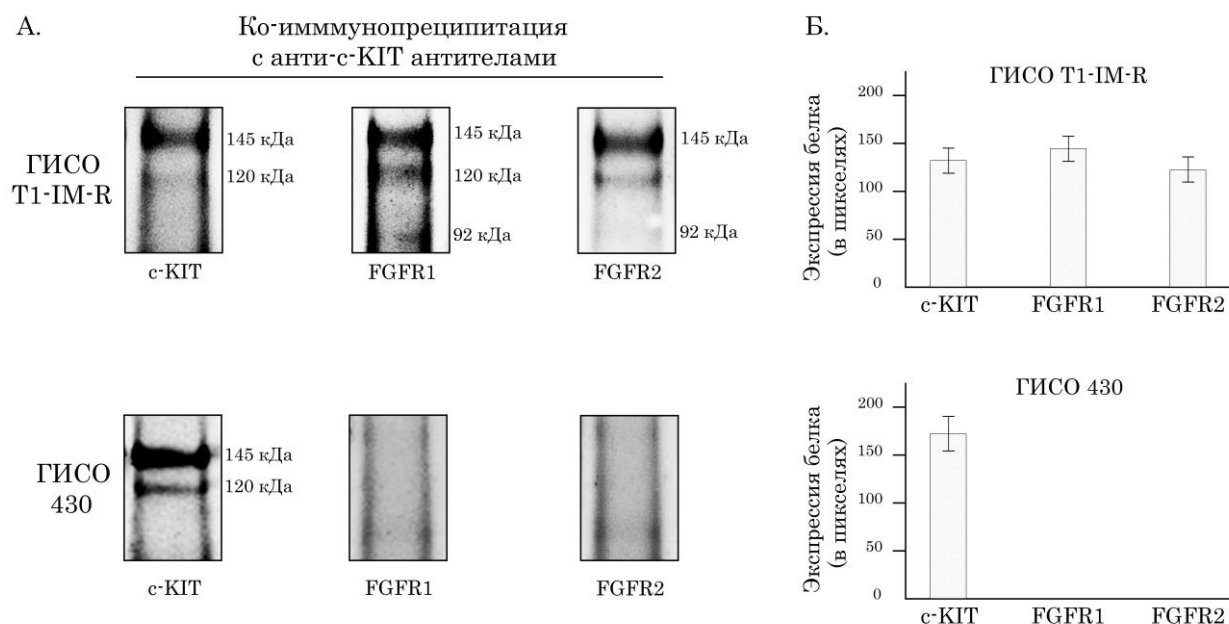


Рисунок 7 – Ко-иммунопреципитация рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430. А – Оценка экспрессии общих форм белков с-KIT, FGFR1 и FGFR2 методом иммуноблоттинга; Б – Количественный анализ экспрессии белков с-KIT, FGFR1 и FGFR2.

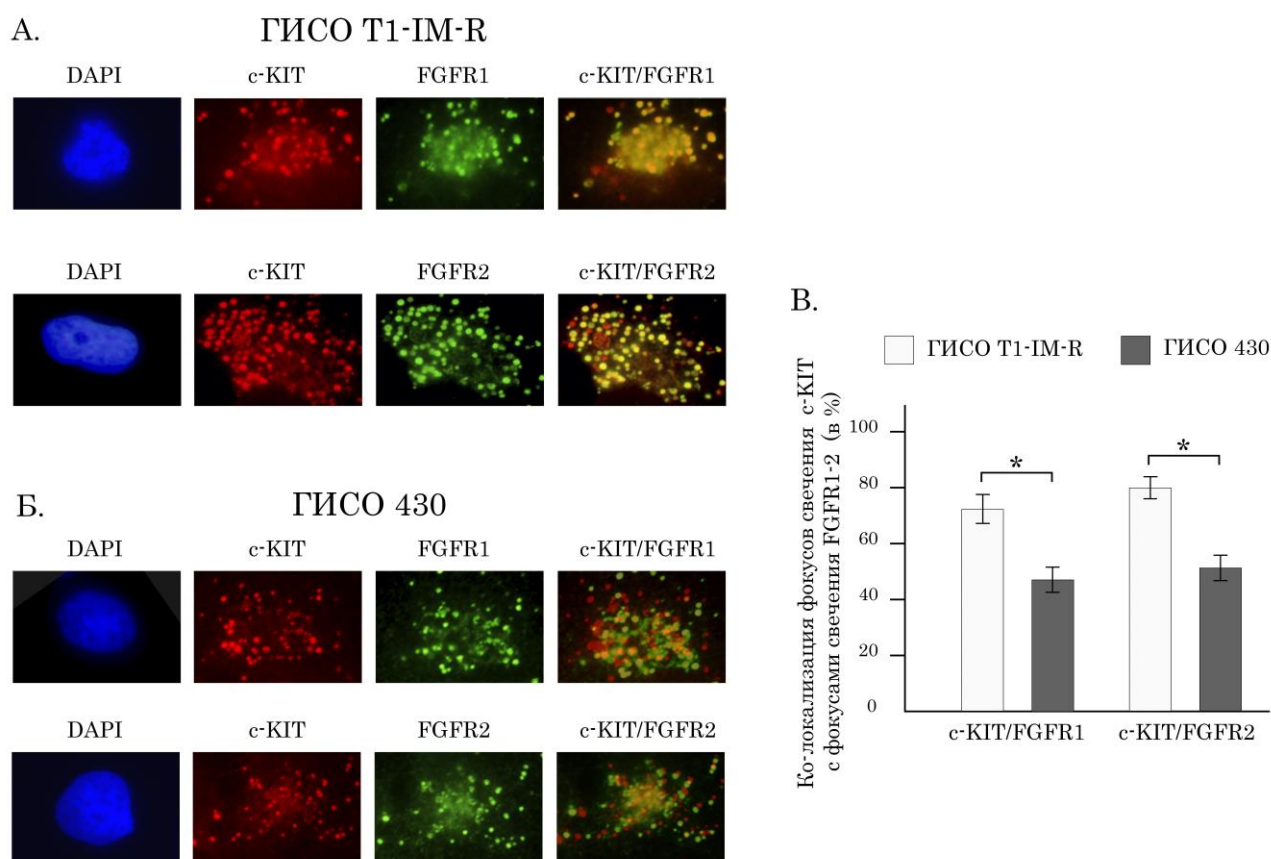


Рисунок 8 – Иммунофлуоресцентная микроскопия рецепторов c-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (А) и ГИСО 430 (Б) при увеличении 100х. На ко-локализацию рецепторов c-KIT/FGFR1, c-KIT/FGFR2 указывает желтое свечение. Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI; В – количественный анализ ко-локализации рецепторов c-KIT/FGFR1, c-KIT/FGFR2.

В тоже время, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаружилось структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами c-KIT, FGFR1 и FGFR2, что подтверждается отсутствием ко-иммунопреципитации рецепторов и низкой степенью их ко-локализации (см. Рисунок 7, 8).

Модуляции чувствительности клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ посредством ингибирования FGFR-сигнального пути

Поскольку в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, была обнаружена структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами c-KIT, FGFR1 и FGFR2, то далее исследовалась способность селективных ингибиторов FGFR-рецепторов модулировать чувствительность клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ.

При использовании комбинации таргетного препарата ИМ с селективным ингибитором рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R по механизму апоптоза, что подтверждалось резким увеличением экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3, снижением индекса пролиферации опухолевых клеток и низкой интенсивностью окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового (Рисунок 9). Аналогичные результаты были получены при использовании ИМ в комбинации с другими селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4 (AZD4547, TAS-120).

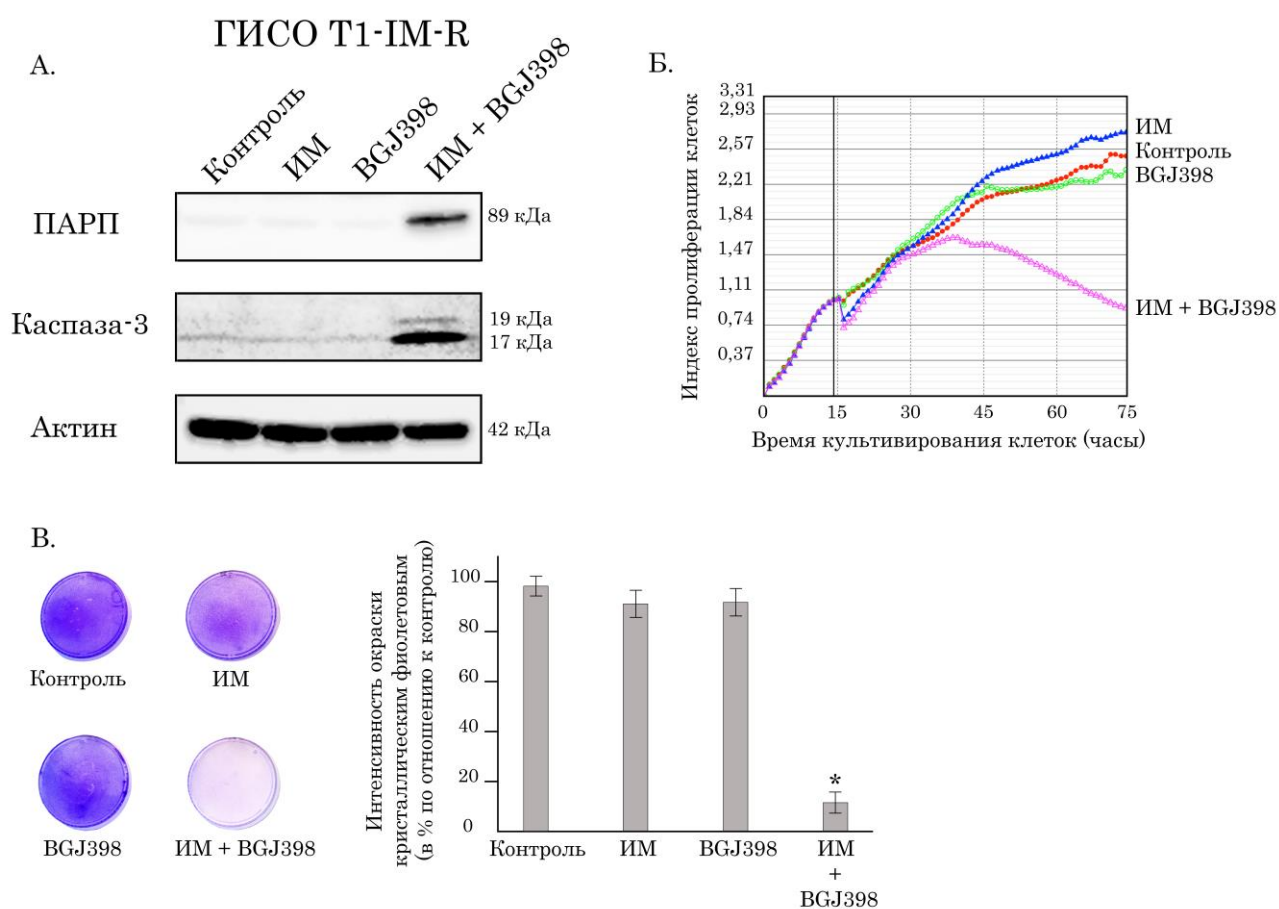


Рисунок 9 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации в отношении клеток ГИСО T1-IM-R. А – Исследование апоптоза клеток ГИСО T1-IM-R методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); В – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R раствором кристаллического фиолетового; * - $p < 0,01$.

Развитие цитотоксического и антипролиферативного эффектов было обусловлено синергетическим взаимодействием указанных препаратов, которое было следствием структурной и функциональной взаимосвязи между

тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R. В Таблице 1 продемонстрировано, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма комбинаций препаратов (ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120) был более 10 единиц, что указывает на их синергетическое взаимодействие.

Таблица 1 – Показатель синергизма комбинации ИМ с селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547 и TAS-120)

для клеточной линии ГИСО T1-IM-R

Клеточная линия	Комбинация препаратов	Показатель синергизма			
		ZIP	Bliss	Loewe	HSA
ГИСО T1-IM-R	ИМ + BGJ398	62,53	62,48	65,82	65,21
	ИМ + AZD4547	32,34	31,18	34,05	33,48
	ИМ + TAS-120	29,44	30,53	33,78	34,11

Примечание – Интерпретация показателя синергизма: > 10 (синергетическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < - 10 (антагонистическое взаимодействие)

Следовательно, селективные ингибиторы рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) способствовали восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* к таргетному препарату ИМ.

Было обнаружено, что препарат U0126, являясь селективным ингибитором МАРК-киназы, также способствовал восстановлению чувствительности ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к ИМ. Следовательно, активация МАРК-киназы является ключевым механизмом, обеспечивающим пролиферацию ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R.

Механизмы активации FGFR-сигналинга в ИМ-резистентных ГИСО со сниженной экспрессией *KIT*

ИМ-резистентные клетки ГИСО T1-IM-R являются гетерогенной популяцией, состоящей из клонов опухолевых клеток, различающихся по уровню экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT (Рисунок 10). Через 6 месяцев экспериментов с клонами ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R методом серийных разведений была получена *KIT*-негативная клеточная линия ГИСО, обозначенная ГИСО T1-IM-R-2 (Boichuk S. et al., 2023). Методом иммуноблоттинга было установлено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2, в отличие от клеток ГИСО T1-IM-R, отсутствовала экспрессия общей и фосфорилированной формы тирозинкиназного рецептора с-KIT. Кроме того,

методом ПЦР было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2 отсутствует экспрессия *KIT*.

ГИСО T1-IM-R

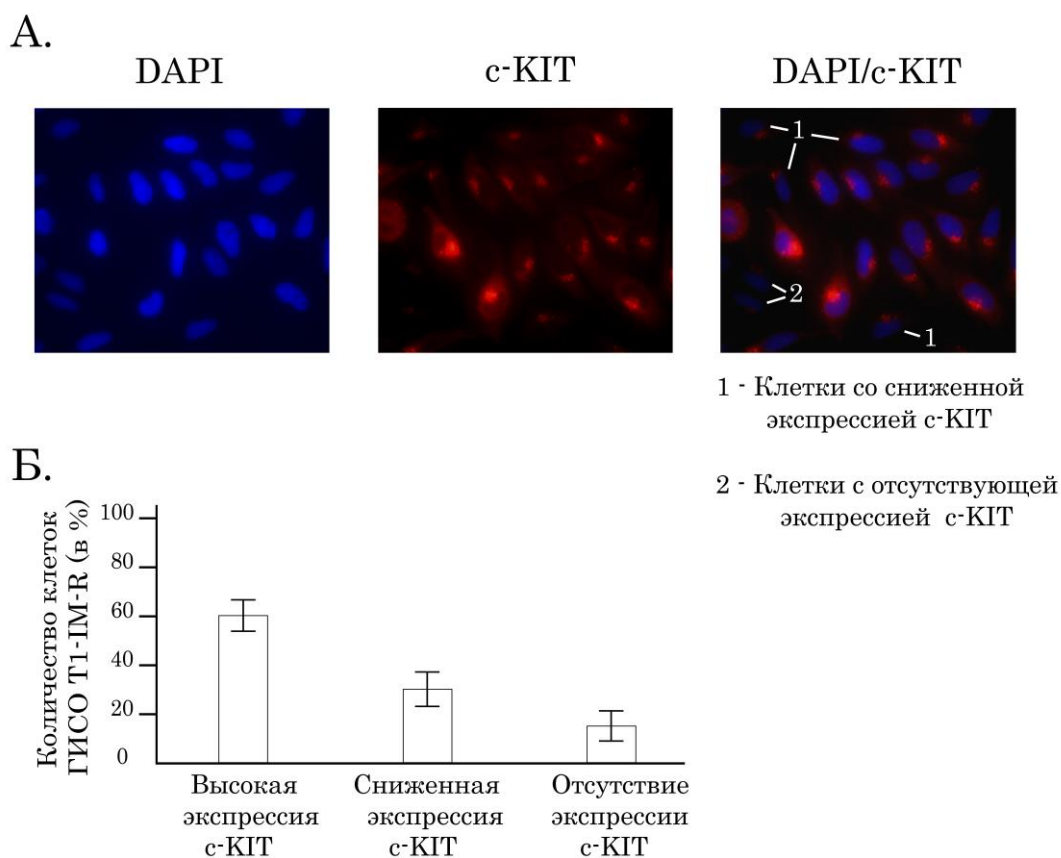


Рисунок 10 – Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназного рецептора c-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R при увеличении 40х (А). Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI. Б – Количественный анализ экспрессии c-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R.

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2, в отличие от клеток ГИСО T1-IM-R, отсутствует экспрессия тирозинкиназного рецептора c-KIT. Подобно ИМ-резистентным клеткам ГИСО T1-IM-R, клетки ГИСО T1-IM-R-2 сохраняли жизнеспособность в присутствии ИМ. Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2 ($17,8 \pm 0,8$ мкмоль/л) в 2,64 раза было ниже значения IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R ($47,1 \pm 1,3$ мкмоль/л) и более чем в 400 раз превышало значение IC_{50} ИМ для ИМ-чувствительной клеточной линии ГИСО T1 ($0,04 \pm 0,0003$ мкмоль/л). Следовательно, клетки *KIT*-негативной линии ГИСО T1-IM-R-2 обладают резистентностью к ИМ.

В ИМ-резистентных *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-IM-R-2 отмечалось значимое увеличение активации FGFR-сигнального пути по сравнению с ИМ-

резистентными клетками ГИСО T1-IM-R, что подтверждалось повышенной экспрессией FGF-2 лиганда, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1 и FGFR2, фосфорилированной формы белка FRS-2, а также гиперэкспрессией *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2* (Рисунок 11).

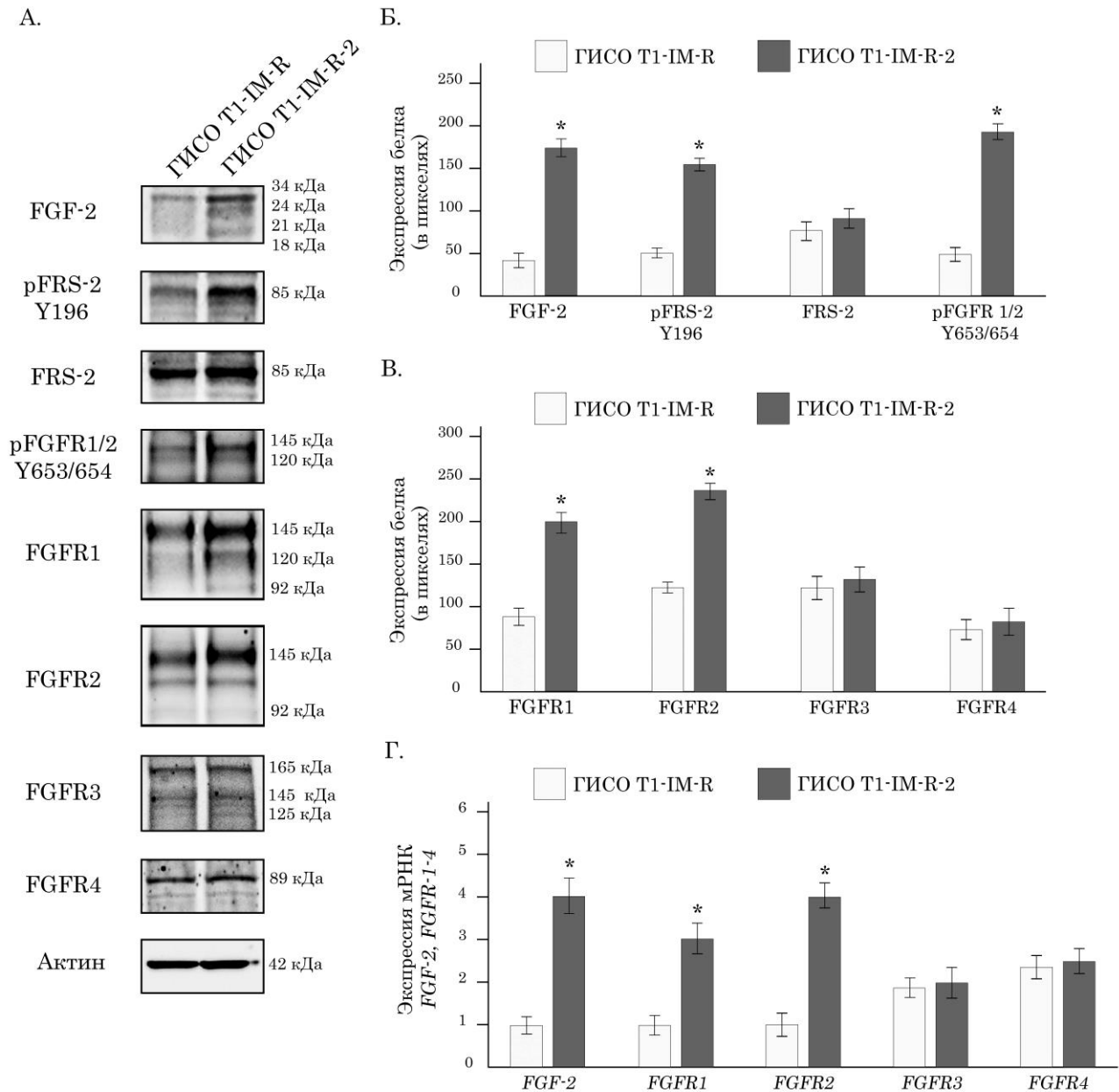


Рисунок 11 – Активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков FGFR-сигнального пути (FGF-2, FRS-2, FGFR1-4) методом иммуноблоттинга; На графиках – количественный анализ экспрессии белков FGF-2, pFRS-2, FRS-2, pFGFR1/2 (Б); FGFR1-4 (В); * - $p < 0,05$; Г – Оценка экспрессии FGF-2, FGFR1-4 в клетках ГИСО методом ПЦР; * - $p < 0,05$.

Препараты BGJ398, AZD4547 и TAS-120, являясь селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении клеток ГИСО T1-IM-R-2 (Рисунок 12). Апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R-2 был обусловлен ингибированием FGFR-сигнального пути. Значения IC_{50} селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) для клеточной линии ГИСО T1-IM-R более чем 9000 раз превышали аналогичные значения IC_{50} для клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2 (Таблица 2).

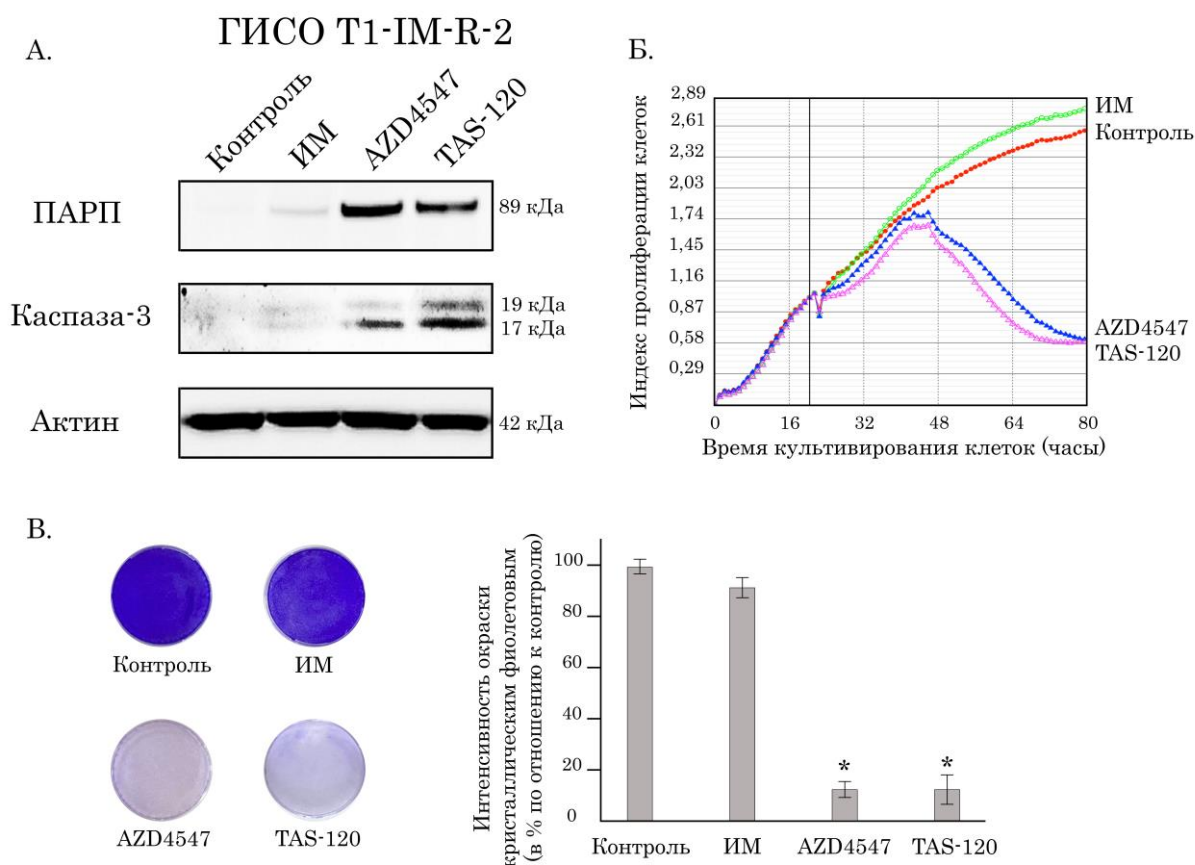


Рисунок 12 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ (1 мкмоль/л), AZD4547 (1 мкмоль/л) и TAS-120 (1 мкмоль/л) в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2. А – Исследование апоптоза клеток ГИСО T1-IM-R-2 методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и PARP; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R-2 с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); В – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R-2 раствором кристаллического фиолетового; * - $p < 0,01$.

Таким образом, исключительно высокая чувствительность ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2 к ингибиторам FGFR-сигнального пути по сравнению с другими клонами клеток ГИСО обусловлена гиперактивацией FGFR-сигнального пути.

Таблица 2 – Показатели IC₅₀ BGJ398, AZD4547, TAS-120 для клеточных линий ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2

IC ₅₀ мкмоль/л	ГИСО T1-IM-R	ГИСО T1-IM-R-2	Кратность увеличения IC ₅₀ препарата относительно ГИСО T1-IM-R-2
IC ₅₀ BGJ398	4,4 ± 0,21	< 0, 0003	> 14,700
IC ₅₀ AZD4547	4,8 ± 0,34	0,00051	> 9400
IC ₅₀ TAS-120	4,21 ± 0,17	0,00038	> 11000

Роль фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) в механизмах активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО

В присутствии FGF-2 лиганда (100 нг/мл) и субтоксической концентрации ИМ (0,02 мкмоль/л) в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 происходила активация VEGFR-сигнального пути, что подтверждалось повышением экспрессии VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (Рисунок 13).

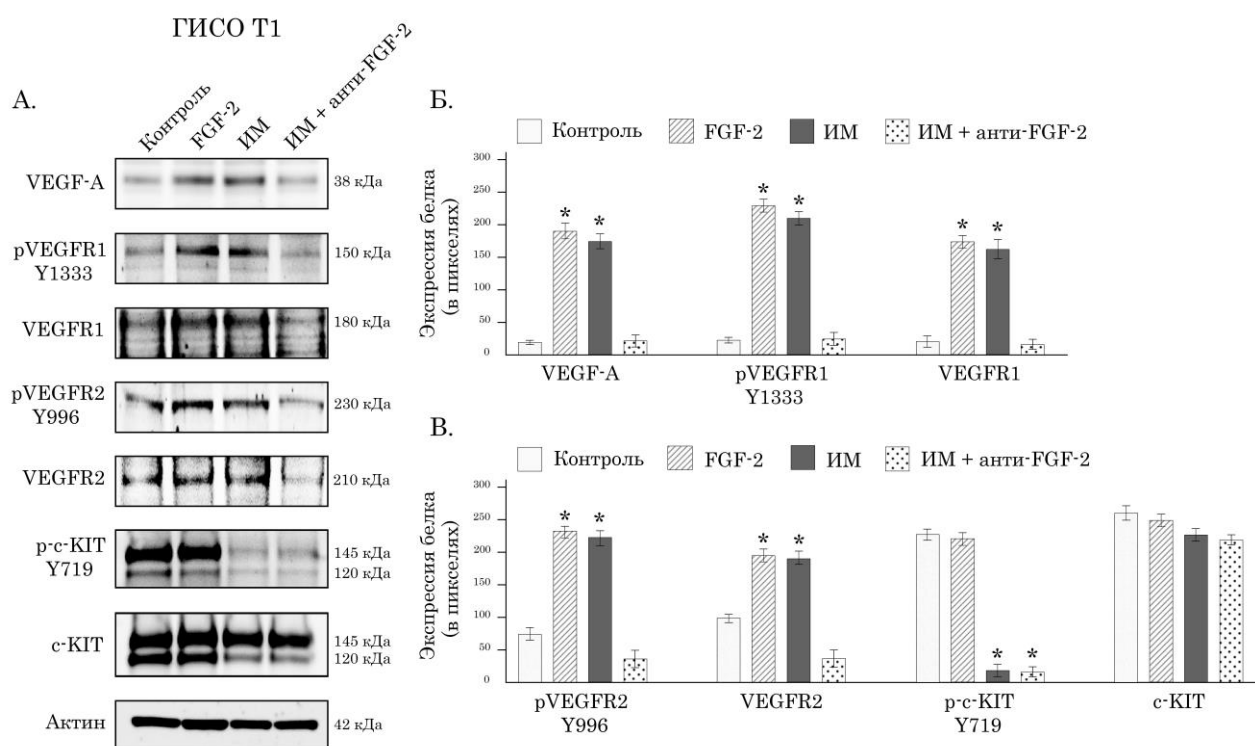


Рисунок 13 – Влияние FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,02 мкмоль/л) и анти-FGF-2 МАТ (20 мкг/мл) на экспрессию маркеров VEGFR- и c-KIT-сигнальных путей в клетках ГИСО T1. А – Оценка экспрессии VEGF-A, фосфорилированных и общих форм VEGFR1-2 и c-KIT методом иммуноблоттинга; На графиках – количественный анализ экспрессии белков VEGF-A, pVEGFR1, VEGFR1 (Б); pVEGFR2, VEGFR2, p-c-KIT, c-KIT (В); * - $p < 0,01$.

Напротив, в присутствии комбинации ИМ с моноклональными АТ, нейтрализующими FGF-2 (анти-FGF-2 мАТ) в клетках ГИСО Т1 отмечалось ингибирование VEGFR-сигнального пути: снижение экспрессии VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (см. Рисунок 13). В присутствии FGF-2 лиганда (100 нг/мл) и субтоксической концентрации ИМ (0,02 мкмоль/л) в супернатантах клеток ГИСО Т1 повышалась концентрация VEGF-A (Рисунок 14). Напротив, в присутствии комбинации ИМ с анти-FGF-2 мАТ в супернатантах клеток ГИСО Т1 концентрация VEGF-A снижалась. В присутствии FGF-2 в клетках ГИСО Т1 значительно повышалась экспрессия VEGF-A (в 2, 5 раза) (Рисунок 14).

ГИСО Т1

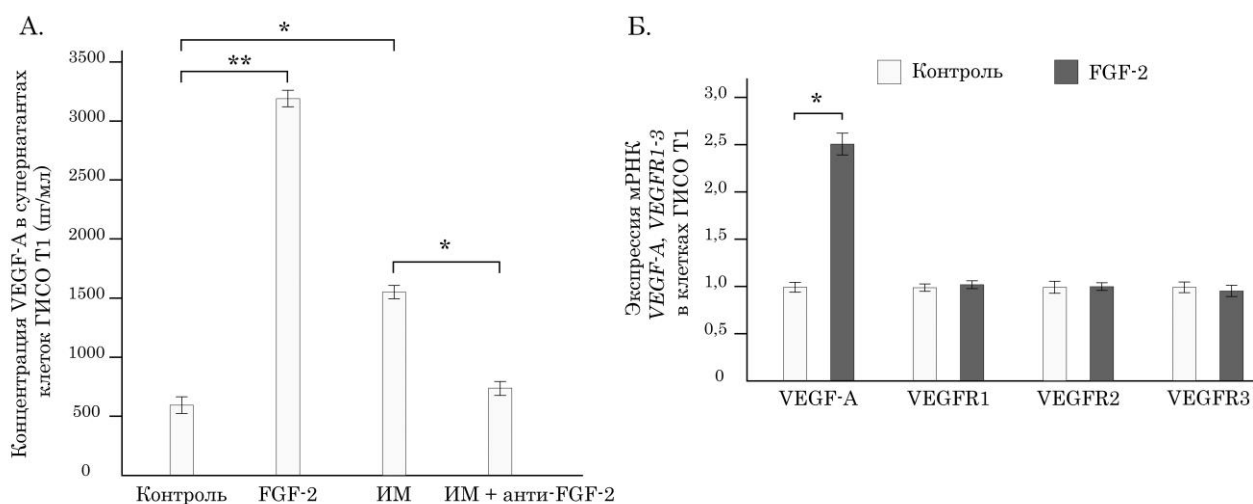


Рисунок 14 – Влияние FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,02 мкмоль/л) и анти-FGF-2 мАТ (20 мкг/мл) на активацию VEGFR-сигналинга в клетках ГИСО Т1. А – оценка концентрации VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО Т1 методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; Б – Оценка экспрессии VEGF-A, VEGFR1-3 в клетках ГИСО Т1 методом ПЦР; * - $p < 0,05$.

FGF-2 лиганд индуцирует продукцию VEGF-A лиганда ИМ-резистентными клетками ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430. В присутствии FGF-2 (100 нг/мл) в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 через 96 часов инкубации отмечалось значимое повышение концентрации VEGF-A. Следует отметить, что под влиянием FGF-2 в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась значимо более высокая концентрация VEGF-A лиганда (в 1,8 раза), по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентными к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 15А).

Под влиянием FGF-2 (100 нг/мл) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 значительно повышалась экспрессия VEGF-A (Рисунок 15Б-В). Следует отметить, что под действием FGF-2 в клетках ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась более высокая экспрессия VEGF-A (в 1,85 раза), по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентными к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 15Б-В).

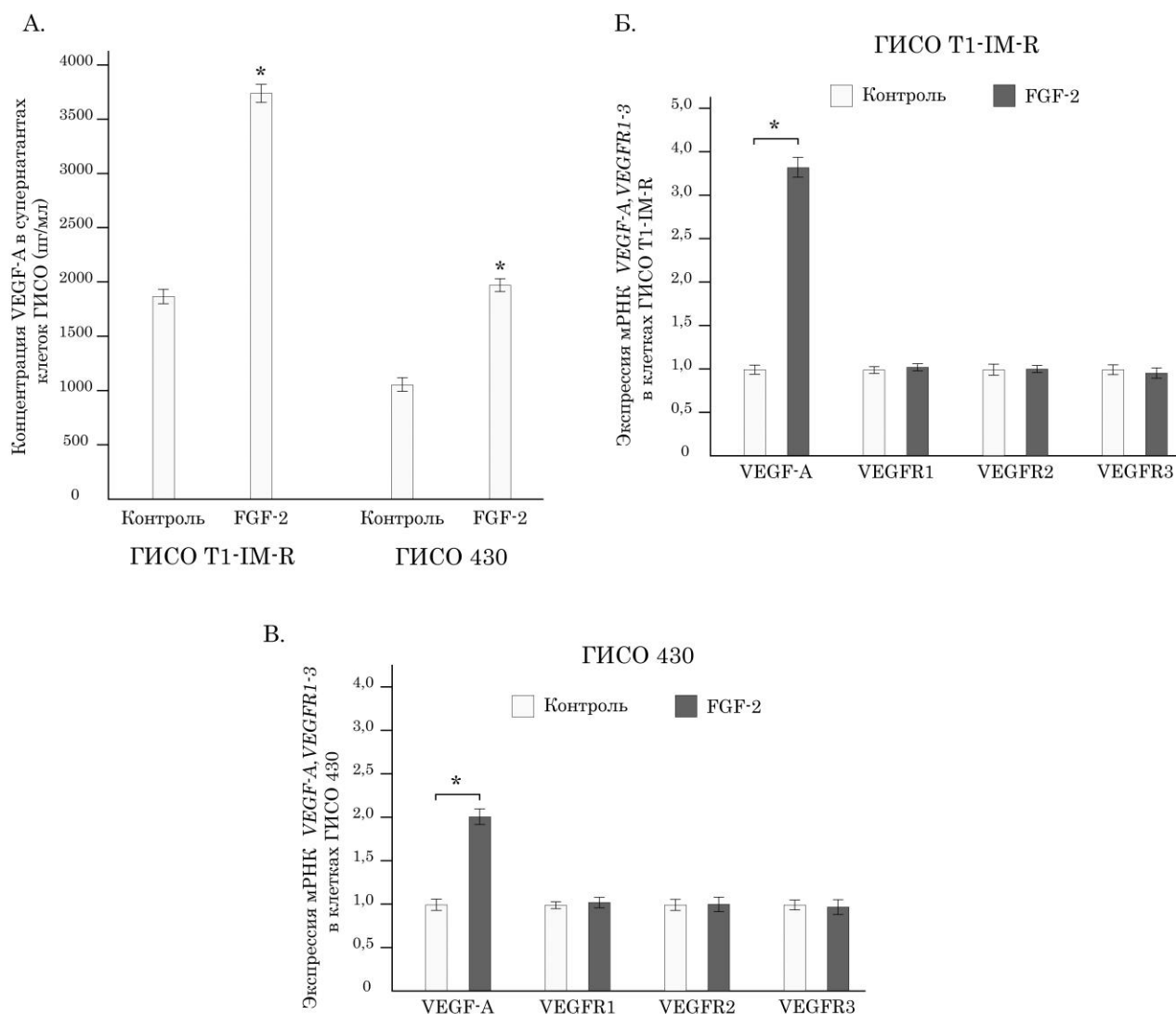


Рисунок 15 – Влияние FGF-2 (100 нг/мл) на активацию VEGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430. А – оценка концентрации VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в присутствии FGF-2 методом ИФА; * - $p < 0,05$; Экспрессия VEGF-A, VEGFR1-3 в клетках ГИСО T1-ИМ-R (Б) и ГИСО 430 (В) в присутствии FGF-2 оценивалась методом ПЦР; * - $p < 0,05$.

Таким образом, FGF-2 индуцирует продукцию VEGF-A лиганда ИМ-чувствительными и резистентными клетками ГИСО. FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A была более выражена в клетках ГИСО с признаками вторичной резистентности к ИМ.

Поскольку ИМ ингибирует тирозинкиназный рецептор с-KIT, то далее исследовалась активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО в условиях ингибирования с-KIT-сигналинга. Для этого выполнялся нокдаун гена *KIT* в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 с помощью кнРНК *KIT* (Рисунок 16).

ГИСО Т1

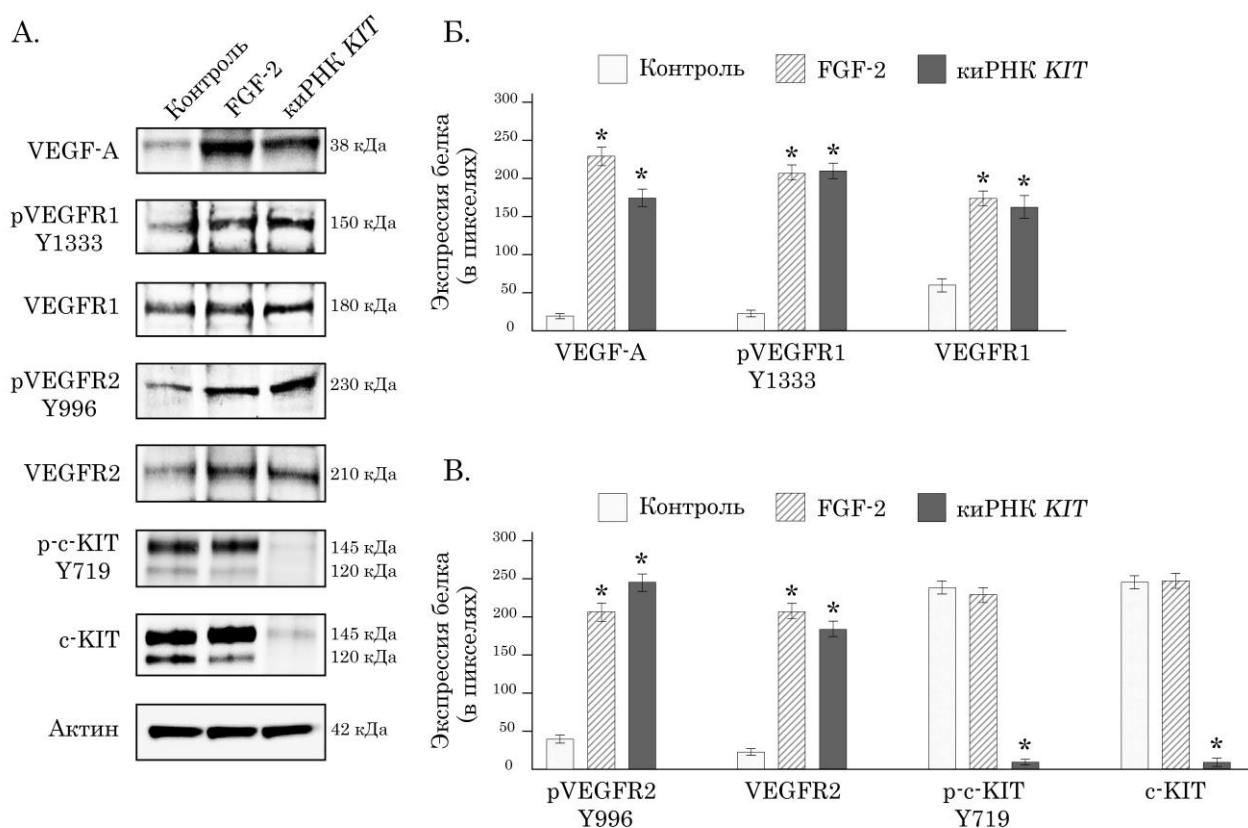


Рисунок 16 – Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях нокдауна *KIT* с помощью кнРНК *KIT*. А – Оценка экспрессии VEGF-A, фосфорилированных и общих форм VEGFR1-2 и с-KIT методом иммуноблоттинга. Культивирование клеток ГИСО Т1 в присутствии FGF-2 (100 нг/мл) использовалось в качестве положительного контроля активации VEGFR-сигналинга. На графиках – количественный анализ экспрессии белков VEGF-A, pVEGFR1, VEGFR1 (Б); pVEGFR2, VEGFR2, p-c-KIT, c-KIT (Б); * - $p < 0,01$.

В условиях нокдауна *KIT* в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 происходит активация VEGFR-сигнального пути, что подтверждается увеличением уровня экспрессии VEGF-A лиганда, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (см. Рисунок 16).

Чувствительность клеток ГИСО к VEGFR-ингибиторам (сунитинибу, регорафенибу)

С помощью колориметрического МТТ-теста были определены значения IC_{50} СУ и IC_{50} РЕГО для клеточных линий ГИСО (Таблица 3).

Таблица 3 – Показатели IC_{50} ИМ, IC_{50} СУ и IC_{50} РЕГО для линий ГИСО

IC_{50}, мкмоль/л	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО 430
IC_{50} ИМ	$0,04 \pm 0,0003$	$47,1 \pm 1,3$	$54,3 \pm 7,9$
Кратность увеличения IC_{50} ИМ относительно ГИСО Т1		1 177,5	1 357,5
Кратность увеличения IC_{50} ИМ относительно ГИСО Т1-ИМ-R			1,15
IC_{50} СУ	$0,016 \pm 0,0001$	$5,2 \pm 0,5$	$15,3 \pm 2,4$
Кратность увеличения IC_{50} СУ относительно ГИСО Т1		325	956,2
Кратность увеличения IC_{50} СУ относительно ГИСО Т1-ИМ-R			2,94
IC_{50} РЕГО	$0,029 \pm 0,003$	$2,2 \pm 0,3$	$14,8 \pm 1,9$
Кратность увеличения IC_{50} РЕГО относительно ГИСО Т1		76,0	510,4
Кратность увеличения IC_{50} РЕГО относительно ГИСО Т1-ИМ-R			6,7

Значение IC_{50} СУ для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R составило $5,2 \pm 0,5$ мкмоль/л, что в 325 раз превышает значение IC_{50} СУ для клеточной линии ГИСО Т1 ($0,016 \pm 0,0001$ мкмоль/л). В тоже время, значение IC_{50} СУ для клеточной линии ГИСО 430 ($15,3 \pm 2,4$ мкмоль/л) в 956,2 раза превышает значение IC_{50} СУ для клеточной линии ГИСО Т1. Значение IC_{50} РЕГО для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R составило $2,2 \pm 0,3$ мкмоль/л, что в 76 раз превышает значение IC_{50} СУ для клеточной линии ГИСО Т1 ($0,029 \pm 0,003$ мкмоль/л). В тоже время, значение IC_{50} РЕГО для клеточной линии ГИСО 430 ($14,8 \pm 1,9$ мкмоль/л) в 510,4 раза превышает значение IC_{50} РЕГО для клеточной линии ГИСО Т1 (см. Таблица 3).

Следовательно, ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 являются резистентными к таргетным препаратам СУ и РЕГО.

Таким образом, VEGF-A-индуцированная активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО с фенотипическими признаками резистентности к ИМ является вторичным событием, обусловленным гиперпродукцией FGF-2 лиганда и последующей активацией FGFR-сигналинга. FGF-2-опосредованная активация VEGFR-сигналинга способствует формированию вторичной резистентности клеток ГИСО к VEGFR-ингибиторам – СУ, РЕГО.

Структурная и функциональная взаимосвязь между рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО

Полученные результаты указывают на наличие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, что подтверждается ко-иммунопреципитацией рецепторов (Рисунок 17) и высокой степенью их ко-локализации (Рисунок 18).

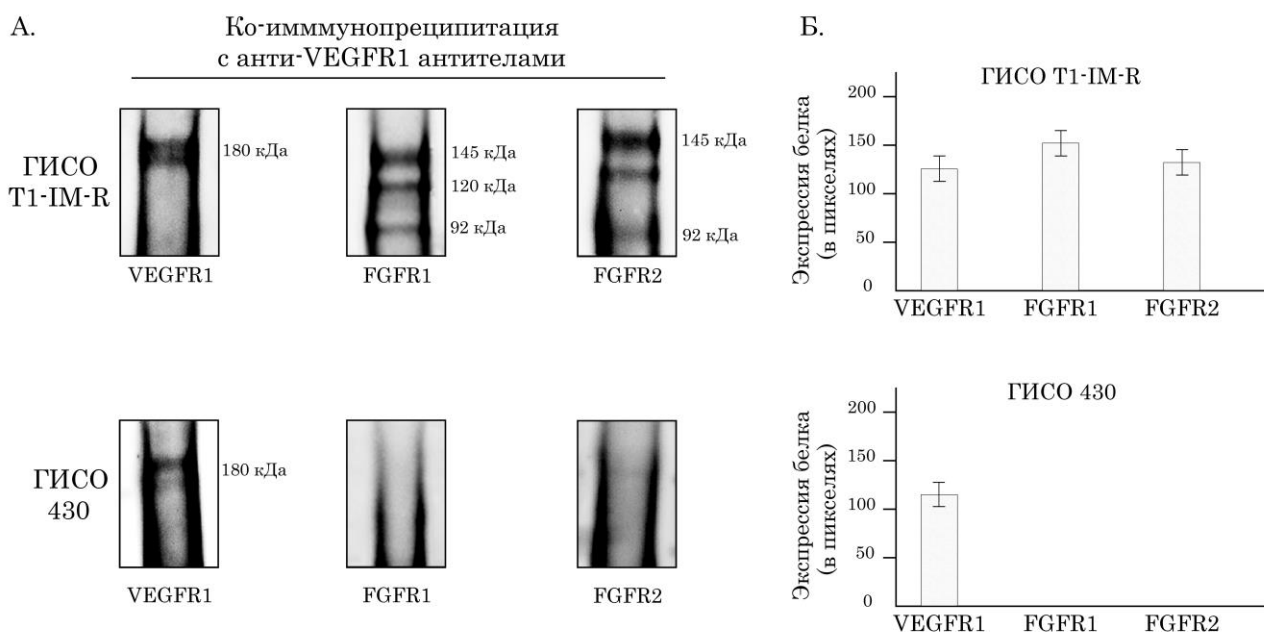


Рисунок 17 – Ко-иммунопреципитация рецепторов VEGFR1, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430. А – Оценка экспрессии общих форм белков VEGFR1, FGFR1 и FGFR2 методом иммуноблоттинга; Б – Количественный анализ экспрессии белков VEGFR1, FGFR1 и FGFR2.

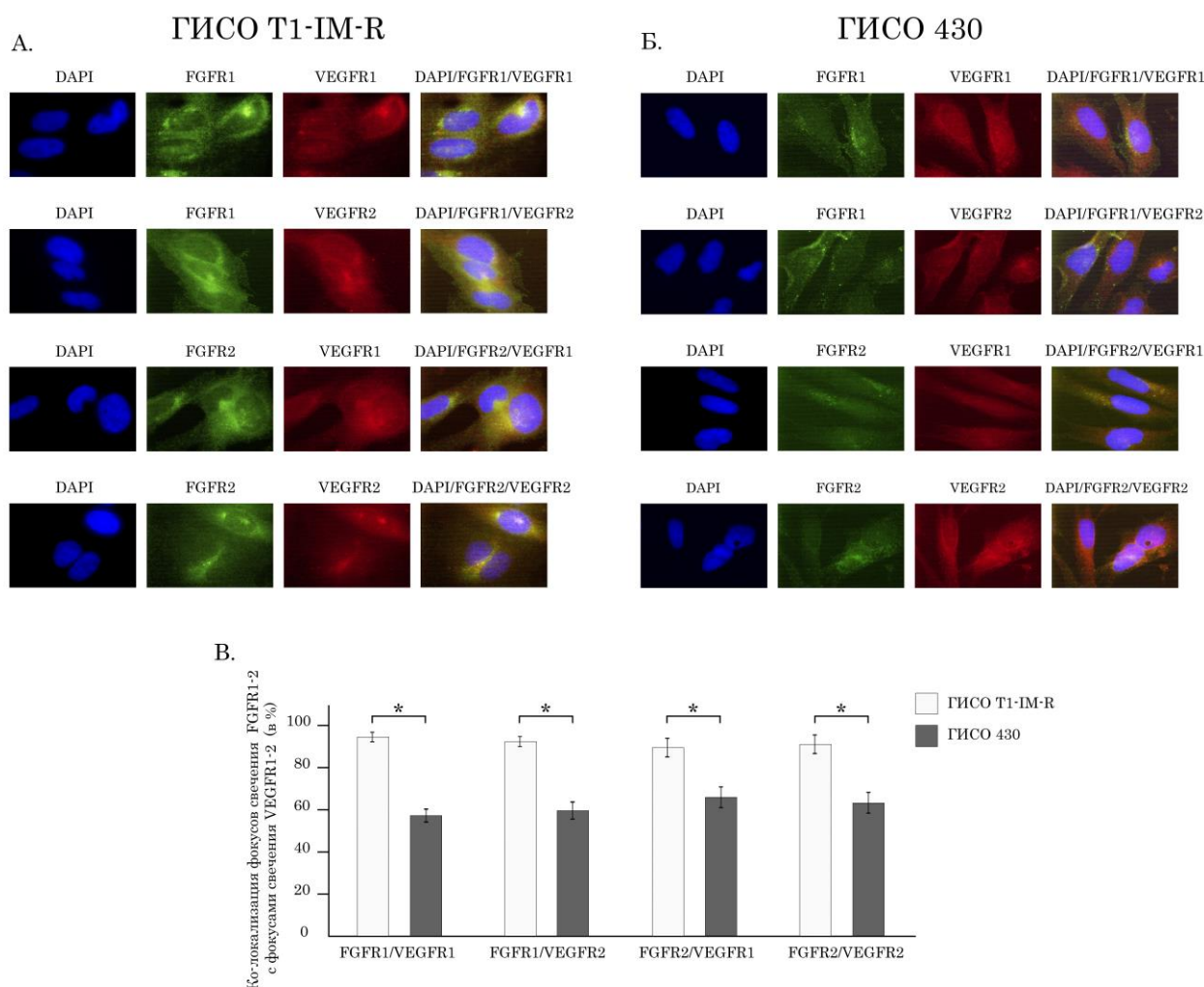


Рисунок 18 – Иммунофлуоресцентная микроскопия рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (А) и ГИСО 430 (Б) при увеличении 100х. На ко-локализацию рецепторов FGFR1/VEGFR1, FGFR1/VEGFR2, FGFR2/VEGFR1, FGFR2/VEGFR2 указывает желтое свечение. Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI; В – количественный анализ ко-локализации рецепторов FGFR1/VEGFR1, FGFR1/VEGFR2, FGFR2/VEGFR1, FGFR2/VEGFR2.

В тоже время, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаружилось структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2, что подтверждается отсутствием ко-иммунопреципитации рецепторов и низкой степенью их ко-локализации (см. Рисунок 17, 18).

Модуляции чувствительности клеток ГИСО к VEGFR-ингибиторам посредством ингибирования FGFR-сигналлинга

Поскольку в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, была обнаружена структурная и функциональная

взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2, то далее исследовалась способность селективного ингибитора FGFR-рецепторов (BGJ398) модулировать чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО (Рисунок 19).

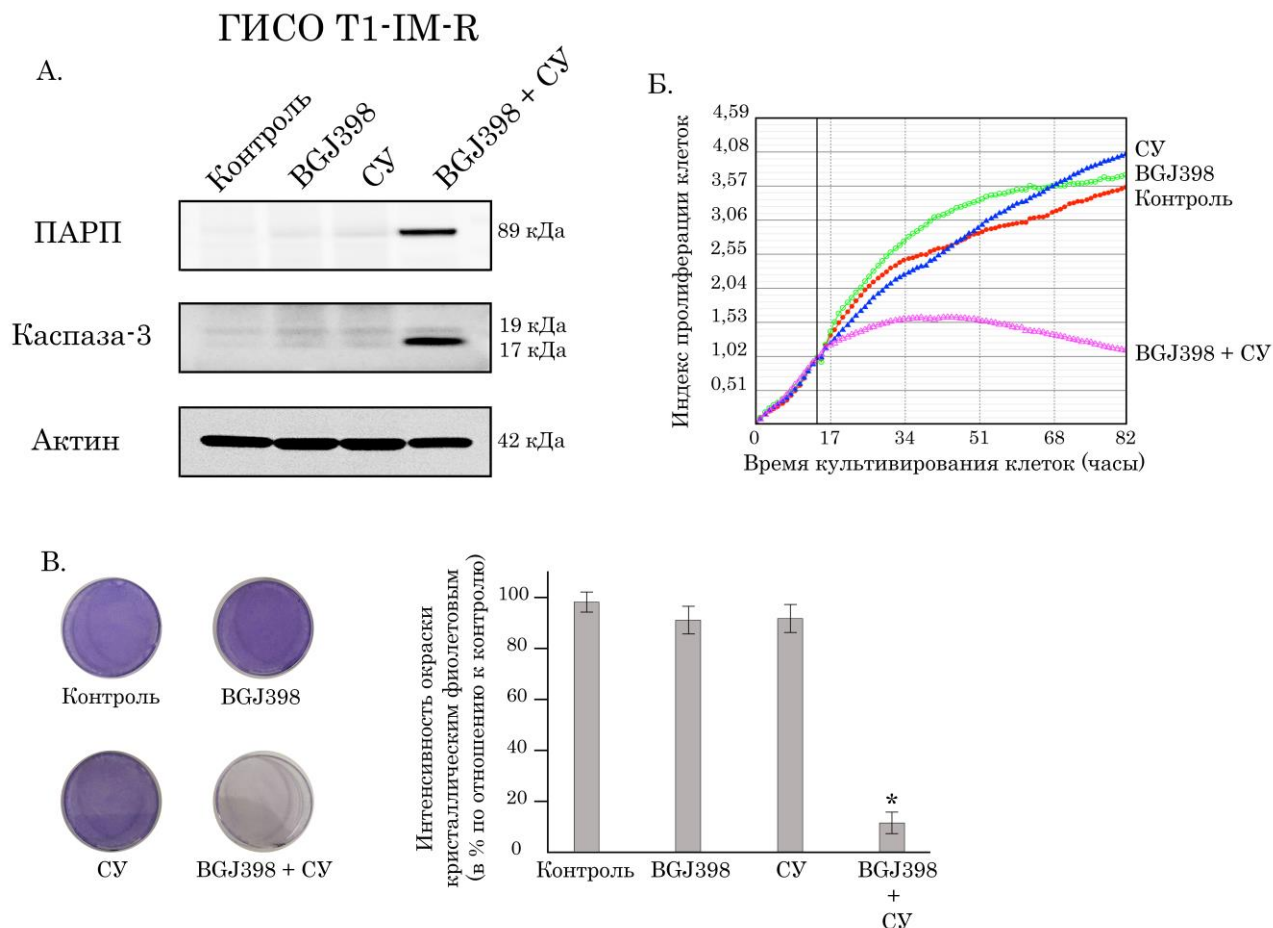


Рисунок 19 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность СУ (0,5 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. А – Исследование апоптоза клеток ГИСО T1-IM-R методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); В – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R раствором кристаллического фиолетового; * - $p < 0,01$.

При использовании комбинации селективного ингибитора FGFR-сигнального пути (BGJ398) с ингибитором VEGFR-сигнального пути (СУ) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R по механизму апоптоза, что подтверждалось резким увеличением экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3, снижением индекса пролиферации опухолевых клеток и низкой интенсивностью окраски чашек Петри раствором кристаллического

фиолетового (Рисунок 19). Аналогичные результаты были получены при использовании BGJ398 в комбинации с другим ингибитором VEGFR-сигналинга (РЕГО).

Развитие цитотоксического и антипролиферативного эффектов было обусловлено синергетическим взаимодействием препаратов (BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО), которое было следствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R. В Таблице 4 продемонстрировано, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма комбинаций препаратов (BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО) был более 10 единиц, что указывает на их синергетическое взаимодействие.

Таблица 4 – Показатель синергизма комбинации ингибиторов VEGFR-сигналинга (СУ, РЕГО) с ингибитором рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) для клеточной линии ГИСО T1-IM-R

Клеточная линия	Комбинация препаратов	Показатель синергизма			
		ZIP	Bliss	Loewe	HSA
ГИСО T1-IM-R	СУ + BGJ398	49,04	49,05	34,45	49,69
	РЕГО + BGJ398	31,03	31,00	11,98	31,07

Примечание – Интерпретация показателя синергизма: > 10 (синергетическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < - 10 (антагонистическое взаимодействие)

Следовательно, селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) способствовали восстановлению чувствительности (т.е. ресенситизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* к к таргетным препаратам СУ и РЕГО (ингибиторам VEGFR-сигналинга).

Таким образом, в процессе развития вторичной резистентности ГИСО к таргетному препарату ИМ, не связанной с возникновением вторичных мутаций *KIT*, в опухолевых клетках происходит изменение киназного профиля: снижается активность с-*KIT*-сигнального пути и повышается активность FGFR- и VEGFR-сигнальных путей (Рисунок 20). Активация FGFR- и VEGFR-сигналинга возникает за счет аутокринной продукции опухолевыми клетками FGF-2 и VEGF-A лигандов. Важно отметить, VEGF-A-индуцированная активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО является вторичным событием, обусловленным гиперпродукцией FGF-2 лиганда и последующей активацией FGFR-сигналинга. За счет FGF-2-опосредованной активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО, развивается их вторичная резистентность к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – сунитинибу и регорафенибу.

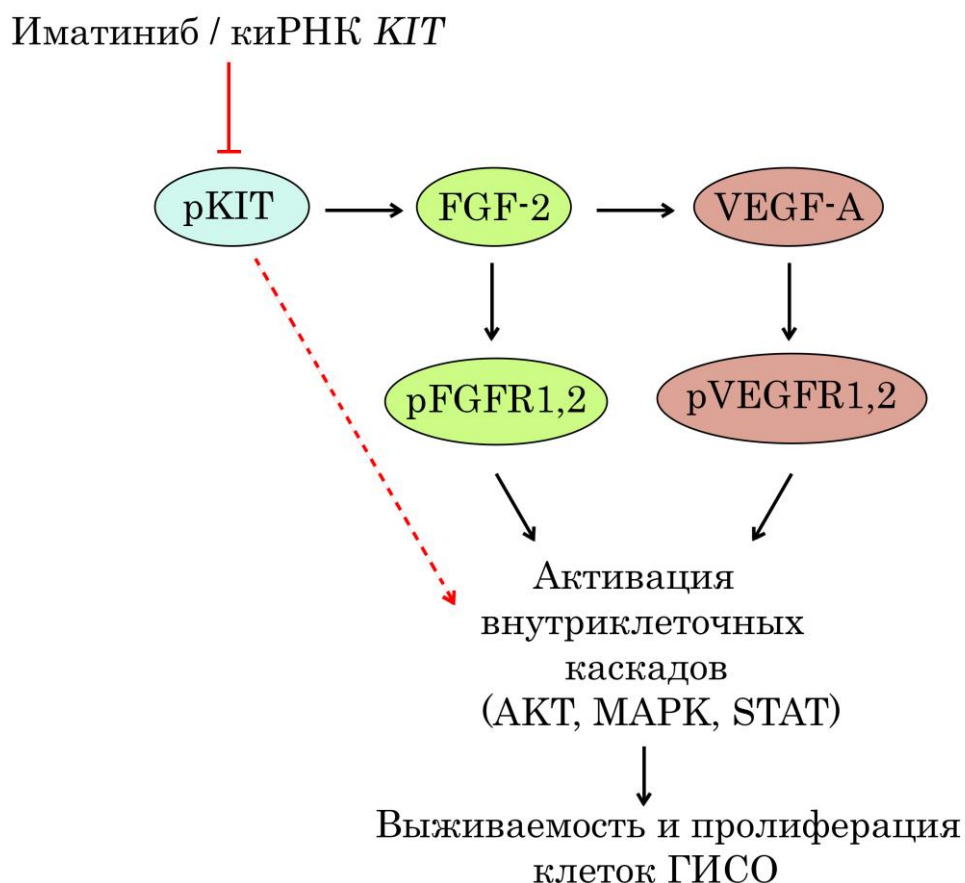


Рисунок 20 – Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО происходит вследствие ингибирования с-KIT-сигналлинга (за счет действия ИМ или нокдауна *KIT* с помощью киРНК *KIT*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе изучена роль рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ в механизмах вторичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам – иматинибу, сунитинибу и регорафенибу. Понимание указанных механизмов позволит разработать новые стратегии таргетной терапии диссеминированных форм ГИСО. Вышеизложенное обуславливает актуальность настоящего диссертационного исследования.

При выполнении экспериментальной работы было впервые установлено, что в клетках ГИСО в процессе развития вторичной резистентности к таргетному препарату иматинибу происходит изменение киназного профиля, заключающегося в снижении уровней экспрессии общей и фосфорилированной форм с-KIT, что сопровождается утратой молекулярной мишени для данного таргетного препарата. Кроме этого, в иматиниб-резистентных клетках ГИСО обнаружены признаки активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что

проявлялось повышением экспрессии рецепторных (FGFR1-2, VEGFR1-2) и нерецепторных (STAT1, MAPK- и АКТ) тирозинкиназ.

Полученные результаты позволяют уточнить диагностические критерии прогрессирования ГИСО. В частности, повышение концентрации FGF-2 и VEGF-A лигандов в сыворотке крови пациентов с ГИСО может рассматриваться в качестве маркера прогрессирования заболевания и формирующейся резистентности опухоли к таргетному препарату иматинибу. Высокие уровни FGF-2 и VEGF-A лигандов в первичных ГИСО являются основанием для проведения повторного молекулярно-генетического исследования опухолевого материала с целью последующей коррекции таргетной терапии.

В настоящей работе впервые было показано, что FGF-2 лиганд индуцирует продукцию VEGF-A в иматиниб-чувствительных и резистентных клетках ГИСО. FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A лиганда была значимо более выражена в иматиниб-резистентных клетках ГИСО с отсутствием вторичных мутаций *KIT*. Впервые было установлено, что VEGF-A-индуцированная активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО является вторичным событием, обусловленным гиперпродукцией FGF-2 лиганда и последующей активацией FGFR-сигналинга. Кроме того, было обнаружено, что клетки ГИСО с фенотипическими признаками резистентности к иматинибу являются гетерогенной популяцией, состоящей из клонов опухолевых клеток, различающихся по уровню экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT.

Таким образом, полученные результаты сообщают новые сведения о патогенезе ГИСО и позволяют уточнить современные представления о механизмах резистентности опухолевых клеток к таргетным препаратам. Важно отметить, что представленные в диссертационной работе результаты согласуются с данными современных научных исследований, указывающих на возможность развития в опухолевых клетках альтернативных механизмов активации внутриклеточных каскадов, направленных на поддержание их жизнеспособности, пролиферации и миграции в условиях действия таргетных препаратов.

ВЫВОДЫ

1) В иматиниб-резистентных клетках ГИСО с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* обнаружены признаки активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что проявляется повышенной экспрессией общих и фосфорилированных форм рецепторных (FGFR1-2, VEGFR1-2) и нерецепторных (STAT1, MAPK и АКТ) тирозинкиназ, адаптерных белков FGFR-сигналинга (FRS-2), а также соответствующих лигандов FGF-2 и VEGF-A. Данные процессы происходят на фоне снижения уровней экспрессии общей и

фосфорилированной форм с-KIT, что свидетельствует о переключении киназно-опосредованного сигналинга, регулирующего процессы жизнеспособности, пролиферации и апоптоза иматиниб-резистентных ГИСО.

2) Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО происходит аутокринным путем и является результатом гиперпродукции FGF-2 лиганда опухолевыми клетками, возникающей в результате ингибирования с-KIT-сигналинга. За счет FGFR-сигналинга в клетках ГИСО возникает альтернативная активация внутриклеточных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), способствующих их пролиферации и развитию вторичной резистентности к таргетному препарату иматинибу.

3) В клетках ГИСО с фенотипическими признаками резистентности к иматинибу обнаружена структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами с-KIT и FGFR1-2, о чем свидетельствуют результаты ко-иммунопреципитации данных рецепторов и высокая степень их ко-локализации. Применение таргетного препарата иматиниба в комбинации с селективными ингибиторами FGFR-сигналинга (BGJ398, AZD4547, TAS-120) оказывало выраженный цитотоксический и антипролиферативный эффекты в отношении иматиниб-резистентных клеток ГИСО.

4) Иматиниб-резистентные клетки ГИСО являются гетерогенной популяцией, состоящей из клонов опухолевых клеток, различающихся по уровню экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT. В иматиниб-резистентных KIT-негативных клетках ГИСО отмечается повышенная экспрессия FGF-2 лиганда, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2, фосфорилированной формы белка FRS-2, что является следствием гиперэкспрессии FGF-2, FGFR1, FGFR2. Это обуславливает их исключительно высокую чувствительность к ингибиторам FGFR-сигнального пути по сравнению с другими клонами ГИСО.

5) FGF-2 лиганд индуцирует продукцию VEGF-A иматиниб-чувствительными и резистентными клетками ГИСО. FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A была более выражена в клетках ГИСО с признаками вторичной резистентности к иматинибу. В условиях нокдауна *KIT* в иматиниб-чувствительных клетках ГИСО происходит активация VEGFR-сигнального пути, что подтверждается увеличением уровня экспрессии VEGF-A лиганда, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 и способствует формированию вторичной резистентности к ингибиторам VEGFR-сигналинга (сунитиниб, регорафениб).

6) В клетках ГИСО с фенотипическими признаками резистентности к иматинибу отмечалась структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2, что подтверждалось

результатами ко-иммунопреципитации данных рецепторов и высокой степенью их ко-локализации. Использование селективного ингибитора FGFR-рецепторов (BGJ398) в комбинации с ингибиторами VEGFR-сигналинга (сунитиниб, регорафениб) проявлялось выраженным синергизмом в отношении иматиниб-резистентных ГИСО и индуцировало их гибель по механизму апоптоза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) Повышение уровня экспрессии FGF-2 и VEGF-A лигандов в ГИСО и их концентрации в сыворотке крови у пациентов с данными злокачественными новообразованиями может рассматриваться в качестве одного из маркеров прогрессирования заболевания и свидетельствовать о формирующейся резистентности опухоли к иматинибу, что будет основанием для проведения повторного молекулярно-генетического исследования опухолевого материала с целью последующей коррекции проводимой таргетной терапии.

2) Наличие в клетках ГИСО повышенной экспрессии маркеров FGFR-сигнального пути (FGF-2 лиганда, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2) является предпосылкой для возможной активации VEGFR-сигнального пути в опухолевых клетках и основанием для назначения препаратов второй и третьей линии таргетной терапии – сунитиниба и регорафениба, ингибирующих VEGFR-сигнальный путь.

3) В качестве таргетной терапии иматиниб-резистентных ГИСО с отсутствием вторичных мутаций *KIT* и обнаруженными признаками активации FGFR-сигнального пути перспективным является применение комбинации иматиниба с селективными ингибиторами FGFR-рецепторов (инфигратиниб).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, что комбинация таргетного препарата иматиниба с селективными ингибиторами FGFR-сигналинга (BGJ398, AZD4547, TAS-120) оказывала выраженный цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении иматиниб-резистентных клеток ГИСО *in vitro*. Аналогичные результаты *in vitro* были получены при комбинированном использовании ингибитора FGFR-сигналинга (BGJ398) и VEGFR-ингибиторов (сунитиниб, регорафениб). Полученные результаты требуют экспериментального подтверждения *in vivo* на ксенографтных моделях ГИСО с использованием иммунодефицитных мышей. В случае успешного выполнения указанной научной задачи открываются перспективы для планирования клинических испытаний по изучению

эффективности применения комбинаций ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей для лечения метастатических, неоперабельных и рецидивирующих форм ГИСО.

Для дальнейшего изучения механизмов резистентности ГИСО к таргетным препаратам, необходимо исследовать способность VEGF-A лиганда индуцировать миграцию, инвазию и колониобразование иматиниб-резистентных опухолевых клеток. Кроме того, перспективным направлением исследований является изучение активации FGFR-сигналинга в клетках ГИСО в условиях нокдауна VEGF-A и VEGFR1-3. Результаты обозначенных экспериментов позволят уточнить молекулярные механизмы развития и прогрессирования ГИСО.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Галембикова, А.Р. Оценка чувствительности гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) к химиопрепаратам различных групп / А.Р. Галембикова, **П.Д. Дунаев**, С.В. Бойчук // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 255.

2. Галембикова, А.Р. Исследование химиочувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей линии T-1 in vitro / А.Р. Галембикова, **П.Д. Дунаев** // Сборник тезисов XXII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2016». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 21-23.

3. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are novel potent anticancer agents that affect tubulin polymerization, induce G2/M cell-cycle arrest, and effectively inhibit soft tissue cancer cell growth in vitro / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Anti-Cancer Drugs**. – 2016. – Vol. 27, № 7. – P. 620-634. (Scopus, WOS, Q3)

4. Дунаев, П.Д. Влияние пивалоил-замещенных пиррол-содержащих гетероциклических соединений на апоптоз клеток иматиниб-резистентной линии ГИСО / **П.Д. Дунаев**, А.Р. Галембикова, Р.Р. Хуснутдинов // Сборник тезисов 23-й Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии-2017». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 75-77.

5. Бойчук, С.В. Иматиниб ингибирует процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывает сенситизацию клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа / С.В. Бойчук, **П.Д. Дунаев**, А.Р. Галембикова // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – № 4. – С. 93.

6. Получение иматиниб-резистентного субклона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли и исследование его чувствительности к химиопрепаратам / П.Д. Дунаев, С.В. Бойчук, А.Р. Галембикова, Р.Р. Хуснутдинов // **Казанский медицинский журнал.** – 2017. – №6. – С. 993-997. (*BAK K1*)
7. Пивалоил-замещенные 2-пирролоны индуцируют гибель гастроинтестинальных стромальных опухолей, резистентных к иматинибу и химиопрепаратам / А.Р. Галембикова, С.В. Бойчук, П.Д. Дунаев [и др.] // **Вопросы онкологии.** – 2017. – № 1. – С. 135-140. (*Scopus Q4*)
8. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Molecules.** – 2017. – Vol. 22, № 12. – P. 2152. (*Scopus, WOS, Q2*)
9. Inhibition of fibroblast growth factor receptor-signaling sensitizes imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors to low doses of topoisomerase II inhibitors / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Anti-Cancer Drugs.** – 2018. – Vol. 29, № 6. – P. 549-559. (*Scopus, WOS, Q3*)
10. Activation of FGFR-signaling mediates resistance of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to imatinib (IM) / E. Garanina, S. Boichuk, **P. Dunaev** [et al.] // Abstracts of the 52 nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «Precision medicine for healthy ageing» (Barcelona, 2018). – European journal of clinical investigation. – 2018. – Vol. 48. – P. 159.
11. Novel molecular mechanisms affecting sensitivity of imatinib (IM)-resistant gastrointestinal stromal tumors to the topoisomerase type II inhibitors / E. Garanina, S. Boichuk, **P. Dunaev** [et al.] // Abstracts of the 52 nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «Precision medicine for healthy ageing» (Barcelona, 2018). – European journal of clinical investigation. – 2018. – Vol. 48. – P. 160-161.
12. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates (EAPCs) exhibit the potent cytotoxic and anti-tumor activities against imatinib (IM)-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) / S. Boichuk, **P. Dunaev**, A. Galembikova [et al.] // Abstracts of the Annual Scientific Meeting of the American society for cell biology «ASCB/EMBO-2018 meeting». – San Diego, 2018. – P. 261-262.
13. Targeting of FGFR-Signaling enhances sensitivity of Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) to Imatinib (IM) / S. Boichuk, **P. Dunaev**, A. Galembikova [et al.] // Abstracts of the Annual Scientific Meeting of the American society for cell biology «ASCB/EMBO-2018 meeting». – San Diego, 2018. – P. 911.
14. Targeting of FGF-Signaling Re-Sensitizes Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) to Imatinib In Vitro and In Vivo / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Molecules.** – 2018. – Vol. 23, № 10. – P. 2643. (*Scopus, WOS, Q2*)

15. Ethyl-amino-pyrrole-3-carboxylates are active against imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors in vitro / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Anti-Cancer drugs**. – 2019. – Vol. 30, № 5. – P. 475-484. (*Scopus*, *WOS*, *Q3*)
16. Inhibition of FGFR-signalling pathway modulates sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to imatinib / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // 12th Annual Meeting of the 2019 Korean Society of Medical Oncology and 2019 International Conference. – Seoul, 2019. – P. 97.
17. Inhibition of FGFR2-signaling attenuates a homology-mediated DNA repair in GIST and sensitizes them to DNA-topoisomerase II inhibitors / S. Boichuk, **P. Dunaev**, A. Galembikova [et al.] // **International journal of molecular sciences**. – 2020. – Vol. 21, № 1. – P. 352. (*Scopus*, *WOS*, *Q1*)
18. Inhibition of FGF2-mediated signaling in GIST - Promising approach for overcoming resistance to imatinib / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Cancers**. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 1674. (*Scopus*, *WOS*, *Q1*)
19. 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, **P. Dunaev** [et al.] // **International journal of molecular sciences**. – 2020. – Vol. 21, № 22. – P. 8842. (*Scopus*, *WOS*, *Q1*)
20. 2-APCAs, the Novel Microtubule Targeting Agents Active Against Distinct Cancer Cell Lines / S. Boichuk, A. Galembikova, **P. Dunaev** [et al.] // **Molecules**. – 2021. – Vol. 26, № 3. – P. 616. (*Scopus*, *WOS*, *Q2*)
21. Infigratinib (BGJ 398), a Pan-FGFR Inhibitor, Targets P-Glycoprotein and Increases Chemotherapeutic-Induced Mortality of Multidrug-Resistant Tumor Cells / S. Boichuk, **P. Dunaev**, I. Mustafin [et al.] // **Biomedicines**. – 2022. – Vol. 10, № 3. – P. 601. (*Scopus*, *WOS*, *Q1*)
22. Development of a cas9-expressing gastrointestinal stromal tumor cell line T1-1M-R / V. Skripova, D. Firsova, **P. Dunaev** [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2022. – Vol. 33, Suppl. 8. – P. S1413(97P).
23. Чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к инфигратинибу (BGJ398) обусловлена повышенной экспрессией рецептора фактора роста фибробластов 2-го типа (FGFR2) / **П.Д. Дунаев**, В.С. Скрипова, Р.Г. Киямова [и др.] // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2022. – № 4 (приложение). – С. 100.
24. **Дунаев П.Д.** Ингибиторы FGF/FGFR-сигнального пути (NSC-12, PD173074) повышают чувствительность иматиниб-резистентных клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к регарофенибу / **П.Д. Дунаев**, С.В. Бойчук // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2023. – № 4 (приложение). – С. 102-103.

25. Unraveling the Mechanisms of Sensitivity to Anti-FGF Therapies in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) Lacking Secondary KIT Mutations / S. Boichuk, **P. Dunaev**, V. Skripova [et al.] // **Cancers**. – 2023. – Vol. 15, № 22. – P. 5354. (*Scopus*, *WOS*, *Q1*)

26. Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих гетероциклических соединений / А.Р. Галембикова, **П.Д. Дунаев**, Т.В. Ивойлова [и др.] // **Успехи молекулярной онкологии**. – 2024. – №2. – С. 130-146. (*BAK K2*, *Scopus Q4*)

27. Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Activates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST): An Autocrine Mechanism Contributing to Imatinib Mesylate (IM) Resistance / S. Boichuk, **P. Dunaev**, A. Galembikova [et al.] // **Cancers**. – 2024. – Vol. 16, № 17. – P. 3103. (*Scopus*, *WOS*, *Q1*)

28. **Дунаев, П.Д.** Синергизм ингибиторов FGF/FGFR- и VEGF/VEGFR-сигнальных путей в отношении иматиниб-резистентных клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей / П.Д. Дунаев, А.Р. Галембикова, С.В. Бойчук // **Успехи молекулярной онкологии**. – 2024. – № 4 (приложение). – С. 99-100.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

анти-FGF-2 мАТ – моноклональные антитела, нейтрализующие FGF-2

АТ – антитела

ГИСО – гастроинтестинальная стромальная опухоль

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИМ – иматиниба мезилат

ИФА – иммуноферментный анализ

киРНК *KIT* – короткая интерферирующая рибонуклеиновая кислота, используемая для нокдауна *KIT*

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПАРП – поли-АДФ(рибоза)-полимераза

СУ – сунитиниб

РЕГО – регорафениб

AZD4547 – селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4

BGJ398 – селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4

FGF-2 – фактор роста фибробластов 2 типа, лиганд рецепторов FGFR1-4

FGFR1-4 – рецепторы 1-4 типа фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2)

IC₅₀ – концентрация препарата, вызывающая 50% ингибирование выживаемости клеток ГИСО

t° - температура

TAS-120 – селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4

VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов, лиганд рецепторов VEGFR1-2

VEGFR1-3 – рецепторы 1-3 типа белков семейства фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)