

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ДУНАЕВ ПАВЕЛ ДМИТРИЕВИЧ

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

3.3.3 – Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук,

профессор

Бойчук Сергей Васильевич

Казань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1 Клинико-морфологические особенности ГИСО.....	19
1.2 Генетические особенности ГИСО.....	28
1.3 Принципы таргетной терапии ГИСО.....	38
1.3.1 Препарат первой линии таргетной терапии ГИСО – иматиниб.....	38
1.3.2 Препарат второй линии таргетной терапии ГИСО – сунитиниб.....	41
1.3.3 Препарат третьей линии таргетной терапии ГИСО – регорафениб.....	43
1.4 Механизмы резистентности ГИСО к таргетным препаратам.....	46
1.4.1 Механизмы первичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам.....	46
1.4.2 Механизмы вторичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам.....	48
1.5 Роль FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в патогенезе злокачественных новообразований.....	51
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
2.1 Характеристика объекта и предмета исследования.....	57
2.2 Культивирование и хранение клеточных линий ГИСО.....	58
2.3 Таргетные препараты и антитела, используемые для выполнения экспериментов.....	61
2.4 Анализ цитотоксической активности таргетных препаратов с помощью колориметрического МТТ-теста.....	62
2.5 Изучения синергизма комбинации препаратов в отношении клеточных линий ГИСО.....	63
2.6 Оценка пролиферации клеток ГИСО с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США).....	64
2.7 Окраска клеток ГИСО фиксирующим раствором кристаллического фиолетового.....	64
2.8 Анализ экспрессии клеточных белков методом иммуноблоттинга.....	65
2.9 Оценка взаимодействия между клеточными белками методом коиммунопреципитации.....	67

2.10 Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназных рецепторов в клетках ГИСО.....	68
2.11 Нокдаун <i>KIT</i> в клетках ГИСО с помощью трансфекции короткой интерферирующей РНК.....	69
2.12 Анализ экспрессии генов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей и вторичных мутаций <i>KIT</i> в клеточных линиях ГИСО.....	70
2.13 Оценка экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT в клетках ГИСО методом проточной цитометрии.....	71
2.14 Исследование концентрации FGF-2 и VEGF-A в супернатантах ГИСО методом иммуноферментного анализа.....	72
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	73
3.1 Киназный профиль ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линий ГИСО.....	73
3.1.1 Характеристика клеточных линий ГИСО, чувствительных и резистентных к таргетному препарату ИМ.....	73
3.1.2 Экспрессия рецепторных тирозинкиназ в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО.....	81
3.1.3 Экспрессия нерецепторных тирозинкиназ в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО.....	88
3.2 Механизмы активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО и его роль в формировании вторичной резистентности опухолевых клеток к таргетному препарату ИМ.....	93
3.2.1 Исследование активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО в условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT.....	93
3.2.2 Изучение способности фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF-2) индуцировать активацию FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО.....	107
3.2.3 Влияния таргетного препарата ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО.....	114

3.3 Структурное и функциональное взаимодействие между тирозинкиназными рецепторами с-KIT и FGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО и модуляция их чувствительности к ИМ посредством воздействия на FGFR-сигналинг.....	119
3.3.1 Изучение взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT и FGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО.....	119
3.3.2 Модуляция чувствительности ИМ-резистентных клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ посредством ингибирования FGFR-сигналинга.....	125
3.4 Механизмы активации FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных ГИСО со сниженной экспрессией <i>KIT</i> и их чувствительность к ингибиторам FGFR-рецепторов.....	147
3.4.1 Фенотипические признаки <i>KIT</i> -негативной ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО.....	147
3.4.2 Исследование активации FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентной <i>KIT</i> -негативной клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2.....	154
3.4.3 Изучение способности селективных ингибиторов FGFR-рецепторов (BGJ398, AZD4547, TAS-120) оказывать цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентной <i>KIT</i> -негативной клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2.....	157
3.5 Роль фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) в механизмах активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО.....	166
3.5.1 Исследование чувствительности клеток ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути (сунитиниб, регорафениб).....	166
3.5.2 Изучение способности фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) индуцировать активацию VEGFR-сигналинга в клетках ГИСО.....	171
3.5.3 Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО в условиях нокдауна <i>KIT</i>	178
3.6 Исследование взаимодействия между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО и модуляция их чувствительности к VEGFR-ингибиторам посредством ингибирования FGFR-сигнального пути.....	184

3.6.1 Структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО.....	184
3.6.2 Модуляция чувствительности ИМ-резистентных клеток ГИСО к VEGFR-ингибиторам (сунитиниб и регорафениб) посредством ингибирования FGFR-сигналинга.....	191
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	204
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	227
ВЫВОДЫ.....	229
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	231
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	232
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	233
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	235
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	262

ВВЕДЕНИЕ

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 пейсмекерной активностью и задающих ритм сокращений (перистальтики) полых органов ЖКТ [220, 103]. ГИСО составляют до 3% всех злокачественных опухолей ЖКТ. По статистике за 1 год в мире диагностируется 15 случаев ГИСО на 1 млн населениях [54, 216]. 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 [10, 173].

Главным механизмом развития ГИСО являются активирующие мутации *KIT* или *PDGFR*. Данные мутации являются взаимоисключающими. В большинстве случаев в клетках ГИСО отмечается мутация *KIT* (78,5%). Мутация *PDGFR* отмечается в 7,5% случаев ГИСО. В некоторых случаях ГИСО не обнаруживаются мутации *KIT* или *PDGFR*, такой вариант ГИСО обозначается как «ГИСО *KIT/PDGFR* дикого типа» [1, 63]. За счет активирующих мутаций *KIT* или *PDGFR* возникает гиперактивация соответствующих тирозинкиназных рецепторов с-*KIT* (CD117, рецептор факторов роста тучных и стволовых клеток) или *PDGFR* α (α -рецептор тромбоцитарного фактора роста). В результате этого в клетках ГИСО возникает лиганд-независимая активация внутриклеточных сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), обеспечивающих жизнеспособность, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [178, 231].

В большинстве случаев ГИСО состоит из клеток веретеновидной формы, в которых отмечается гиперэкспрессия тирозинкиназного рецептора с-*KIT*. Кроме того, в клетках ГИСО отмечаются дополнительные иммуногистохимические

маркеры, которые позволяют дифференцировать данные злокачественные новообразования от других опухолей ЖКТ, имеющих мезенхимальное происхождение: мембранный белок CD34, гладкомышечный актин, S-100 протеин и десмин. В 2004 году был выявлен новый иммуногистохимический маркер ГИСО – белок DOG1, который обнаруживается в 98% ГИСО, в том числе, в случае отрицательной реакции на c-KIT [8, 11, 127].

В качестве первой линии терапии пациентов с ГИСО используется таргетный препарат иматиниба мезилат (ИМ), являющийся неселективным ингибитором тирозинкиназных рецепторов c-KIT и PDGFR α . Воздействие препарата на клетки ГИСО существенным образом замедляет скорость их пролиферации и вызывает последующую гибель по механизму апоптоза. Тем не менее, несмотря на изначально высокую терапевтическую эффективность ИМ, через определенный промежуток времени (1.5- 2 года) после начала проведения таргетной терапии более чем у 50% пациентов с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими формами ГИСО развивается резистентность к ИМ [121, 149].

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 c-KIT и PDGFR α , а также рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1-3) и другие рецепторные и нереперторные 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 [47, 109]. Попытки использования ингибиторов тирозинкиназ нового поколения (нилотиниба, масатиниба, сорафениба, пазопаниба, довитиниба и др.) в терапии пациентов с ИМ-резистентными ГИСО не внесли существенных изменений в характер течения заболевания и его прогноз [176, 214].

Развитие вторичной резистентности клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ может быть следствием различных механизмов. В клетках ГИСО могут возникнуть вторичные мутации *KIT* или *PDGFR*, в результате которых изменяется структура тирозинкиназных рецепторов с-*KIT* и *PDGFR* α , что нарушает взаимодействие с ними препарата ИМ [149]. Кроме того, вторичная резистентность клеток ГИСО к ИМ может быть обусловлена снижением экспрессии рецепторов с-*KIT* и *PDGFR* α , а также активацией в опухолевых клетках других рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ. Например, в клетках ГИСО на фоне таргетной терапии ИМ продемонстрирована активация рецепторных тирозинкиназ *MET*, *AXL* и нерецепторной тирозинкиназы *FAK*, которые способны запускать внутри клеток альтернативную активацию сигнальных каскадов (*JAK-STAT*, *RAS-RAF-MAPK*, *PI3K-AKT-mTOR*), и, тем самым, поддерживать их пролиферацию [124, 175].

В настоящее время важная роль *FGFR*- и *VEGFR*-сигнальных путей была показана в патогенезе различных злокачественных новообразований: рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка, рак толстой кишки, рак печени и желчевыводящих путей, злокачественные опухоли костной ткани [73, 83, 223]. Активация *FGFR*-сигнального пути в опухолевых клетках возникала за счет мутаций *FGFR1-4*, что обуславливало гиперэкспрессию соответствующих рецепторов. В результате, в опухолевых клетках активизировались внутриклеточные сигнальные каскады (*JAK-STAT*, *RAS-RAF-MAPK*, *PI3K-AKT-mTOR*), обеспечивающие их пролиферацию [55, 91]. Кроме того, активация *FGFR*-сигнального пути в опухолевых клетках может быть обусловлена ауторинной продукцией *FGF*-лигандов или их паракринной продукцией клетками микроокружения опухоли (фибробластами, макрофагами, эндотелиальными клетками и др.). Например, гиперпродукция фактора роста фибробластов 2 типа (*FGF-2*), который является лигандом рецепторов *FGFR1-4*, отмечается при лейкозах, раке легких и раке молочной железы [98, 136]. Показано, что за счет активации *FGFR*-сигналинга развивалась резистентность опухолевых клеток к таргетным препаратам, например, клеток немелкоклеточного рака легкого к

гефетинибу – ингибитору рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) [160].

Аналогичным образом, в опухолевых клетках возможны активирующие мутации *VEGFR1-3*, что индуцирует гиперэкспрессию соответствующих рецепторов и запуск VEGFR-сигнального пути [161]. Показано, что активация VEGFR-сигнального пути в опухолевых клетках может быть обусловлена аутокринной продукцией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), который является лигандом рецепторов VEGFR1-2 [189]. Повышение в сыворотки больного уровня VEGF-A является неблагоприятным признаком, указывающим на прогрессирование роста опухоли и развитие резистентности к таргетным препаратам [42, 230]. Продemonстрировано, что VEGF-A способен оказывать иммуносупрессивное действие в отношении дендритных клеток и цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов подавляя, тем самым, противоопухолевый иммунный ответ [83, 230].

Показана взаимосвязь между FGFR- и VEGFR-сигнальными путями в опухолевых клетках. Например, в клетках рака молочной железы FGF-2 лиганд связываясь с рецептором FGFR1 усиливал продукцию VEGF-A и гиперэкспрессию рецептора VEGFR1 [217]. Кроме того, показано, что FGF-2 связываясь с внутриклеточной MAPK (ERK1/2)-киназой усиливал экспрессию рецептора VEGFR2 на мембране эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и клетках меланомы [90].

Продemonстрирована активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО на фоне развития их вторичной резистентности к ИМ [2, 3]. В частности, в ИМ-резистентных клетках ГИСО отмечалась гиперэкспрессия рецептора FGFR3 [65, 94]. Тем не менее, роль FGF-2 лиганда и рецепторов FGFR1-2 в механизмах активации FGFR-сигналинга в клетках ГИСО остаются не изученными. Кроме того, в литературе отсутствуют данные об активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО на фоне развития их вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ.

Все 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

Изучение роли рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ в механизмах резистентности опухолевых клеток к таргетным препаратам является перспективным направлением в современной молекулярной онкологии. Данные исследования позволяют определить новые молекулярные мишени для разработки эффективных стратегий таргетной терапии злокачественных новообразований.

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 (ХМЛ). В 2000 г. ИМ был впервые применен для лечения 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* [77, 234].

Вследствие развития резистентности ГИСО к ИМ, в 2000-е годы были зарегистрированы препараты второй линии терапии – СУ и третьей линии терапии – РЕГО. СУ и РЕГО – мультикиназные ингибиторы, мишенью которых являются рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1-3). СУ способен ингибировать и другие тирозинкиназные рецепторы: с-KIT, β -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), Fms-подобную рецепторную тирозинкиназу-3 (FLT-3), рецептор колониостимулирующего фактора 1-го типа (CSF-1R) и рецептор нейротрофического глиального фактора (RET) [188]. Кроме ингибирования VEGFR-сигналинга РЕГО индуцирует блокировку следующих

тирозинкиназных рецепторов: c-KIT, PDGFR β и RET, а также ингибирует внутриклеточную киназу RAF-1 [231]. Тем не менее, в клетках ГИСО развивается вторичная резистентность к СУ и РЕГО [47, 109].

Механизмы вторичной резистентности клеток ГИСО к указанным таргетным препаратам остаются до конца не изученными. В частности, отсутствует информация об активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО. Следовательно, роль аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A лигандов опухолевыми клетками ГИСО с последующей активацией в них FGFR- и VEGFR-сигналинга требует экспериментального подтверждения. 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-сигналинга 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-сигналинга.

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 *c-KIT* развивается гетерогенность ГИСО с формированием клонов опухолевых клеток, имеющих различный уровень экспрессии тирозинкиназного рецептора *c-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 коиммунопреципитации; 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 были представлены на следующих 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 2025г.).

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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клинико-морфологические особенности ГИСО

ГИСО представляют собой злокачественные новообразования ЖКТ, имеющие мезенхимальное происхождение. ГИСО развиваются из интерстициальных клеток Кахаля, обладающих пейсмекерной активностью и задающих ритм сокращений (перистальтики) полых органов ЖКТ. Интерстициальные клетки Кахаля образуют сеть в мышечной оболочке ЖКТ и обеспечивают связь гладкомышечных клеток с нервными окончаниями [103, 220].

Термин «гастроинтестинальная стромальная опухоль» был впервые введен в 1983 году американскими онкологами М. Mazur и Н. Clark для обозначения неэпителиальных опухолей желудочно-кишечного тракта, которые по своим иммуногистохимическим маркерам отличаются от других мезенхимальных опухолей – лейомиом, лейомиосарком, шванном [54, 163]. В середине 1990-х годов термин «гастроинтестинальная стромальная опухоль» был официально зарегистрирован в рамках номенклатуры онкологических заболеваний [247].

ГИСО составляют до 3% всех злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта. Типичной локализацией ГИСО является желудок (60-70%), тонкая кишка (25-35%), ободочная, сигмовидная и прямая кишка (5%). ГИСО выявляется в 94% случаев сарком желудка и в 83% случаев сарком тонкого кишечника. В редких случаях опухоль может выявляться в пищеводе, брыжейке, сальнике, забрюшинном пространстве [50, 173, 216].

В мире диагностируют в среднем от 2 до 20 случаев ГИСО на 1 000 000 населения в год. В США ежегодно регистрируется 5000-10000 новых случаев ГИСО. По статистике, в мире заболеваемость ГИСО у мужчин в 1,5 раза выше, чем у женщин. В тоже время, в России ГИСО встречается чаще у женщин (57,5%), чем у мужчин. Средний возраст больных с ГИСО составляет 55-60 лет [10, 173, 216].

Средний возраст больных с ГИСО в России составляет 54 - 55 лет. Описаны случаи развития ГИСО в детском возрасте. ГИСО может передаваться по наследству вследствие возникновения герминальных мутаций [10, 173, 216].

Главным механизмом развития ГИСО являются первичные активирующие мутации гена *KIT* или гена *PDGFR*. Данные мутации являются взаимоисключающими. В большинстве случаев в клетках ГИСО отмечается мутация гена *KIT* (78,5%). Мутация гена *PDGFR* отмечается в 7,5% случаев ГИСО. Наконец, в 14% случаев ГИСО в опухолевых клетках не обнаруживаются мутации генов *KIT* или *PDGFR*. Такой вариант обозначается как «ГИСО *KIT/PDGFR* дикого типа» [1, 8, 32, 63]. Клетки ГИСО *KIT/PDGFR* дикого типа могут иметь другие генетические изменения. Например, активирующие мутации *SDH*, *RAS*, *BRAF*, *NF1*, а также редкие мутации, приводящие к формированию слитных генов, содержащих фрагменты *NTRK*, *FGFR* и *BRAF* [107]. Эти мутации или слияния фрагментов генов также считаются взаимоисключающими при развитии первичных ГИСО. В тоже время, некоторые из этих редких мутаций могут отмечаться в клетках ГИСО вместе с мутациями *KIT* или *PDGFR* [219].

Ген *KIT* кодирует тирозинкиназный рецептор с-*KIT* (CD117), лигандом которого является фактор роста стволовых клеток (Stem cell factor, SCF). Ген *PDGFR* кодирует тирозинкиназный рецептор *PDGFR* α (α -рецептор тромбоцитарного фактора роста), лигандом которого является тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF).

Гены *KIT* и *PDGFR* располагаются на длинном плече 4 хромосомы (4q12). Ген *KIT* состоит из 21 экзона, ген *PDGFR* – из 22 экзонов. Оба гена имеют сходную последовательность нуклеотидов, т.е. являются высокоомологичными: 1-9 экзоны кодируют внеклеточные иммуноглобулин-подобные домены, ответственные за связывание рецептора с лигандом; 10 экзон кодирует трансмембранную часть рецептора; 11 экзон кодирует регуляторный домен, расположенный в цитоплазме на внутренней поверхности клеточной мембраны (юкста-мембранный домен); 13-14 экзоны кодируют цитоплазматический тирозинкиназный домен 1, имеющий АТФ-связывающий участок; 15-16 экзоны

кодируют цитоплазматическую часть рецептора, расположенную между тирозинкиназными доменами («киназная вставка рецептора»); 17-18 экзоны кодируют цитоплазматический тирозинкиназный домен 2 («домен активационной петли»), ответственный за передачу сигнала нижележащим внутриклеточным белкам [183, 186].

За счет активирующих мутаций, возникающих в различных участках *KIT* или *PDGFR α* , происходит гиперактивация соответствующих тирозинкиназных рецепторов с-KIT (CD117, рецептор фактора роста стволовых клеток) или PDGFR α (α -рецептор тромбоцитарного фактора роста). В результате в клетках ГИСО возникает лиганд-независимая активация внутриклеточных сигнальных каскадов (Рисунок 1): 1) JAK-STAT; 2) RAS-RAF-MAPK, 3) PI3K-AKT-mTOR, обеспечивающий жизнеспособность, пролиферацию, миграцию опухолевых клеток и подавление программы их апоптоза [178, 231].

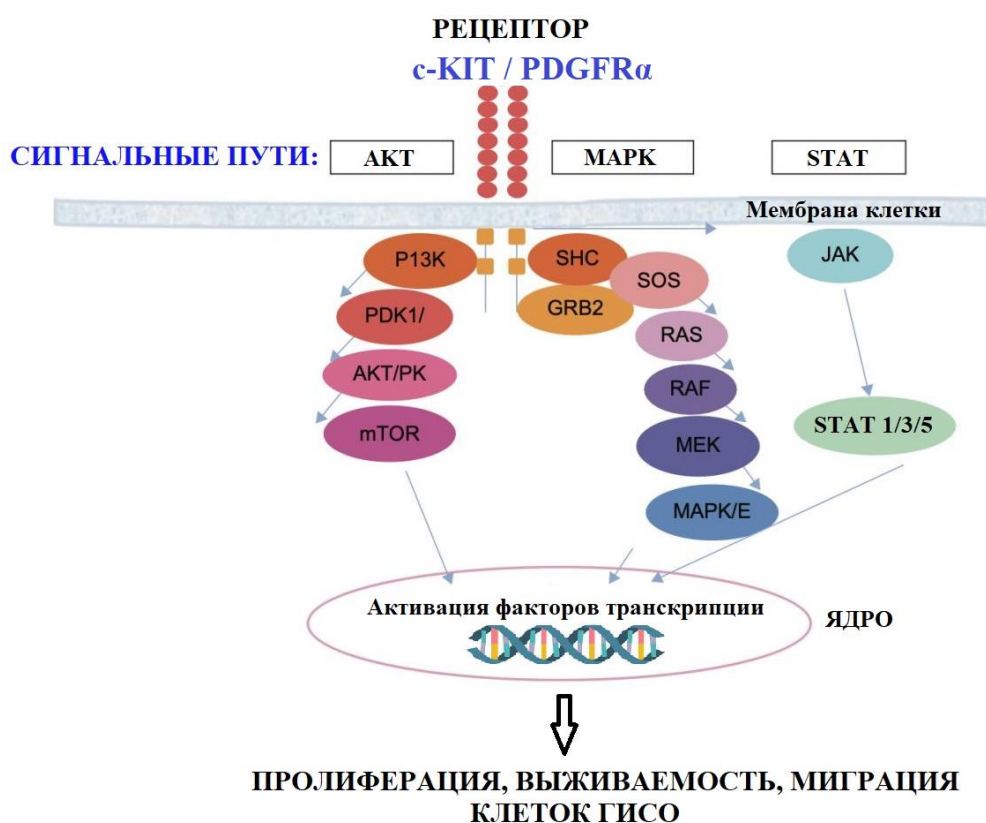


Рисунок 1 – Сигнальные пути в клетках ГИСО: JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR [183]

В развитии указанных сигнальных путей ключевое значение имеют нерецепторные тирозинкиназы STAT1, MAPK и АКТ. Транскрипционный фактор STAT1 играет важную роль в развитии внутриклеточного JAK-STAT-сигнального пути, имеющего значение для активации, пролиферации и выживаемости опухолевых клеток [140, 245]. MAPK-киназа (Erk1/2) участвует в развитии RAS-RAF-MAPK-сигнального пути, являющегося ключевым для деления опухолевых клеток, усиления их миграции и развития ангиогенеза [155, 203]. АКТ-киназа представляет собой ключевой компонент PI3K-AKT-mTOR-сигнального пути, который имеет важное значение для пролиферации и выживаемости опухолевых клеток [39, 205]. Таким образом, нерецепторные тирозинкиназы STAT1, MAPK и АКТ являются важными компонентами внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающих процессы активации и пролиферации опухолевых клеток, их миграции и ангиогенеза, а также подавления апоптоза.

Различают несколько гистологических вариантов ГИСО: 1) веретеновидноклеточный; 2) эпителиоидный; 3) смешанный (Рисунок 2).

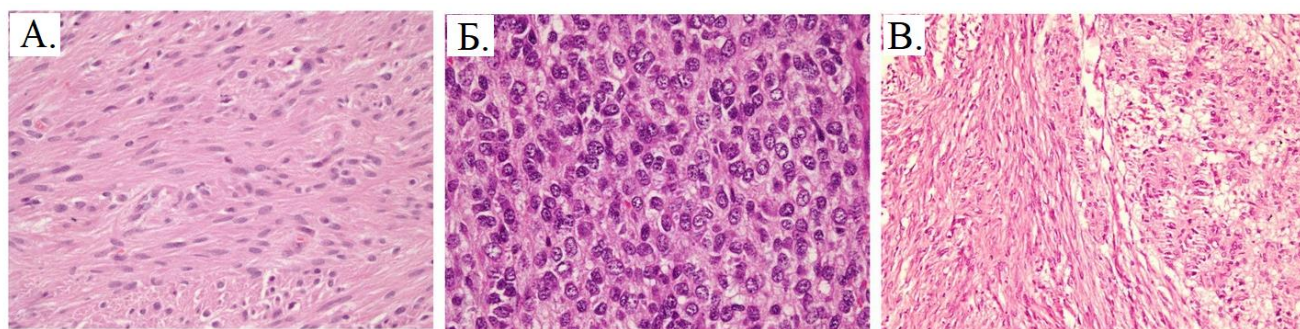


Рисунок 2 – Гистологические варианты ГИСО. Образцы опухолевой ткани ГИСО желудка были окрашены гематоксилином-эозином, увеличение 100х. А – ГИСО веретеновидноклеточного типа; Б – ГИСО эпителиоидного типа; В – ГИСО смешанного типа [13]

ГИСО веретеновидноклеточного типа состоят из вытянутых клеток, по форме напоминающих веретено и формирующих пучки волокнистых структур. В

клетках ГИСО веретеновидно-клеточного типа, как правило, отмечается мутация *KIT*. Веретеновидно-клеточный тип ГИСО является наиболее часто встречаемым (70% случаев ГИСО). ГИСО эпителиоидного типа состоят из клеток овальной формы, которые образуют скопления, обозначаемые «клеточные гнезда». В клетках ГИСО эпителиоидного типа, как правило, отмечается мутация *PDGFRA*. Эпителиоидный тип ГИСО встречается в 20% случаев ГИСО. В 10% случаев отмечается смешанный тип ГИСО, для которого характерно присутствие в опухолевой ткани как веретеновидно-клеточных, так и эпителиоидных участков [12, 13, 82, 141].

Иммуногистохимические маркеры ГИСО

Боле чем в 90% случаев ГИСО состоит из клеток веретеновидной формы, в которых отмечается гиперэкспрессия тирозинкиназного рецептора с-*KIT* (CD117). Поэтому иммуногистохимическое окрашивание анти-с-*KIT* антителами является надежным диагностическим маркером, позволяющим дифференцировать ГИСО от других мезенхимальных злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта. Продемонстрировано, что в 5% случаев ГИСО экспрессия тирозинкиназного рецептора с-*KIT* отсутствует несмотря на наличие мутации *KIT*. В этом случае для диагностики ГИСО необходимо подтверждение мутации *KIT* [229, 127].

Существуют дополнительные иммуногистохимические маркеры, которые позволяют отличить ГИСО от других злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта, имеющих мезенхимальное происхождение: мембранный белок CD34, гладкомышечный актин, S-100 протеин и десмин. В 2004 году был выявлен новый иммуногистохимический маркер ГИСО – белок DOG1 (от англ. «Discovered on GIST-1»), который является трансмембранным протеином, участвующим в транспорте ионов кальция. Белок DOG1 обнаруживается в 98% ГИСО, в том числе в случае отрицательной иммуногистохимической реакции с-*KIT*, что делает его высокоспецифичным маркером данного онкологического заболевания [1, 8, 127, 229].

Клиническая картина ГИСО

ГИСО обычно располагается в мышечной оболочке желудочно-кишечного тракта и растет в сторону просвета органа. Поэтому опухоль часто обнаруживают в подслизистой основе слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. В 80% случаев опухоль, расположенная в подслизистой основе слизистой оболочки желудка, представляет собой ГИСО. Иногда ГИСО может располагаться под брюшиной (субсерозно), а также в толще стенки желудка или кишечника (интрамурально). Размер опухоли варьирует от 1см до 30см, в среднем составляя 5-8см. В редких случаях обнаруживаются ГИСО размером не более 1-2см. Макроскопически ГИСО может представлять собой солидное, кистозное или солидно-кистозное новообразование, окружённое псевдокапсулой. В опухолевой ткани могут присутствовать очаги некроза и кровоизлияния, что способствует различной окраске ГИСО при ее разрезе – от серо-белого до коричневого цвета [153, 190]. Для того чтобы обнаружить в каком слое стенки желудка располагается опухоль применяют эндосонографию – методику при которой ультразвуковой датчик вводится в полость желудка с помощью эндоскопа [21, 26, 66, 153]. Для полного обследования пациента с ГИСО используется компьютерная томография брюшной полости и малого таза с использованием рентгеноконтрастного усиления изображения. В случае расположения ГИСО в области прямой кишки применяется магнитно-резонансная томография [131].

Клинически ГИСО может длительное время иметь бессимптомное течение и обнаруживаться в виде случайной находки во время плановых обследований больных или при развитии неотложных хирургических состояний у пациентов в виде кровотечения, перфорации стенки желудка или кишечника, развития кишечной непроходимости. В частности, при проведении масштабных исследований по изучению клинической картины ГИСО (обследовано более 1000 больных) было обнаружено, что на момент постановки диагноза ГИСО наиболее частым клиническим проявлением заболевания было кровотечение, которое отмечалось у 56% больных с ГИСО желудка и 41% больных с ГИСО тонкой кишки [111, 166]. В случае неосложненной формы ГИСО, которая

характеризуется отсутствием метастазов, применяется хирургическое удаление злокачественного новообразования. Тем не менее, пятилетняя выживаемость пациентов с ГИСО после хирургического удаления опухоли варьирует от 35 до 65%, а безрецидивная выживаемость от 39 до 46% [111, 166].

ГИСО может обнаруживаться у детей и в этом случае имеет некоторые особенности. В частности, опухоль главным образом располагается в желудке с образованием множественных очагов, клетки ГИСО имеют преимущественно эпителиоидную морфологию. Как правило, быстро развиваются метастазы в регионарные лимфатические узлы и печень, характерно развитие желудочного кровотечения. В клетках ГИСО более чем в 80% случаев отсутствуют мутации *KIT* и *PDGFRA*, но отмечается инактивирующая мутация *SDH*, кодирующего митохондриальный ферментный комплекс сукцинатдегидрогеназы. ГИСО в детском возрасте обычно сочетается с другими злокачественными образованиями, т.е. является одним из проявлений специфических онкологических синдромов – триады Карнея, диады Карнея-Стратакиса, о которых будет сказано далее [24, 111, 131, 166, 199].

Оценка прогноза ГИСО

Прогноз ГИСО зависит от нескольких факторов. В частности, риск агрессивного течения ГИСО устанавливается на основании изучения митотического индекса клеток ГИСО, размера опухоли в наибольшем измерении и локализации опухоли [104, 199].

Митотический индекс ГИСО определяется путем подсчета количества митотических клеток на единицу площади опухолевой ткани размером 5 мм² (исследуются 50 полей зрения при увеличении 40х). Благоприятный прогноз характерен для ГИСО размером не более 2 см, имеющих митотический индекс менее 5. Неблагоприятный прогноз характерен для ГИСО, расположенных в тонком кишечнике, прямой кишке, брыжейке или сальнике, и имеющих размер более 2 см, а митотический индекс более 5. Важно отметить, что наличие в клетках ГИСО мутаций *KIT* или *PDGFRA*, гистологический вариант ГИСО, а

также иммуногистохимическое исследование маркера пролиферации клеток Ki-67 не относятся к критериям прогноза заболевания [25, 70, 112].

Характерной особенностью ГИСО является образование метастазов только в брюшной полости. Чаще всего у больных отмечаются метастазы в печень (65%) и в брюшину (21%). Крайне редко встречаются метастазы ГИСО в лимфатических узлах. Метастазы отмечаются у 15-50% больных с ГИСО в момент постановки диагноза [38, 144].

Специфические онкологические синдромы, ассоциированные с ГИСО

В некоторых случаях ГИСО сочетается с развитием у больного других злокачественных новообразований во внутренних органах, что приводит к формированию специфических онкологических синдромов: 1) Триада Карнея; 2) Синдром Карнея-Стратакиса; 3) Нейрофиброматоз I типа; 4) Семейная форма ГИСО.

Триада Карнея – редкий синдром ненаследственной природы, при котором у больного отмечаются множественные злокачественные новообразования: ГИСО желудка, хондрома или гамартохондромы легкого, экстраадренальная параганглиома. Синдром был впервые описан американским патологоанатомом J.A. Carney в 1977 году [23]. К 1999 году J.A. Carney зафиксировал 79 случаев «триады». Заболевание в 85-88% случаев отмечается у молодых женщин и детей. В 82% случаев триада Карнея была диагностирована в возрасте до 30 лет. У больных возникают множественные ГИСО различных размеров, локализующиеся, как правило, в антральном отделе желудка и имеющие эпителиоидную или смешанную морфологию. В клетках ГИСО отсутствуют мутации *KIT* и *PDGFRA*, но отмечается инактивирующая мутация *SDH*, кодирующего митохондриальный ферментный комплекс сукцинатдегидрогеназы. В результате мутации *SDH* нарушается структура субъединиц A, B, C и D фермента сукцинатдегидрогеназы, расположенной на внутренней мембране митохондрий и участвующей в процессе окислительного фосфорилирования. Для ГИСО при триаде Карнея характерна сниженная чувствительность к таргетному препарату иматинибу. У большинства

больных развиваются метастазы в регионарные лимфатические узлы и печень [53, 105].

Синдром Карнея-Стратакиса (диада Карнея-Стратакиса) – редкое генетическое заболевание, при котором у пациентов отмечается ГИСО желудка и параганглиома. Сочетание ГИСО и параганглиомы было обнаружено J.A. Carney и C.A. Stratakis в 2002г. В последствии такая патология была обозначена как «Синдром Карнея-Стратакиса», или «диада Карнея-Стратакиса» [56]. В основе заболевания лежит инактивирующая мутация *SDH*, кодирующего митохондриальный ферментный комплекс сукцинатдегидрогеназы. Клетки ГИСО при синдроме Карнея-Стратакиса имеют эпителиодную морфологию и экспрессируют тирозинкиназный рецептор c-KIT. В клетках ГИСО отсутствуют мутации *KIT* и *PDGFRA*. У больных, как правило, отмечаются множественные ГИСО в желудке. Средний размер опухоли составляет 4-5см. Характерно развитие метастазов в регионарные лимфатические узлы. Клетки ГИСО имеют низкую чувствительность к таргетному препарату иматинибу. Синдром Карнея-Стратакиса наследуется по аутосомно-доминантному типу и обычно проявляется в возрасте до 30 лет [8, 56].

Нейрофиброматоз I типа (нейрофиброматоз с феохромоцитомой, болезнь фон Реклингхаузена, синдром Реклингхаузена) – генетическое заболевание, наследуемое по аутосомно-доминантному типу, при котором у больного отмечаются нейроэндокринные опухоли тонкого кишечника и нейрофибромы. Заболевание описано в 1882 году немецким патологоанатомом Фридрихом фон Реклингхаузенем, который был учеником Рудольфа Вирхова [174]. Заболевание обусловлено возникновением мутаций *NF1*, кодирующего белок нейрофибромин. Белок нейрофибромин является блокатором белка Ras, который относится к внутриклеточным белкам RAS-RAF-MAPK-сигнального пути [26, 108]. В отсутствии белка нейрофибромина в клетках отмечается гиперактивация RAS-RAF-MAPK-сигнального пути, что приводит к их повышенной пролиферации и злокачественной трансформации. При нейрофиброматозе I типа ГИСО обычно локализуется в тонком кишечнике. В клетках ГИСО отсутствуют мутации *KIT* и

PDGFRA, а также не отмечаются мутации *SDH*, кодирующего митохондриальный ферментный комплекс сукцинатдегидрогеназы [4, 108, 182].

Семейная форма ГИСО – характеризуется мутациями *KIT* или *PDGFRA* в половых клетках, которые наследуются по аутосомно-доминантному типу. В 90% случаев герминальные мутации возникают в 11 экзоне *KIT* и характеризуются точечными заменами нуклеотидов в определенных участках (миссенс-мутации). В частности, продемонстрированы миссенс-мутации в положениях W557R, V559D/A/G/I, V560D, L576P. Вследствие указанных миссенс-мутаций в 11 экзоне *KIT* возникает диффузная гиперплазия интрестициальных клеток Кахаля в стенке кишечника, что способствует появлению ГИСО в детском возрасте. Как правило, у пациентов отмечается избыточное количество тучных клеток в тканях (мастоцитоз) и пилальдизм (нарушение миграции меланоцитов, сопровождающееся развитием депигментаций кожи и волос) [88, 89]. Возможно развитие семейной формы ГИСО вследствие герминальной мутации в 9 экзоне *KIT* за счет миссенс-мутации в положении K642E или двух миссенс-мутаций (K642E, V643I) [21, 166]. Семейная форма ГИСО может развиваться вследствие герминальных мутаций *PDGFRA*, например, за счет миссенс-мутации в положении V561D (12 экзон) и P653L (14 экзон). Вследствие герминальных мутаций *PDGFRA* у пациентов развивается семейная форма ГИСО желудка сочетающаяся с воспалительными фиброзными полипами на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта [88, 89, 232]. Важно отметить, что семейная форма ГИСО характеризуется появлением множественных опухолей в желудке и кишечнике. Случаи семейной формы ГИСО являются крайне редкими, т.к. развитие спорадических ГИСО не связано с возникновением герминальных мутаций *KIT* или *PDGFRA*.

1.2 Генетические особенности ГИСО

Как было сказано выше, ГИСО развиваются из интерстициальных клеток Кахаля, обладающих пейсмекерной активностью и задающих ритм сокращений (перистальтики) полых органов желудочно-кишечного тракта [103, 220].

В настоящее время продемонстрировано, что в редких случаях ГИСО могут развиваться из других клеток соединительной ткани. В частности, показана возможность развития ГИСО из гладкомышечных клеток стенки желудка и кишечника [32]. Кроме того, ГИСО могут развиваться из телоцитов [221]. Телоциты – клетки соединительной ткани, которые были описаны в 2007-2010 гг. румынским гистологом Popescu L.M. [192]. Телоциты представляют собой небольшие клетки с длинными тонкими отростками (телоподиями). Они обнаруживаются в строме большинства органов. Телоциты за счет телоподий образуют многочисленные контакты с другими клетками соединительной ткани – макрофагами, фибробластами, гладкомышечными клетками, эндотелием сосудов. Телоциты участвуют в процессах регенерации поврежденной ткани, но полностью функция данных клеток не изучена [222, 246].

Ранее было продемонстрировано, что в основе патогенеза ГИСО лежат активирующие мутации *KIT* или *PDGFR*. Важно отметить, что данные мутации являются взаимоисключающими. В большинстве случаев в клетках ГИСО отмечаются мутации *KIT* (78,5%). Мутации *PDGFR* отмечается в 7,5% случаев ГИСО. Наконец, в 14% случаев ГИСО не обнаруживаются мутации *KIT* или *PDGFR*, такой вариант ГИСО обозначается как «ГИСО *KIT/PDGFR* дикого типа» [1, 8, 11, 32, 63].

Клетки ГИСО *KIT/PDGFR* дикого типа могут иметь другие генетические изменения. Например, активирующие мутации *SDH*, *RAS*, *BRAF*, *NF1*, а также редкие мутации, приводящие к формированию слитных генов, содержащих фрагменты *NTRK*, *FGFR* и *BRAF* [107]. При развитии первичных ГИСО указанные редкие мутации и слияния фрагментов генов также являются взаимоисключающими. В тоже время, некоторые из этих редких мутаций могут отмечаться в клетках ГИСО вместе с мутациями *KIT* или *PDGFR* [5, 219].

Таким образом, в зависимости от мутационного статуса опухолевых клеток, ГИСО можно разделить на три группы: 1) ГИСО с первичными мутациями *KIT*; 2) ГИСО с первичными мутациями *PDGFR*; 3) ГИСО с отсутствием первичных мутаций *KIT* или *PDGFR*.

В каждом из трех представленных вариантов ГИСО отмечаются дополнительные хромосомные aberrации и генетические нарушения, которые оказывают влияние на клиническое течение заболевания. Продемонстрировано, что делеция на 14p характерна для ГИСО желудка с низким митотическим индексом и размером не более 2 см, т.е. опухолей, имеющих благоприятный прогноз для больного. Напротив, делеции на 1p и 22q характерны для ГИСО кишечника, имеющих высокий митотический индекс и размеры более 2 см, что указывает на неблагоприятное течение заболевания. После хирургического удаления такой опухоли, как правило, развивается рецидив. Продемонстрировано, что при развитии метастатических и рецидивирующих форм ГИСО наблюдаются делеции на 9p и 13q и амплификации на 8q, 17q и 20q [6, 40, 52, 122].

Показано, что в ГИСО с высоким митотическим индексом и агрессивным течением в 60% случаев отмечаются мутации *CDKN2A*, кодирующего белки P16 (INK4a) и P14 (ARF), являющиеся онкосупрессорами. Белок P16 (INK4a) ингибирует циклин-зависимые киназы 4 и 6 (CDK4 и CDK6) и, таким образом, останавливает клетку в G1-фазе клеточного цикла. Белок P14 (ARF) активирует белок-онкосупрессор p53, который участвует в регуляции процессов репарации повреждений ДНК и запуске программируемой гибели клеток (апоптоз) [62, 158, 180, 201].

Мутации *CDKN2A* способствуют снижению активности белков P16 (INK4a) и P14 (ARF) и, тем самым, развитию неограниченной пролиферации опухолевых клеток [62, 158, 180, 201]. Для ГИСО имеющих агрессивное течение характерны мутации генов транскрипционных факторов E2F1 и C-MYC, что обеспечивает быстрый рост опухоли, развитие метастазов и неблагоприятный прогноз для больного [116, 194, 198].

ГИСО с первичными мутациями KIT

Выше было продемонстрировано, что более чем в 70% случаев развитие ГИСО обусловлено возникновением первичных мутаций *KIT*, кодирующего тирозинкиназный рецептор c-KIT (CD117), лигандом которого является фактор

роста стволовых клеток (Stem cell factor, SCF). В настоящее время зафиксировано более 300 мутаций *KIT* различных типов (делеции, замены нуклеотидов, вставки нуклеотидов и др.), которые встречаются в его 9, 11, 13 и 17 экзонах [1, 8, 32, 63, 149]. Делеции в экзонах *KIT* обуславливают развитие наиболее агрессивных форм ГИСО, характеризующихся неблагоприятным прогнозом для больного [17, 87, 115].

Мутации *KIT* в 70% случаев возникают в 11 экзоне, который кодирует регуляторный домен рецептора, расположенный в цитоплазме на внутренней поверхности клеточной мембраны. Мутации *KIT* в 11 экзоне встречаются в ГИСО различных гистологических вариантов (веретенновидно-клеточный, эпителиоидный, смешанный), разнообразной локализации (желудок, тонкая кишка, толстый кишечник, пищевод, брыжейка, сальник, забрюшинное пространство) и имеющих разную степень тяжести клинического течения [7, 17, 117, 206, 228, 238].

При возникновении мутаций кодонов W557, K558 или их делеции (W557-K558, «delWK») сохраняется аутофосфорилирование тирозинкиназного рецептора с-KIT в отсутствии лиганда (фактора роста стволовых клеток). Такие мутации отмечаются более чем в 70% случаев ГИСО желудка. Делеция кодонов K550-K558 также способствует постоянному фосфорилированию тирозинкиназного рецептора с-KIT. В результате, мутантный тирозинкиназный рецептор с-KIT находится в состоянии постоянной активации, передавая сигнал нижерасположенным цитоплазматическим белкам, что приводит к запуску пролиферативных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-Akt-mTOR) [7, 117, 206, 228, 238].

В 11 экзоне *KIT* продемонстрирована делеция кодонов W557-K558 сочетающаяся с делецией кодонов Y568-Y570, ответственных за аутофосфорилирование тирозинкиназного рецептора с-KIT. Такая обширная делеция кодонов в 11 экзоне *KIT* обозначается «delTyr» и встречается в 70% случаев ГИСО кишечника. Делеция delTyr способствует развитию ГИСО с высоким митотическим индексом и размерами более 2 см, что указывает на

неблагоприятный прогноз для больного. ГИСО с делецией delTyr в 11 экзоне *KIT* характеризуется агрессивным течением с быстрым развитием метастазов в брюшной полости и образованием рецидивов после хирургического удаления. Пятилетняя выживаемость пациентов с делецией delTyr в 11 экзоне *KIT* существенно ниже, чем пациентов с другими мутациями в 11 экзоне *KIT* [196, 238]. В редких случаях в 11 экзоне *KIT* возможна делеция del D579, при которой ГИСО имеет более благоприятное течение, чем в случае делеции delTyr [59].

В 11 экзоне *KIT* могут отмечаться миссенс-мутации, т.е. точечные замены нуклеотидов в определенных участках. Продемонстрированы миссенс-мутации в положениях W557R, V559D/A/G/I, V560D, L576P. Указанные миссенс-мутации в 11 экзоне *KIT* способствуют развитию ГИСО различной локализации с низким митотическим индексом и размером не более 2см, т.е. опухолей, имеющих благоприятный прогноз для больного. Миссенс-мутации в положениях W557R, V559D/A/G/I, V560D, L576P могут быть герминальными и способствовать развитию редкой семейной формы ГИСО, наследуемой по аутосомно-доминантному типу [29, 88, 102, 242].

Мутации в 11 экзоне *KIT* могут быть представлены в виде дупликацией кодонов. В частности, продемонстрированы дупликации кодонов A502-Y503, M552-K558, F506-F508. Такие мутации, как правило, обуславливают развитие ГИСО желудка с низким митотический индексом и размерами не более 2см, т.е. имеющих благоприятное клиническое течение. ГИСО с дупликацией кодонов в 11 экзоне *KIT* характеризуется отсутствием метастазов и встречается главным образом у пациентов женского пола в возрасте старше 60 лет [21, 187].

В редких случаях в 11 экзоне *KIT* могут отмечаться инсерции, т.е. вставки пары или нескольких пар нуклеотидов. Инсерции, как правило, наблюдаются в положении K558 и характеризуются появлением замен аминокислот в структуре рецептора. В частности, аспарагиновая кислота заменяется на пролин, а аспарагин на глутамин. За счет указанных мутаций сохраняется аутофосфорилирование тирозинкиназного рецептора c-KIT в отсутствии лиганда (фактора роста стволовых клеток – SCF), что обеспечивает бесконтрольную пролиферацию

клеток ГИСО [154, 179]. ГИСО с мутациями в 11 экзоне *KIT* характеризуются высокой чувствительностью к ИМ, который является препаратом первой линии таргетной терапии [10, 21, 144, 214].

В 10% случаев ГИСО отмечаются мутации в 9 экзоне *KIT*, который кодирует внеклеточный иммуноглобулин-подобный домен, ответственный за связывание тирозинкиназного рецептора с-*KIT* со своим лигандом (фактором роста стволовых клеток). Мутации в 9 экзоне *KIT* более чем в 95% случаев способствуют возникновению ГИСО тонкого кишечника с веретеновидноклеточным гистологическим типом опухолевых клеток. Только в 2% случаев ГИСО с мутацией в 9 экзоне *KIT* обнаруживалась в желудке и прямой кишке [25, 244]. В тоже время, Künstlinger Н. и соавт. в 2013 году провели обследование более 1500 пациентов с ГИСО и обнаружили мутации в 9 экзоне *KIT* у 9% больных. Примечательно, что ГИСО с мутацией в 9 экзоне *KIT* в 20% случаев обнаруживалась в желудке и прямой кишке [152]. Мутации в 9 экзоне *KIT*, как правило, представлены в виде дупликацией кодонов A502, Y503, K476, F506-F508 [110, 147, 152].

ГИСО с мутациями в 9 экзоне *KIT* обычно имеют высокий митотический индекс, размеры более 2см и характеризуются быстрым развитием метастазов в печени и брюшине, что указывает на неблагоприятный прогноз для больного. Кроме того, для ГИСО с мутацией в 9 экзоне *KIT* характерна сниженная чувствительность к таргетному препарату ИМ, по сравнению с ГИСО, имеющими мутации в 11 экзоне *KIT* [11, 147, 149]. В клиническом исследовании Heinrich М.С. и соавт., показано, что пациенты с диссеминированной формой ГИСО, вызванной мутацией в 9 экзоне *KIT*, получавшие иматиниб в двукратной суточной дозе (т.е. 800мг/сут) имели впоследствии более высокую общую выживаемость и безрецидивную выживаемость, чем пациенты, получавшие иматиниб в дозе 400мг/сут [64].

В 1-2% случаев ГИСО отмечаются мутации в 13 экзоне *KIT*, который кодирует цитоплазматический тирозинкиназный домен 1, имеющий АТФ-связывающий участок. Обычно в 13 экзоне *KIT* отмечаются миссенс-мутации в

положениях K642E и V643I, которые способствуют аутофосфорилированию тирозинкиназного рецептора с-KIT в отсутствии лиганда (фактора роста стволовых клеток), что приводит к неограниченной пролиферации клеток ГИСО. Мутация в положении K642E может быть герминальной и способствовать возникновению редкой семейной формы ГИСО, наследуемой по аутосомно-доминантному типу [21, 71, 166]. В редких случаях в 13 экзоне *KIT* обнаруживаются миссенс-мутации в положениях E635K, L641P, V643A, L647P, M651V и N655K, T632A, K642T [11, 58, 170]. ГИСО с мутациями в 13 экзоне *KIT* более чем в 90% случаев локализуется в тонком кишечнике и имеют преимущественно веретеновидно-клеточный тип морфологии. В редких случаях отмечается ГИСО эпителиоидного типа. Опухолевые клетки обладают более низкой чувствительностью к таргетному препарату ИМ, по сравнению с ГИСО, имеющими мутации в 11 и 9 экзонах *KIT*. ГИСО желудка с мутациями в 13 экзоне *KIT* отличаются более агрессивным течением по сравнению с ГИСО кишечника. В частности, Lasota J. и соавт. наблюдали 10 случаев ГИСО с мутациями в 13 экзоне *KIT*, локализованные в желудке. В восьми случаях опухоль имела размер более 5 см и митотический индекс выше 10, что характеризует агрессивное течение заболевания и неблагоприятный прогноз для больного [58].

Мутации в 17 экзоне *KIT*, также являются редкими, составляя 1-2% от всех зарегистрированных случаев первичных ГИСО. Известно, что 17 экзон *KIT* кодирует цитоплазматический тирозинкиназный домен 2 («домен активационной петли»), ответственный за передачу сигнала нижележащим внутриклеточным белкам [33, 183, 186]. В 17 экзоне *KIT* более чем в 90% случаев отмечается миссенс-мутация в положении N822K. В редких случаях возможны точечные замены нуклеотидов в положениях D816, D820 и Y823 [106, 130, 157]. За счет указанных мутаций возникает постоянная передача активационного сигнала от рецептора с-KIT к цитоплазматическим белкам сигнальных путей JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, обеспечивающий жизнеспособность, пролиферацию, миграцию клеток ГИСО и подавление программы их апоптоза. ГИСО с мутациями в 17 экзоне *KIT* обычно локализируются в тонком кишечнике и

желудке и имеют веретинovidно-клеточный тип морфологии. ГИСО с первичной мутацией в 17 экзоне *KIT* обладают более низкой чувствительностью к таргетному препарату ИМ, по сравнению с ГИСО, имеющими мутации в 11 и 9 экзонах *KIT* [145, 148]. В тоже время, на фоне терапии иматинибом в 17 экзоне *KIT* могут возникнуть вторичные мутации, например, замены нуклеотидов в положениях D816V и N822V, что способствует развитию вторичной резистентности ГИСО к указанному таргетному препарату [2, 3, 51, 106, 109].

ГИСО с первичными мутациями PDGFRA

Как указывалось, ранее, в 7,5% случаев развитие ГИСО обусловлено возникновением мутаций *PDGFRA*, кодирующего тирозинкиназный рецептор PDGFR α (α -рецептор тромбоцитарного фактора роста), лигандом которого является тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF). ГИСО с мутациями *PDGFRA* чаще встречаются в желудке (14-17%), чем в кишечнике (4-6%) и имеют морфологию эпителиоидного или смешанного типа. В целом ГИСО с мутациями *PDGFRA* значительно реже образуют метастазы и рецидивы, чем ГИСО с мутациями *KIT*. В частности, согласно исследованию Emile J.F. и соавт., при развитии метастатических форм ГИСО только у 2,2% больных были выявлены мутации *PDGFRA*, тогда как мутации *KIT* отмечались у 82,8 % пациентов [101]. В работе Barnett C.M. и соавт., продемонстрировано, что после хирургического удаления ГИСО с мутациями *PDGFRA* у больных отмечалась более высокая безрецидивная выживаемость по сравнению с аналогичными пациентами, имеющими ГИСО с мутациями *KIT* [110].

Мутации *PDGFRA* в большинстве случаев возникают в 18 экзоне, который кодирует цитоплазматический тирозинкиназный домен 2 («домен активационной петли»), ответственный за передачу сигнала от рецептора PDGFR α к нижележащим внутриклеточным белкам [2, 128, 186]. В настоящее время зарегистрировано более 60 мутаций в 18 экзоне *PDGFRA* (делеции, замены нуклеотидов, вставки нуклеотидов и др.).

Наиболее распространенной мутацией в 18 экзоне *PDGFRA* является миссенс-мутация в положении D842V. Указанная миссенс-мутация встречается более чем в 60% случаев мутаций *PDGFRA* и обуславливает первичную резистентность ГИСО к таргетному препарату иматинибу. Вследствие мутации D842V возникает аутофосфорилирование тирозинкиназного рецептора PDGFR α , что способствует передаче активационного сигнала к цитоплазматическим белкам сигнальных каскадов АКТ, ERK1/2 и STAT1, которые обеспечивают пролиферацию ГИСО даже в присутствии таргетного препарата ИМ [145, 227]. В 18 экзоне *PDGFRA* в редких случаях обнаруживаются другие миссенс-мутации (D846Y, Y849K, N848K), а также делеции (D842-H845, I843-D846). В случае указанных мутаций у клеток ГИСО сохраняется чувствительность к таргетному препарату ИМ [172, 185].

В 1-2% случаев ГИСО отмечаются мутации в 12 экзоне *PDGFRA*, который кодирует регуляторный домен рецептора PDGFR α , расположенный в цитоплазме на внутренней поверхности клеточной мембраны (юкста-мембранный домен). Наиболее распространенной мутацией в 12 экзоне *PDGFRA* является миссенс-мутация в положении V561D. В случае указанной мутации клетки ГИСО имеют высокую чувствительность к таргетному препарату ИМ [11, 185]. Миссенс-мутация в положении V561D 12 экзона *PDGFRA* может быть герминальной и способствовать развитию редкой семейной формы ГИСО, наследуемой по аутосомно-доминантному типу [57, 146].

Крайне редко (менее 1% случаев) развитие ГИСО обусловлено мутациями в 14 экзоне *PDGFRA*, который кодирует тирозинкиназный домен 1 рецептора PDGFR α , расположенный в цитоплазме и имеющий АТФ-связывающий участок. В частности, при обследовании более 1000 пациентов с ГИСО, мутации в 14 экзоне *PDGFRA* были обнаружены только у трех больных [185]. Зарегистрированы две миссенс-мутации 14 экзоне *PDGFRA* в положениях N659K и P653L. Важно отметить, что миссенс-мутация P653L может быть герминальной и способствовать развитию редкой семейной формы ГИСО [57, 184, 209].

В случае мутаций в 14 экзоне *PDGFRA* клетки ГИСО имеют высокую чувствительность к таргетному препарату ИМ [2, 11, 185].

ГИСО с отсутствием первичных мутаций KIT или PDGFRA

Выше было сказано, что в 14% случаев ГИСО в опухолевых клетках не обнаруживаются мутации *KIT* или *PDGFRA*. Такой вариант опухоли обозначается как «ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа». В клетках ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа сохраняется экспрессия тирозинкиназного рецептора с-*KIT* [1, 8, 63, 32]. Тем не менее, данная опухоль характеризуется сниженной чувствительностью к таргетному препарату иматинибу, по сравнению с ГИСО, имеющими первичные мутации в 11 экзоне *KIT* [2, 10]. ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа принято разделять на две группы по ведущему молекулярному механизму развития данных злокачественных новообразований: 1) SDH-дефицитные ГИСО; 2) SDH-компетентные ГИСО [35, 48, 128].

В основе развития SDH-дефицитных ГИСО лежит первичная инактивирующая мутация *SDH*, кодирующего митохондриальный ферментный комплекс сукцинатдегидрогеназы. В следствие дисфункции сукцинатдегидрогеназы в клетках ГИСО нарушается митохондриальное образование АТФ, что приводит к развитию энергодефицита. Вследствие накопления в цитоплазме клеток сукцината происходит активация антигипоксического фактора HIF-1 α (гипоксией индуцированный фактор-1альфа). Под его влиянием в клетках ГИСО усиливается продукция VEGF-A (фактор роста эндотелия сосудов) и IGF1 (инсулиноподобного фактора роста-1), за счет которых стимулируется пролиферация опухолевых клеток, а также усиливается процесс ангиогенеза, что способствует росту опухоли [69, 128, 237]. SDH-дефицитные ГИСО локализуются только в желудке. Для клеток ГИСО характерна эпителиоидная или смешанная морфология. Средний возраст больных составляет 20-30 лет, чаще пациентами являются молодые женщины, но описаны случаи данной опухоли также у детей и подростков. SDH-дефицитные ГИСО могут представлять собой спорадическое заболевание, либо быть одним из проявлений

специфических онкологических синдромов – триады Карнея или синдрома Карнея-Стратакиса [128, 204, 215, 239].

В SDH-компетентных ГИСО отсутствуют мутации *SDH*. В патогенезе указанных опухолей играют роль мутации генов, участвующих в развитии внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающих клеточную пролиферацию. В частности, в SDH-компетентных ГИСО могут присутствовать активирующие мутации *BRAF*, *RAS*, *NF1*, обеспечивающие гиперактивацию RAS-RAF-МАРК-сигнального пути. В некоторых случаях в опухоли обнаруживаются мутации *PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN*, за счет которых возникает повышенная активность белков PI3K-AKT-mTOR. Кроме того, в развитии SDH-компетентных ГИСО важное значение имеют мутации *IGF1R*, кодирующего рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) [49, 72, 113]. Продemonстрировано, что в SDH-компетентных ГИСО могут присутствовать редкие мутации, приводящие к формированию слитных генов. Например, обнаружены слитные гены, содержащие фрагменты *BRAF*, *FGFR* и *NTRK* [92, 114, 165].

1.3 Принципы таргетной терапии ГИСО

Таргетная терапия ГИСО основывается на результатах молекулярно-генетического исследования опухолевого материала и зависит от генетического статуса клеток ГИСО. В зависимости от обнаруженных мутаций (*KIT*, *PDGFRA* и др.) пациентам с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими формами ГИСО назначаются препараты первой, второй или третьей линии таргетной терапии.

1.3.1 Препарат первой линии таргетной терапии ГИСО – иматиниб

В качестве первой линии терапии пациентов с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими формами ГИСО используется таргетный препарат иматиниба мезилат (Гливек), являющийся низкомолекулярным ингибитором тирозинкиназных рецепторов *c-KIT*, *PDGFR α* , а также нерецепторной тирозинкиназы *Abl*. Таргетный препарат ИМ был синтезирован в

1999г. для ингибирования тирозинкиназы BCR-ABL у больных хроническим миелолейкозом. В 2000 г. ИМ был применен для лечения метастатической формы ГИСО в клетках которой отмечалась активирующая мутация *KIT*. Лечение оказалось успешным, ИМ индуцировал цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении клеток ГИСО [77, 132, 234]. Исследования показали, что препарат ИМ блокирует АТФ-связывающий участок цитоплазматического тирозинкиназного домена 1 рецепторов *c-KIT* и *PDGFR α* , что нарушает фосфорилирование указанных рецепторов. В результате ингибируется передача активационного сигнала от рецепторов *c-KIT* и *PDGFR α* к цитоплазматическим белкам сигнальных каскадов JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, что приводит к замедлению пролиферации клеток ГИСО и развитию их гибели по механизму апоптоза [64, 135].

В 2002 году ИМ зарегистрирован в качестве препарата первой линии таргетной терапии ГИСО, имеющих мутации *KIT* или *PDGFRA* [77, 132, 234]. За счет применения ИМ значительно увеличилась продолжительность жизни больных с диссеминированными формами ГИСО. В частности, в исследованиях Heinrich M.C. и соавт. и Duensing S. и соавт., продемонстрировано, что на фоне терапии ИМ медиана общей выживаемость больных с метастатическими формами ГИСО увеличилась с 19 месяцев до 60 месяцев [64, 76]. Медиана времени до прогрессирования заболевания у пациентов с диссеминированными ГИСО на фоне терапии ИМ составляет 24-36 месяцев [138, 200].

В зависимости от вида мутации *KIT* или *PDGFRA* клетки ГИСО обладают различной чувствительностью к ИМ. Наиболее высокой чувствительностью к ИМ обладают клетки ГИСО, имеющие первичные мутации в 11 экзоне *KIT*. Таким пациентам ИМ назначается в дозе 400мг/сут [10, 21, 144, 214].

Для ГИСО, имеющих первичные мутации в 9 экзоне *KIT* характерна сниженная чувствительность к ИМ, по сравнению с ГИСО, имеющими первичные мутации в 11 экзоне *KIT* [11, 149, 147]. Таким пациентам рекомендовано назначение ИМ в дозе 800мг/сут. В клиническом исследовании Heinrich M.C. и соавт., показано, что пациенты с диссеминированной формой ГИСО, имеющей

первичную мутацию в 9 экзоне *KIT*, получавшие ИМ в двукратной суточной дозе (т.е. 800мг/сут) имели впоследствии более высокую общую выживаемость и безрецидивную выживаемость, чем пациенты, получавшие ИМ в дозе 400мг/сут [64].

ГИСО с первичными мутациями в 13 и 17 экзонах *KIT* характеризуются более низкой чувствительностью к таргетному препарату ИМ, по сравнению с ГИСО, имеющими первичные мутации в 11 и 9 экзонах *KIT*. Таким пациентам рекомендовано назначение ИМ в дозе 800мг/сут [58, 145, 148]. Первичные мутации в 13 и 17 экзонах *KIT* встречаются достаточно редко, составляя 1-2% от всех ГИСО [33, 71, 138].

ГИСО с первичными мутациями в 12 и 14 экзонах *PDGFRA* характеризуются высокой чувствительностью к таргетному препарату ИМ. Пациентам рекомендовано назначение ИМ в дозе 400мг/сут. Первичные мутации в 12 и 14 экзонах *PDGFRA* встречаются достаточно редко, составляя не более 1-2% от всех ГИСО [11, 168, 185]. Как указывалось выше, наиболее распространенной мутацией в 18 экзоне *PDGFRA* является миссенс-мутация в положении D842V. Указанная миссенс-мутация встречается более чем в 60% случаев мутаций *PDGFRA* и обуславливает первичную резистентность ГИСО к таргетному препарату ИМ [145, 227]. В тоже время, другие мутации в 18 экзоне *PDGFRA* характеризуются чувствительностью ГИСО к ИМ [145, 185].

В клетках ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа сохраняется экспрессия тирозинкиназного рецептора с-*KIT*. Тем не менее, опухоль характеризуется сниженной чувствительностью к ИМ, по сравнению с ГИСО, имеющими первичные мутации в 11 экзоне *KIT* [2, 10, 168].

Если на фоне терапии ИМ в дозе 400мг/сут наступает прогрессирование ГИСО, то рекомендовано увеличить дозу ИМ до 800мг/сут. Согласно исследованию Zaicberg J.R. и соавт., повышение дозы ИМ с 400 мг/сут до 800мг/сут при прогрессировании ГИСО позволяло стабилизировать клиническую картину заболевания у 30% больных [84].

Несмотря на терапевтическую эффективность ИМ в отношении ГИСО, в среднем через 2 года более чем у 50% пациентов с диссеминированными формами заболевания развивается вторичная резистентность к препарату [15, 121, 149]. Одной из причин приобретенной резистентности ГИСО к ИМ являются вторичные мутации *KIT* [129, 134, 191]. Вторичные мутации *PDGFRA* встречаются крайне редко. В клетках ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа вторичные мутации не обнаруживаются [35, 101, 110]. Вторичная резистентность ГИСО к ИМ может быть обусловлена активацией альтернативных механизмов пролиферации опухолевых клеток. О механизмах резистентности ГИСО к таргетным препаратам будет указано в соответствующей главе «Обзора литературы».

1.3.2 Препарат второй линии таргетной терапии ГИСО – сунитиниб

Сунитиниб представляет собой низкомолекулярный ингибитор множества рецепторных и нерецепторных тирозинкиназ. В частности, мишенью СУ являются рецепторы 1-го, 2-го и 3-го типов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1-3). Кроме того, СУ блокирует тирозинкиназные рецепторы: с-KIT, β -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), Fms-подобную рецепторную тирозинкиназу-3 (FLT-3), рецептор колониестимулирующего фактора 1-го типа (CSF-1R) и рецептор нейротрофического глиального фактора (RET) [109, 126, 188, 231]. В 2006г. СУ официально зарегистрирован в качестве препарата 2-й линии таргетной терапии ГИСО [22, 126, 144].

СУ назначается пациентам с диссеминированными формами ГИСО в случае развития резистентности опухолевых клеток к таргетному препарату ИМ, а также в случае непереносимости ИМ больными. Показанием для применения СУ является прогрессирование ГИСО на фоне тарпии ИМ в дозе 800мг/сут [9, 27, 176, 177]. В частности, в клиническом исследовании I-II фазы (участвовало 97 пациентов) Demetri G.D. и соавт. продемонстрировано, что на фоне применения СУ в дозе 50мг/сут отмечалось стабилизация клинической картины ИМ-резистентных ГИСО на срок более 6 месяцев у 37% пациентов [169].

В клиническом исследовании III фазы (участвовало более 300 пациентов) по изучению эффективности СУ в отношении ИМ-резистентных ГИСО была продемонстрирована стабилизация клинической картины на срок более 5,5 месяцев у 17,4% больных, получавших СУ и только 1,9% получавших плацебо [80]. В исследовании Raut С.Р. и соавт. показано, что пациенты у которых возникло прогрессирование ГИСО на фоне терапии ИМ (400 мг/сут) после назначения СУ (50мг/сут) демонстрировали стабилизацию клинической картины заболевания в течение 10 месяцев. Напротив, при увеличении дозы ИМ до 800мг/сут вместо назначения СУ стабилизация клинической картины ГИСО отмечалась на срок не более 5 месяцев [68].

Наибольшая эффективность СУ проявляется в отношении ГИСО с первичными мутациями в 9 экзоне *KIT*. ГИСО с первичными мутациями 11 и 13 экзонах *KIT* обладают умеренной чувствительностью к СУ [109]. В клиническом исследовании Heinrich М.С. и соавт. показано, что эффективность СУ отмечалась у 37% больных, имеющих первичную мутацию в 9 экзоне *KIT* и только у 5% больных с первичной мутацией в 11 экзоне *KIT*. Безрецидивная выживаемость на фоне терапии СУ составляла более 19 месяцев в случае первичной мутации в 9 экзоне *KIT* и только 5 месяцев при наличии первичной мутацией в 11 экзоне *KIT* [195].

Низкую чувствительность к СУ проявляют ГИСО с первичными мутациями в 17 экзоне *KIT*, ГИСО с мутациями *PDGFRA* и ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа [22, 109]. Продemonстрировано, что СУ обладает терапевтической эффективностью в отношении ГИСО со вторичными мутациями в 13, 14 и 17, 18 экзонах *KIT*. При этом цитотоксический и антипролиферативный эффект СУ был более выражен в отношении ГИСО со вторичными мутациями в 13 и 14 экзонах *KIT*, по сравнению с ГИСО, имеющими вторичные мутации в 17 и 18 экзонах *KIT* [9, 27, 149].

Несмотря на клиническую эффективность в отношении ГИСО, СУ обладает более высоким профилем токсичности по сравнению с ИМ. В частности, Demetri G.D. и соавт. на фоне терапии СУ отмечали у больных с диссеминированными

ГИСО диарею (более 40%), тошноту (более 30%), анорексию (более 20%), изменение вкусовых ощущений (25%), артериальную гипертензию (7%), ладонно-подошвенный синдром (6%). Кроме того, у всех пациентов отмечались гематологические нарушения различной степени тяжести в виде анемии, нейтропении и тромбоцитопении. Вследствие указанных гематологических нарушений препарат СУ был отменен у 36% больных, а у 28% больных доза СУ была снижена [80]. Продemonстрировано, что на фоне терапии СУ возможно развитие эндокринной патологии, в частности, нарушений функции щитовидной железы в виде гипотиреоза, что связывают с инактивирующим действием СУ в отношении рецепторной тирозинкиназы RET, которая экспрессируется тироцитами [208, 224]. Под влиянием СУ возможно развитие у больных кардиотоксических эффектов: инфаркта миокарда левого желудочка и хронической тотальной сердечной недостаточности [22, 109].

Клинические исследования демонстрируют, что у клеток ГИСО формируется приобретенная резистентность к СУ за счет возникновения вторичных мутаций *KIT* [171]. В частности, Guo T. и соавт. анализируя противоопухолевые эффекты СУ указывают, что через 12 месяцев терапии СУ в ГИСО возникла вторичная мутация D816V в 17 экзоне *KIT*, что сопровождалось развитием резистентности к препарату [164].

Таким образом, применение СУ позволяет стабилизировать клиническую картину ГИСО в случае возникновения резистентности опухолевых клеток к ИМ или при непереносимости ИМ пациентами. Тем не менее, высокая токсичность СУ и развитие к нему вторичной резистентности ограничивает использование препарата для пациентов с метастатическими, неоперабельными и рецидивирующими формами ГИСО.

1.3.3 Препарат третьей линии таргетной терапии ГИСО – регорафениб

Регорафениб, подобно сунитинибу, является низкомолекулярным мультикиназным ингибитором. Также, как и СУ, РЕГО блокирует тирозинкиназные рецепторы 1-го, 2-го и 3-го типов фактора роста эндотелия

сосудов (VEGFR1-3). Поэтому таргетные препараты СУ и РЕГО входят в группу ингибиторов VEGFR-сигнального пути. РЕГО помимо блокирования VEGFR-сигналинга ингибирует тирозинкиназные рецепторы с-KIT, β -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), рецептор нейротрофического глиального фактора (RET) и внутриклеточную киназа RAF-1 [109, 177, 188, 231].

РЕГО был зарегистрирован в качестве препарата 3-й линии таргетной терапии ГИСО в 2013 году [79]. Препарат рекомендуется назначать пациентам с диссеминированными ГИСО при наличии резистентности опухолевых клеток к ИМ и СУ. В клиническом исследовании II фазы (участвовало 34 пациента) George S. и соавт. показана эффективность РЕГО в отношении ГИСО, резистентных к ИМ и СУ. В частности, при назначении пациентам РЕГО в дозе 160мг/сут в течении 3 недель у 22 больных достигнута стабилизация клинической картины заболевания на срок более 4 месяцев, а медиана общей выживаемость больных с метастатическими формами ГИСО увеличилась до 27 месяцев [79].

РЕГО обладает терапевтической эффективностью в отношении ГИСО со вторичными мутациями *KIT*. Было показано, что после назначения РЕГО пациентам с метастатическими ГИСО, имеющими вторичную мутацию в 17 экзоне *KIT*, медиана времени до прогрессирования заболевания увеличилась до 1,5 лет [188]. В другом исследовании II фазы РЕГО назначался пациентам с диссеминированными ГИСО у которых на фоне терапии СУ возникла вторичная мутация в 17 экзоне *KIT*. Из 15 пациентов, участвовавших в исследовании, стабилизация клинической картины после применения РЕГО отмечалась у 8 больных (53,3%), незначительное улучшение состояния у 6 пациентов (40%) и только у 1 пациента (6,7%) возникло прогрессирование заболевания [31]. В клиническом исследовании III фазы, с участием 199 больных с диссеминированными ГИСО, резистентными к ИМ и СУ, была продемонстрирована стабилизация клинической картины заболевания на срок более 4 месяцев у 71,4% больных после назначения РЕГО в дозе 160мг/сут. Кроме того, в представленном клиническом исследовании было показано, что ГИСО с

мутациями в 11 и 9 экзонах *KIT* имеют более высокую чувствительность к РЕГО по сравнению с ИМ или СУ [78].

Продemonстрировано, что РЕГО оказывал цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ГИСО имеющих несколько мутаций в 11 экзоне *KIT*. В частности, с помощью РЕГО удалось стабилизировать клиническую картину заболевания на срок более 7 месяцев у больных с метастатическими ГИСО, имеющими сразу две миссенс-мутации D816G и V654A в 11 экзоне *KIT*. Увеличение медианы времени до прогрессирования заболевания отмечалось в случае применения РЕГО для лечения диссеминированных ГИСО, имеющих одновременно миссенс-мутации N882K и T670I в 11 экзоне *KIT* [2, 44].

Важным преимуществом РЕГО является его меньшая токсичность по сравнению с СУ. Среди наиболее частых побочных эффектов РЕГО следует отметить артериальную гипертензию, диарею и ладонно-подошвенный синдром. Гематологические нарушения в виде лейкопении и тромбоцитопении встречаются значительно реже [9, 47, 177]. На фоне терапии РЕГО возможно развитие гепатодепрессии, поэтому пациентам рекомендовано каждые 2 недели исследовать в крови концентрацию печеночных аминотрансфераз (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза) для своевременной диагностики синдрома цитолиза гепатоцитов [86, 211]. Более низкий профиль токсичности РЕГО позволяет использовать данный препарат для пациентов, имеющих непереносимость СУ. Продолжаются клинические испытания по изучению возможности использования РЕГО в качестве препарата 2-й линии терапии ГИСО вместо СУ [30].

Таким образом, в настоящее время таргетная терапия пациентов с метастатическими, неоперабельными и рецидивирующими формами ГИСО складывается из последовательного применения трех препаратов – иматиниба, сунитиниба и регорафениба, что позволяет стабилизировать клиническую картину заболевания и улучшить качество жизни пациентов. Исследование мутационного статуса ГИСО является обязательной условием для грамотного назначения таргетной терапии.

1.4 Механизмы резистентности ГИСО к таргетным препаратам

В процессе таргетной терапии ГИСО происходит формирование резистентности опухолевых клеток к применяемым препаратам. Поскольку ИМ является препаратом первой линии таргетной терапии ГИСО, то следует в первую очередь обозначить механизмы резистентности опухолевых клеток к данному таргетному препарату. Различают первичную и вторичную резистентность ГИСО к ИМ, которая характеризуется быстрым ростом опухоли и развитием метастазов в брюшине, печени и регионарных лимфатических узлах, не смотря на проводимую таргетную терапию. Механизмы первичной и вторичной резистентности к ИМ имеют свои особенности и отличия.

1.4.1 Механизмы первичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам

Первичная резистентность ГИСО к ИМ обнаруживается у 5-10% больных и характеризуется прогрессивным ростом опухоли и развитием метастазов в течение первых 6 месяцев лечения данным таргетным препаратом [2, 10, 144]. Развитие первичной резистентности ГИСО к ИМ обусловлено главным образом генетическими особенностями опухолевых клеток. В клиническом исследовании Heinrich M.C. и соавт., продемонстрировано, что первичная резистентность ГИСО к ИМ отмечалась на фоне мутаций *KIT* в 9 экзоне (у 16% больных) и в 11 экзоне (у 5 % больных). Кроме того, в данном исследовании показано развитие первичной резистентности к ИМ у ГИСО *KIT/PDGFR* дикого типа, т.е. в отсутствии мутации *KIT* или *PDGFR* (у 3% больных) [145].

Первичная резистентность ГИСО к ИМ может развиваться в следствие мутаций *PDGFR*. Продemonстрировано, что миссенс-мутация D842V в 18 экзоне является самой распространенной мутацией *PDGFR* и обуславливает первичную резистентность ГИСО к таргетному препарату ИМ. Вследствие миссенс-мутации D842V возникает аутофосфорилирование тирозинкиназного рецептора *PDGFR* α , что способствует передаче активационного сигнала к цитоплазматическим белкам сигнальных каскадов АКТ, ERK1/2 и STAT1, обеспечивающих пролиферацию

ГИСО даже в присутствии ИМ [145, 167, 227]. Важно отметить, что 18 экзоне *PDGFRA* в редких случаях обнаруживаются другие миссенс-мутации (D846Y, Y849K, N848K), а также делеции (D842-H845, I843-D846), на фоне которых сохраняется чувствительность ГИСО к таргетному препарату ИМ [172, 185].

Если первичная резистентность ГИСО к ИМ была обусловлена мутациями в 9 экзоне *KIT*, то двукратное увеличение дозы препарата с 400 мг/сут до 800 мг/сут позволяет стабилизировать клиническую картину заболевания у большинства пациентов. В тоже время, если первичная резистентность к ИМ возникла за счет мутаций *PDGFRA* или вследствие ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа, то увеличение дозы препарата не имеет клинического эффекта [145, 185]. В этом случае больным назначается препарат второй линии таргетной терапии – СУ, а при его непереносимости или неэффективности используется препарат третьей линии – РЕГО [9, 31, 149].

Продemonстрировано, что ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа имеют в целом сниженную чувствительность к ИМ, а во многих случаях отмечается первичная резистентность указанных опухолей к данному таргетному препарату [2, 10, 168]. Как указывалось, выше, в патогенезе ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа играют роль мутации генов, участвующих в развитии внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающих клеточную пролиферацию. В частности, в ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа могут присутствовать активирующие мутации генов *BRAF*, *RAS*, *NF1*, обеспечивающие гиперактивацию RAS-RAF-MAPK-сигнального пути. В некоторых случаях в опухоли обнаруживаются мутации *PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN*, за счет которых возникает повышенная активность белков PI3K-AKT-mTOR-сигналинга. Кроме того, в развитии ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа важное значение имеют мутации *IGF1R*, кодирующего рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) [49, 72, 113]. Учитывая вышеизложенное, в настоящее время проводятся клинические испытания по исследованию эффективности применения ингибиторов тирозинкиназ *BRAF* (препараты ZM336372 и SB590885) и PIK3 (препараты бупарлизиб и перифозин)

для таргетной терапии ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа, а также других ГИСО, резистентных к ИМ [75, 202].

Таким образом, на основании молекулярно-генетических исследований ГИСО можно предполагать наличие первичной резистентности опухолевых клеток к иматинибу и использовать для лечения диссеминированных форм заболевания препараты второй и третьей линии таргетной терапии – сунитиниб и регорафениб.

1.4.2 Механизмы вторичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам

Вторичная (приобретенная) резистентность ГИСО к ИМ диагностируется если прогрессивный рост опухоли и развитие метастазов возникают после 6 месяцев лечения данным таргетным препаратом. Следовательно, на начальном этапе терапии ИМ у больных отмечался цитотоксический и антипролиферативный эффект препарата в отношении ГИСО, а затем вследствие определенных механизмов опухолевых клетки утратили чувствительность к ИМ. По статистике в среднем через 2 года от начала терапии ИМ более чем у 50% пациентов с диссеминированными формами ГИСО развивается вторичная резистентность к препарату [15, 121, 149].

Вторичные мутации KIT и PDGFRA в клетках ГИСО

Как указывалось, ранее, одной из причин приобретенной резистентности ГИСО к ИМ являются вторичные мутации *KIT*. Продемонстрированы миссенс-мутации в 13 экзоне (V654A) и в 14 экзоне (T670I) *KIT*, кодирующих цитоплазматический тирозинкиназный домен 1 рецептора. Показана миссенс-мутация в 17 экзоне (Y823D), кодирующем тирозинкиназный домен 2 рецептора. Зарегистрированы вторичные мутации в 15 и 16 экзонах *KIT*, кодирующих киназную вставку рецептора [129, 134, 149, 191]. За счет указанных мутаций нарушается связь ИМ с АТФ-связывающим участком тирозинкиназного домена 1 рецептора с-KIT либо сохраняется активная конформация рецептора даже после

воздействия препарата, что способствует передаче пролиферативного сигнала в цитоплазму клетки. Важно отметить, что на фоне терапии ИМ у больного может возникнуть несколько вторичных мутаций *KIT*. В частности, Wardelman E. и соавт., показали 2 вторичные мутаций *KIT* в клетках одного метастаза ГИСО [191]. В другом исследовании в нескольких метастазах ГИСО разных пациентов было обнаружено 5 вторичных мутаций *KIT*, а также наличие амплификации рецептора с-*KIT*, что способствовало формированию резистентности опухолевых клеток к ИМ [123].

Представленные результаты демонстрируют, что ИМ-резистентные ГИСО являются гетерогенными популяциями, состоящими из клонов с разными генотипическими свойствами, что способствует выживаемости опухоли в условиях воздействия таргетных препаратов. В настоящее время гетерогенность опухолевой ткани, т.е. присутствие в ее составе генотипически и фенотипически различных клонов опухолевых клеток, является признанным фактом. За счет развития клонов опухолевых клеток с разными генотипическими и фенотипическими свойствами обеспечивается резистентность опухоли к таргетным и химиопрепаратам. Гетерогенность опухолевой ткани обнаружена при меланоме, лейкозах, колоректальном раке, глиобластоме и др. злокачественных новообразованиях [60]. Показано что на фоне терапии ИМ формируется клональная гетерогенность не только ГИСО. В частности, у пациентов с ХМЛ, получающих ИМ, также отмечены случаи клональной гетерогенности опухоли, что сопровождалось развитием резистентности к таргетному препарату [67]. Вторичные мутации *PDGFRA* встречаются крайне редко. В клетках ГИСО *KIT/PDGFRA* дикого типа вторичные мутации не обнаруживаются [35, 101, 110].

Активация альтернативных механизмов пролиферации клеток ГИСО

Вторичная резистентность ГИСО к ИМ может быть обусловлена активацией альтернативных механизмов пролиферации опухолевых клеток, которые сформировались вследствие изменения их киназного профиля. В частности, продемонстрировано, что под влиянием ИМ в клетках ГИСО

отмечалось снижение экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT и повышение экспрессии рецепторных тирозинкиназ с-MET, с-AXL и нерецепторной тирозинкиназы FAK [19, 175].

Рецепторные тирозинкиназы с-MET и с-AXL способны активировать внутриклеточные сигнальные каскады JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, обеспечивающие пролиферацию ГИСО в условиях воздействия таргетных препаратов. Показано, что гиперэкспрессия рецепторных тирозинкиназ с-MET и с-AXL отмечается при множестве разнообразных злокачественных новообразований: острый миелолейкоз, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого, гепатоцеллюлярная карцинома, холангиокарцинома, ренальная карцинома и др. Повышенная экспрессия с-MET и с-AXL указывает на прогрессирование заболевания и развитие резистентности опухолевых клеток к таргетным и химиопрепаратам [19, 124, 218].

Продemonстрировано, что резистентность ГИСО к ИМ может быть обусловлена гиперэкспрессией нерецепторной тирозинкиназы FAK (focal adhesion kinase, киназа фокальных контактов) [37, 137]. Указанная киназа играет роль в реорганизации цитоскелета клеток для обеспечения их подвижности и миграции. Гиперэкспрессия FAK-киназы отмечается в различных злокачественных новообразованиях: рак щитовидной железы, рак яичников, рак молочной железы, опухоли головы и шеи, рак печени, рак поджелудочной железы, рак легких, рак толстой кишки и др. За счет активности FAK-киназы усиливается инвазивный рост опухоли и быстро развиваются метастазы, поэтому гиперэкспрессия указанной киназы рассматривается в качестве маркера прогрессирования заболевания и неблагоприятного прогноза [100, 193]. В ИМ-резистентных клетках ГИСО имеющих вторичную миссенс-мутацию KIT820Tyr в 17 экзоне *KIT* продемонстрирована повышенная экспрессия FAK-киназы. Применение комбинации ИМ с ингибитором FAK-киназы (препарат TAE226) индуцировало *in vitro* гибель указанных клеток ГИСО по механизму апоптоза [137].

Таким образом, представленные литературные данные указывают на возможность развития вторичной резистентности клеток ГИСО к таргетным

препаратам за счет разнообразных молекулярных механизмов. Изучение указанных механизмов позволит разработать персонифицированную таргетную терапию пациентов с диссеминированными формами ГИСО. Тем не менее, механизмы вторичной резистентности ГИСО остаются до конца не изученными. В настоящее время широко изучается роль FGFR- и VEGF-сигнальных путей в патогенезе различных злокачественных новообразований, в том числе и в ГИСО.

1.5 Роль FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в патогенезе злокачественных новообразований

Факторы роста фибробластов (Fibroblast growth factors, FGF) представляют собой семейство белков, состоящее из 22 представителей (FGF1 – FGF22). По химической структуре FGF являются гликопротеинами, которые могут обнаруживаться в цитоплазме, клеточном ядре и внеклеточном пространстве. Наиболее изученными являются молекулы FGF1 и FGF2 [95]. Продemonстрировано, что FGF1 и FGF2 являются лигандами рецепторов FGFR1-4, которые экспрессируются на различных клетках организма человека – эпителий, клетки соединительной ткани (фибробласты, эндотелий сосудов, гладкомышечные клетки), костная, нервная ткань и др. [91, 95]. От рецепторов FGFR1-4 сигнал поступает внутрь клетки на адаптерный белок FRS-2. Далее от адаптерного белка FRS-2 сигнал передается на внутриклеточные белки, участвующие в активации сигнальных путей JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, за счет которых обеспечивается пролиферация и дифференцировка клеток [55, 91, 95]. FGF-1 главным образом участвует в процессах ангиогенеза, воздействуя на эндотелий и гладкомышечные клетки сосудов. FGF-2 выполняет в организме множество функций. За счет FGF-2 происходит формирование органов в эмбриональном периоде, заживление ран и регенерация тканей при их повреждении, ангиогенез, формирование нервной ткани и костной системы [119, 181].

Активация FGFR-сигнального пути отмечается также при развитии злокачественных новообразований. Например, при немелкоклеточном и

мелкоклеточном раке легких, раке мочевого пузыря, раке молочной железы, раке желудка, раке толстой кишки, раке печени и желчевыводящих путей, остеосаркоме [143, 159, 223]. В опухолевых клетках отмечались активирующие мутации *FGFR1-4*, что обуславливало гиперэкспрессию рецепторов *FGFR1-4*. Кроме того, гиперэкспрессия указанных рецепторов развивалась за счет амплификации *FGFR1-4*. В результате, в опухолевых клетках возникала активация нижележащих внутриклеточных сигнальных белков (АКТ, STAT, ERK1/2), что способствовало их неконтролируемой пролиферации [16, 18, 226]. Кроме того, активация *FGFR*-сигнального пути в опухолевых клетках может быть обусловлена ауторинной продукцией *FGF*-лигандов или их паракринной продукцией клетками микроокружения опухоли (фибробластами, макрофагами, эндотелиальными клетками и др.) [16, 18, 136]. Например, гиперпродукция *FGF-2* лиганда отмечается при лейкозах, раке легких и молочной железы. Гиперпродукция *FGF-8* лиганда отмечается при раке молочной железы и простаты. Гиперпродукция *FGF-10* лиганда отмечается при раке легких. . Гиперпродукция *FGF-19* лиганда отмечается при гепатоцеллюлярной карциноме и трижды негативном раке молочной железы [98, 136, 151].

Активация *FGFR*-сигналинга в опухолевых клетках указывает на прогрессирование заболевания и является неблагоприятным прогностическим признаком. В частности, продемонстрировано, что *FGF-2* лиганд активировал миграцию и инвазию опухолевых клеток с помощью различных молекулярных механизмов [93, 120]. В частности, контактное взаимодействие *FGF-2* с мембраной клеток колоректально рака усиливало их миграцию, т.к. способствовало повышению экспрессии молекул адгезии - $\alpha v \beta 5$ интегринов [99]. В клетках рака молочной железы *FGF-2* лиганд активизировал аутокринную продукцию фактора роста соединительной ткани (CTGF), который усиливал миграцию и инвазию опухолевых клеток [120].

Продemonстрировано, что за счет активации *FGFR*-сигнального пути развивалась вторичная резистентность клеток немелкоклеточного рака легких к gefитинибу – ингибитору рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) [97,

160]. В клетках немелкоклеточного рака легких под воздействием gefitinib активизировалась аутокринная продукция FGF-2 лиганда. За счет активации FGFR-сигнального пути резко снижался цитотоксический и антипролиферативный эффект gefitinib в отношении клеток немелкоклеточного рака легких [160]. За счет активации FGFR-сигнального пути развивается резистентность опухолевых клеток не только к таргетным препаратам, но и к химиопрепаратам. Продemonстрировано, что присутствие FGF-2 в культуральной среде опухолевых клеток простаты снижало их чувствительность к химиопрепаратам – паклитакселу, доксорубину, 5-фторурацилу. При добавлении в культуру анти-FGF-2 мАТ чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам восстанавливалась [97]. Аналогичным образом, высокая экспрессия FGF-2 в клетках хронического лимфолейкоза сопровождалась их резистентностью к химиопрепаратам и являлась неблагоприятным прогностическим признаком [81]. Повышенный уровень FGF-2 в плазме больных различными злокачественными новообразованиями (лейкозы, лимфомы, рак молочной железы, рак легких, колоректальный рак и др.) является признаком прогрессирования заболевания и высоко риска развития метастазов [125, 213]. Продemonстрировано, что высокий уровень FGF-2 в плазме больных почечноклеточной карциномой указывает на позднюю стадию заболевания, наличие метастазов и является крайне неблагоприятным прогностическим признаком [139]. Следовательно, компоненты FGFR-сигнальный путь является потенциальной мишенью для разработки стратегий таргетной терапии большого количества разнообразных злокачественных новообразований.

Продemonстрирована активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО при развитии их вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ. В частности, в ИМ-резистентных клетках ГИСО была обнаружена аутокринная продукция FGF-2 лиганда и гиперэкспрессия рецептора FGFR1 [94]. Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО продemonстрирована аутокринная продукция FGF-2 лиганда и гиперэкспрессия рецептора FGFR3. В этом случае комбинация ИМ с селективными ингибиторами рецептора FGFR3 обеспечивала апоптоз ИМ-

резистентных клеток ГИСО [65]. Тем не менее, роль FGF-2 лиганда и рецепторов FGFR1-2 в механизмах активации FGFR-сигналинга в клетках ГИСО остаются не изученными, что обуславливает проведение самостоятельного экспериментального исследования данного вопроса.

Продemonстрировано, что фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF-A) является лигандом рецепторов VEGFR1-2 которые экспрессируются на различных клетках организма человека – эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов, гемопоэтических стволовых клетках, моноцитах и макрофагах, нейронах [235, 240]. От рецепторов VEGFR1-2 сигнал передается на внутриклеточные белки, участвующие в активации сигнальных путей RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, за счет которых возникает пролиферация и дифференцировка клеток [162, 212]. Следует отметить, что большинство эффектов VEGF-A реализуются преимущественно через рецептор VEGFR2. Существует также рецептор VEGFR3, который экспрессируется на эндотелиальных клетках лимфатических сосудов и участвует в процессе лимфоангиогенеза. С рецептором VEGFR3 связываются другие белки семейства фактора эндотелия сосудов, в частности, VEGF-C и VEGF-D [235, 240].

VEGF-A выполняет в организме множество функций. За счет VEGF-A происходит формирование сосудистой системы в эмбриональном периоде. VEGF-A усиливая пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток обеспечивает рост новых сосудов (ангиогенез) в процессе регенерации тканей после травматического повреждения и при гипертрофии скелетных мышц, вызванной физическими упражнениями. Концентрация VEGF-A в плазме крови увеличивается при развитии генерализованной гипоксии (бронхиальная астма, хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет) [162, 212, 236].

Активация VEGFR-сигнального пути отмечается при развитии большинства злокачественных новообразований человека. Опухолевые клетки способны продуцировать VEGF-A, кроме того указанный лиганд вырабатывается клетками микроокружения опухоли, например, макрофагами M2 и фибробластами [14, 20,

83, 136]. За счет активации VEGFR-сигнального пути обеспечивается рост кровеносных сосудов для питания опухоли. Кроме того, возможна экспрессия рецепторов VEGFR1-3 на мембранах опухолевых клеток. В этом случае аутокринная продукция VEGF-A лиганда будет обеспечивать активацию VEGFR-сигнального пути непосредственно в самих опухолевых клетках, что будет обеспечивать их пролиферацию, миграцию и развитие метастазов [34, 161, 189]. Повышение в сыворотки больного концентрации VEGF-A является неблагоприятным признаком, указывающим на прогрессирование роста опухоли [42, 161, 230]. Высокий уровень VEGF-A обнаруживаемый в плазме больных ГИСО на фоне терапии ИМ указывает на развитие резистентности опухолевых клеток к таргетному препарату [43, 197]. Продemonстрировано, что VEGF-A способен оказывать иммуносупрессивное действие в отношении дендритных клеток и цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов подавляя развитие противоопухолевого иммунного ответа [83, 230].

Следует отметить, что при развитии злокачественных новообразований возможна одновременная активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что указывает на их взаимосвязь в опухолевых клетках и является неблагоприятным признаком, указывающим на прогрессирование заболевания [136]. Например, в клетках рака молочной железы FGF-2 лиганд связываясь с рецептором FGFR1 усиливал продукцию VEGF-A и гиперэкспрессию рецептора VEGFR1 [217]. Кроме того, показано, что FGF-2 связываясь с внутриклеточной MAPK (ERK1/2)-киназой усиливал экспрессию рецептора VEGFR2 на мембране эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и клетках меланомы [90]. Показано, что за счет аутокринной продукции опухолевыми клетками FGF-2 лиганда и VEGF-A в опухолевой ткани усиливался рост новых сосудов (ангиогенез). Добавление к к опухолевой ткани анти-VEGF антител подавляло развитие ангиогенеза [241]. Продemonстрировано, что FGF-2 секретируемый эндотелиальными клетками сосудов и перицитами играет важную роль в поддержании ангиогенеза в сосудистой сети опухоли и обуславливает резистентность опухолевых клеток к ингибиторам рецепторов VEGFR [36]. За счет аутокринной продукции FGF-2 и

VEGF-A опухолевыми клетками в ткани создается специфическое микроокружение, которое препятствует нормальному противоопухолевому иммунному ответу. В частности, происходит формирование макрофагов M2 и опухоль-ассоциированных фибробластов, которые выделяя цитокины (интерлейкин 10, трансформирующий фактор роста-бета и др.) подавляют активность дендритных клеток, CD8⁺T-лимфоцитов, макрофагов M1 и NK-клеток [74, 118, 243]. При ингибировании FGFR- и VEGFR-сигнальных путей резко усиливается противоопухолевый иммунный ответ в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы [73, 225]. Продемонстрирована взаимосвязь между FGFR- и VEGFR-сигнальными путями. В частности, адаптерный белок FGFR-сигнального пути FRS-2 способен активировать в эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов продукцию факторов роста эндотелия сосудов (VEGF-A и VEGF-C). Белок FRS-2 способен стимулировать активацию внутриклеточного белка GRB-2, который является компонентом различных сигнальных путей, в том числе, VEGFR-сигнального пути. При нокадауне гена *FRS-2* продукция VEGF-A резко снижалась и нарушалось формирование кровеносных и лимфатических сосудов в эмбриональном периоде [225].

Тем не менее, в литературе отсутствуют данные об активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО на фоне развития их вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ. Кроме того, отсутствует информация о взаимосвязи FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО. Все вышеизложенное обуславливает актуальность экспериментального изучения роли FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в механизмах резистентности клеток ГИСО к таргетным препаратам.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 приставлены 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).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Протокол №1 от 10 апреля 2018г.).

2.1 Характеристика объекта и предмета исследования

В настоящей работе исследовались механизмы резистентности ГИСО к таргетным препаратам с использованием сертифицированных лабораторных клеточных линий указанных опухолевых клеток:

1) ГИСО T1 – клеточная линия гастроинтестинальной стромальной опухоли, чувствительная к таргетному препарату иматинибу. Линия была получена из плеврального метастаза гастроинтестинальной стромальной опухоли 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* [61].

2) ГИСО T1-IM-R – клеточная линия гастроинтестинальной стромальной опухоли, имеющая вторичную резистентность к таргетному препарату иматинибу не связанную с возникновением вторичных мутаций *KIT*. В опухолевых клетках ГИСО T1-IM-R отмечается первичная гетерозиготная

мутация в виде делеции V570-Y578 в 11 экзоне *KIT*, вторичные мутации *KIT* отсутствуют. Клеточная линия ГИСО T1-IM-R была получена в лаборатории кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России методом культивирования клеток ГИСО T1 в присутствии постепенно увеличивающейся концентрации таргетного препарата иматиниба [28].

3) ГИСО T1-IM-R-2 – *KIT*-негативная иматиниб-резистентная клеточная линия гастроинтестинальной стромальной опухоли. Клеточная линия ГИСО T1-IM-R-2 была получена в лаборатории кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России путем клонирования клеточной линии ГИСО T1-IM-R с использованием метода серийных разведений [233].

4) ГИСО 430 – клеточная линия гастроинтестинальной стромальной опухоли, имеющая вторичную резистентность к таргетному препарату иматинибу за счет возникновения вторичной мутации *KIT*. Клеточная линия ГИСО 430 была получена из гастроинтестинальной стромальной опухоли 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* [150].

2.2 Культивирование и хранение клеточных линий ГИСО

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 дополнительно была добавлена 15% эмбриональная телячья сыворотка (Biosera, Южная Америка) и антибиотики пенициллин 25000 ЕД и стрептомицин 25000 мкг ((ПанЭко, Россия).

Для культивирования клеточной линии ГИСО 430 использовалась питательная среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия), в которую дополнительно 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 MITO+ Serum extender (Discovery Labware Inc., США) и антибиотики пенициллин 25000 ЕД и стрептомицин 25000 мкг ((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 для культивирования: $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$, концентрация CO₂ – 5%, относительная влажность воздуха 95-96%.

В стерильных условиях ламинарных боксов 2 класса безопасности (Lamsystems, Россия; Nuair, США) проводились манипуляции с клетками ГИСО: замена питательной среды каждые 72 часа, добавление таргетных препаратов и моноклональных антител (мАТ), трансфекция короткой интерферирующей РНК (киРНК).

Визуальный контроль пролиферативной активности клеток ГИСО осуществлялся с помощью световой микроскопии при увеличении 4х и 10х с использованием инвертированного микроскопа Motiс AE31 (Китай). Фотографирование клеточных культур ГИСО проводилось с помощью инвертированного микроскопа Leica DFC420 (Германия) оснащенного цифровой фотокамерой и программным обеспечением для визуализации изображений Leica Application Suite Version 2.7.1 R1 [Build: 1384].

Пересев клеточной линии ГИСО в новую чашку Петри (пассаж) выполнялся при покрытии монослоем клеток 85 – 95% поверхности чашки Петри, т.е. при достижении клетками 85-95% конfluence. Для выполнения пассажа в стерильных условиях ламинарного бокса из чашки Петри с клетками ГИСО удалялась культуральная среда, затем чашка Петри промывалась 2-3мл стерильного фосфатно-солевого раствора Дюльбекко (DPBS – ПанЭко, Россия). После этого в чашку Петри с клетками ГИСО добавляли 1,5мл 0,05% стерильного раствора трипсина (ПанЭко, Россия) для открепления клеток. Далее чашку Петри с клетками ГИСО помещали в CO₂-инкубатор на 5-7 мин. После этого выполняли

световую микроскопию клеток ГИСО. В случае открепления клеток ГИСО с поверхности чашки Петри в поле зрения микроскопа наблюдалось их массовое флотирование. Далее в чашку Петри с клетками ГИСО добавляли 3мл культуральной среды для нейтрализации трипсина. После этого клетки ресуспензировали дозатором и вносили необходимое количество суспензии в новую чашку Петри, содержащую 8мл культуральной среды. Для выполнения пассажа в новую чашку Петри обычно добавляли $0,5 \times 10^5$ /мл клеток ГИСО. Для подсчета клеток ГИСО использовались слайды Dual-chamber cell counting slides (Bio-Rad Laboratories, США), в ячейку которых добавляли 10мкл клеточной суспензии. Далее слайды помещали в автоматический счетчик клеток TC20 (Bio-Rad Laboratories, США) для определения количества клеток в 1 мл культуральной среды.

Длительное хранение клеточных линий ГИСО осуществляли в жидком азоте с использованием криохранилища (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого выполнялась процедура заморозки клеток в специальной культуральной среде для криоконсервации, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (Biosera, Южная Америка) и 10% диметилсульфоксид (Neofroxx, Германия). Для криоконсервации клетки ГИСО трипсинизировали и клеточную суспензию собирали в 15мл центрифужную пробирку (Servicebio, Китай). После центрифугирования (1000 об/мин – 3 мин) супернатант удаляли, а к клеточному осадку добавляли 2 мл среды для криоконсервации и ресуспензировали. После этого 1мл клеточной суспензии вносили в криовиал на 1,5 мл (Biologix, Китай). Одна чашка Петри 100 мм позволяет подготовить 2 криовиала с клетками ГИСО. Далее криовиалы помещали в криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, США), содержащий изопропиловый спирт, необходимый для медленного щадящего режима заморозки клеточной суспензии. Криоконтейнер с криовиалами помещали на 72 часа в морозильную камеру ($t^\circ = -80^\circ\text{C}$). В дальнейшем криовиалы переносили в криохранилище для длительного хранения клеточных линий в жидком азоте. Для разморозки клеточной линии ГИСО криовиал извлекали из криохранилища, оттаивали и клеточную суспензию помещали в чашку Петри

диаметром 100мм, содержащей 8мл культуральной среды. Через 24 часа выполняли замену культуральной среды и далее при достижении клетками 85-95% конфлюэнтности выполняли пассаж.

2.3 Таргетные препараты и антитела, используемые для выполнения экспериментов

Для экспериментальной работы использовались таргетные препараты:

1) Мультиканазные ингибиторы – иматиниб (ИМ), сунитиниб (СУ), регорафениб (РЕГО) (SelleckChem, США);

2) Фактор роста фибробластов 2-го типа человеческий, рекомбинантный (FGF-2 – Merk, Германия); анти-FGF-2 мАТ – моноклональные антитела, нейтрализующие FGF-2 (№ 05-117, Merk, Германия);

3) Селективные ингибиторы FGFR-сигналинга – BGJ398, AZD4547, TAS-120 (SelleckChem, США).

Для выполнения иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии использовались первичные антитела (АТ) к фосфорилированным и общим формам белков:

1) Первичные АТ к тирозинкиназным рецепторам: pKIT Y719 (№ 3391, Cell Signaling, США), c-KIT (№ A4502, Dako, Carpinteria, США), pFGFR1/2 Y653/654 (№ 3476, Cell Signaling, США), FGFR1 (№ 9740, Cell Signaling, США), FGFR2 (№ 23328, Cell Signaling, США), FGFR3 (№ 4574, Cell Signaling, США), FGFR4 (№ SAB1300019, Sigma-Aldrich, США), pVEGFR1 (№ SAB4504006, Sigma-Aldrich, США), VEGFR1 (№ 64094, Cell Signaling, США), VEGFR1 (№ sc-271789, Santa Cruz Biotechnology, США), pVEGFR2 (№ 2474, Cell Signaling, США), VEGFR2 (№ ab39378, Abcam, Великобритания), VEGFR2 (№ ab134191, Abcam, Великобритания), VEGFR3 (№ ab243232, Abcam, Великобритания);

2) Первичные АТ к факторам роста: FGF-2 (№ sc-365106, Santa Cruz Biotechnology, США), VEGF-A (№ ZRB1 320, Sigma-Aldrich, США);

3) Первичные АТ к нерецепторным тирозинкиназам: pSTAT1 Ty701 (№ 7649, Cell Signaling, США), STAT-1 (№ 14994, Cell Signaling, США), pMAPK

(Erk1/2) Thr202/Tyr204 (№ 4370, Cell Signaling, США), MAPK (Erk1/2) (№ 4696, Cell Signaling, США), pAKT S473 (№ 4060, Cell Signaling, США), AKT (№ 4691, Cell Signaling, США), pFRS-2 Y196 (№ 3864, Cell Signaling, США), FRS-2 (№ sc-17841, Santa Cruz Biotechnology, США);

4) Первичные АТ к маркерам апоптоза: поли-АДФ(рибоза)-полимераза (ПАРП) (№ 5625, Cell Signaling, США), каспаза-3 (№ 9662, Cell Signaling, США);

5) Первичное АТ к актину (№ A00730-200, GenScript, США) для оценки уровня белка в клеточных лизатах.

2.4 Анализ цитотоксической активности таргетных препаратов с помощью колориметрического МТТ-теста

Для изучения цитотоксической активности таргетных препаратов ИМ, СУ, РЕГО, BGJ398 клетки ГИСО засевали в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов (Servicebio, Китай) в количестве $0,5 \times 10^5$ /мл и давали клеткам прикрепиться к пластику и расти в течение 24 часов. Далее в лунки планшетов добавляли таргетные препараты в концентрациях от 400 мкмоль/л до 0,000001 мкмоль/л и проводили культивирование клеток в течение 72 часов. После этого из лунок удаляли культуральную среду и добавляли новую, содержащую смесь реагентов MTS (Promega, Madison, США) и феназинметосульфат (PMS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, США) в соотношении 20:1. Клетки культивировали с указанными реагентами в течение 1,5-2 часов. Далее оптическую плотность культуральной среды анализировали с помощью планшетного фотометра MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм.

Желтый краситель MTS-тетразолий (МТТ) под влиянием митохондриальной НАДФН-оксидазы превращается в коричневый нерастворимый формазан, что способствует увеличению оптической плотности культуральной среды. В случае гибели клеток процесс превращения MTS-тетразолия (МТТ) в формазан нарушается, что способствует снижению оптической плотности культуральной среды [142].

На основании результатов колориметрического МТТ-теста были определены эффективные концентрации таргетных препаратов, вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC_{50}) клеток ГИСО. Для расчета IC_{50} таргетных препаратов использовалась компьютерная программа IC 50 Tool Kit (<http://ic50.tk/>, дата обращения 12.05.2025).

2.5 Изучения синергизма комбинации препаратов в отношении клеточных линий ГИСО

Для изучения синергизма комбинаций препаратов (ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120, BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО) клетки ГИСО засевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов (Servicebio, Китай) в количестве $0,5 \times 10^5$ /мл и давали клеткам прикрепиться к пластику и расти в течение 24 часов. Далее клетки ГИСО культивировали в присутствии комбинаций препаратов (ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120, BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО) в течение 72 часов. Концентрации препаратов: ИМ, СУ, РЕГО (0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л; 4 мкмоль/л); BGJ398, AZD4547, TAS-120 (0,125 мкмоль/л; 0,25 мкмоль/л; 0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л).

Жизнеспособность клеток в присутствии препаратов оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста. Для вычисления показателя синергизма (average synergy score) использовались четыре модели взаимодействия препаратов: 1) модель нулевой эффективности взаимодействия (ZIP); 2) Модель независимости Блисса (Bliss); 3) Модель аддитивности Лоу (Loewe); 4) Эталонная модель взаимодействия (HSA) [45, 46, 156, 210]. Показатель синергизма препаратов определяли с помощью компьютерной программы 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) [210].

2.6 Оценка пролиферации клеток ГИСО с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США)

Для изучения пролиферативной активности клеток ГИСО использовался клеточный анализатор iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США), позволяющий анализировать пролиферацию клеток в режиме реального времени. Клетки ГИСО в количестве $0,5 \times 10^5$ /мл засеивали в лунки кассет E-Plate L8 PET (ACEA Biosciences, США), которые устанавливались в прибор iCELLigence RTCA. Далее сам прибор помещали в CO₂-инкубатор Binder (США). Через 24 часа в стерильных условиях ламинарного бокса в лунки кассет добавляли таргетные препараты ИМ, СУ, РЕГО, BGJ398, AZD4547, TAS-120 и их комбинации (ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120, BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО). Индекс пролиферации клеток ГИСО устанавливался каждый час за счет регистрации изменений электрического потенциала электродов, находящихся на дне лунок кассеты E-Plate L8 PET, в зависимости от количества клеток. С помощью программного обеспечения RTCA Version 1.0 (ACEA Biosciences, США) осуществлялась визуализация кривой пролиферации клеток ГИСО на экране компьютера.

2.7 Окраска клеток ГИСО фиксирующим раствором кристаллического фиолетового

Фиксирующий раствор кристаллического фиолетового включает следующие компоненты (на 50 мл дистиллированной H₂O): 25мг порошка кристаллического фиолетового, 3,1мл 16% раствора формальдегида, 5мл фосфатно-солевого буферного раствора (10х); 0,5мл 100% метанола.

Из чашек Петри диаметром 100мм с клетками ГИСО удаляли культуральную среду и добавляли 6мл фиксирующего раствора кристаллического фиолетового с последующей инкубацией при комнатной t° в течение 20 минут. Далее чашки Петри отмывали от фиксирующего раствора в проточной холодной воде в течение 2-3 минут и оставляли сушить на фильтровальной бумаге на 3-4 часа при комнатной t°. После этого чашки Петри фотографировали. Для

количественной оценки интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым, в чашки Петри добавляли 3мл 1% раствора додецилсульфата натрия (SDS) и инкубировали на шейкере в течение 60 минут при комнатной t° . Далее оптическую плотность раствора из чашек Петри определяли с помощью планшетного фотометра MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 540нм. Высокая пролиферативная активность клеток ГИСО способствует увеличению интенсивности окраски чашек Петри фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Напротив, вследствие гибели клеток ГИСО под действием таргетных препаратов снижается интенсивность окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым [96].

2.8 Анализ экспрессии клеточных белков методом иммуноблоттинга

Для исследования экспрессии белков методом иммуноблоттинга готовились клеточные лизаты ГИСО с использованием лизирующего раствора RIPA-буфера следующего состава: 25 ммоль/л Трис-HCl, pH 7,6; 150 ммоль/л NaCl; 5 ммоль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты; 1% NP-40, 1% дезоксихолата натрия, 0, 1% додецилсульфата натрия). К RIPA-буферу добавлялись ингибиторы протеаз – protease inhibitor cocktail solution и PMSF (Sigma-Aldrich, США) - 1мкл на 100мкл образца.

После удаления супернатанта в чашку Петри с клетками ГИСО добавляли 150мкл RIPA-буфера и оставляли на льду на 5 минут. Далее с помощью пластикового скребка клеточную массу открепляли со дна чашки Петри и помещали в пластиковую пробирку типа эппендорф (Biologix, Китай) объемом 1 мл, которую инкубировали на льду в течение 10 минут. Далее эппендорфы с клеточной массой ГИСО центрифугировали (11 000 об/мин) в течение 30 минут при $t^{\circ} = +2^{\circ}\text{C}$. Образовавшийся после центрифугирования супернатант (клеточный лизат) собирали в новую пробирку типа эппендорф (Biologix, Китай) объемом 1мл. Далее определяли концентрацию белка в лизате колориметрическим методом Бредфорда по анализу оптической плотности раствора при длине волны 540нм с использованием набора реагентов BCA Protein

Assay Kit (Thermo Fisher, США) и планшетного фотометра MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

К лизату ГИСО, содержащему 20-30мкг белка, добавляли LDS-буфер (Invitrogen, США), смешанный с 2-меркаптоэтанолом (Sigma-Aldrich, США). Далее лизат инкубировали в термостате BioSan (Латвия) при $t^{\circ} = +95^{\circ}\text{C}$ в течении 5 минут. После охлаждения до $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$, лизаты загружали в лунки 10-луночного коммерческого полиакриламидного геля NuPAGE (Invitrogen, США): 4-12% Бис-Трис гель для изучения низкомолекулярных белков массой до 100 кДа; 3-8% Трис-ацетатный гель для изучения высокомолекулярных белков массой более 100 кДа. Гель помещали в камеру MINI-Protean TETRA (Bio-Rad, США) с буферным раствором (Invitrogen, США) и выполняли вертикальный электрофорез белков при напряжении 80 вольт.

После завершения электрофореза осуществляли процедуру трансфера, т.е. переноса белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Для этого гель и нитроцеллюлозную мембрану помещали в специальную камеру (Bio-Rad, США), содержащую трансфер-буфер, на 90 минут при силе тока 350мА и $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$. После трансфера нитроцеллюлозная мембрана блокировалась в растворе, содержащем 5% обезжиренное молоко (Invitrogen, США) или 5% бычий сывороточный альбумин (ПанЭко, Россия). Далее к нитроцеллюлозной мембране добавляли соответствующие первичные АТ и инкубировали при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$ в течение 10-12 часов. Далее нитроцеллюлозную мембрану отмывали фосфатно-солевым раствором от первичных антител и инкубировали со вторичными АТ (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированными с ферментом (HRP) в течение 60 минут при комнатной t° . После этого выполнялась детекция мембраны хемотрюминесцентным 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).

2.9 Оценка взаимодействия между клеточными белками методом коиммунопреципитации

Для изучения коиммунопреципитации белков готовили клеточные лизаты ГИСО с использованием лизирующего ТЕВ-буфера следующего состава: 50 ммоль/л Трис-HCl pH 7,5; 150 ммоль/л NaCl; 1% NP-40; 10% глицерина. К ТЕВ-буферу добавлялись ингибиторы протеаз – protease inhibitor cocktail solution и PMSF (Sigma-Aldrich, США) - 1 мкл на 100 мкл образца. Эппендорфы с клеточной массой инкубировали с ТЕВ-буфером на льду в течение 10 минут. После этого выполняли центрифугирование образцов (11 000 об/мин) в течение 10 минут при $t^{\circ} = +2^{\circ}\text{C}$. Образовавшийся после центрифугирования супернатант (клеточный лизат) собирали в новую пробирку типа эппендорф (Biologix, Китай) объемом 1 мл. К полученному образцу добавляли 2-3 мкг соответствующих преципитирующих антител и инкубировали в ротаторе при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$ в течение 10-12 часов.

Далее к лизатам добавляли 30 мкл специальных гранул сефарозы – protein A and G Sepharose beads (Santa Cruz Biotechnology, США) и инкубировали в ротаторе при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$ в течение 60 минут. После отмыва образцов с помощью ТЕВ-буфера к образовавшемуся белковому осадку добавляли LDS-буфер (Invitrogen, США), смешанный с 2-меркаптоэтанолом (Sigma-Aldrich, США). Далее лизат инкубировали в термостате при $t^{\circ} = +95^{\circ}\text{C}$ в течении 5 минут. После охлаждения до $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$, лизаты загружали в лунки 10-луночного коммерческого полиакриламидного геля NuPAGE (Invitrogen, США): 4-12% Бис-Трис гель для изучения низкомолекулярных белков массой до 100 кДа; 3-8% Трис-ацетатный гель для изучения высокомолекулярных белков массой более 100 кДа. После этого выполнялся вертикальный электрофрез белков, трансфер и детекция мембраны как при иммуноблоттинге (см. выше).

2.10 Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназных рецепторов в клетках ГИСО

Для выполнения иммунофлуоресцентной микроскопии клетки ГИСО засевали в лунки плоскодонных 6-луноных планшетов (Servicebio, Китай), в которые были заранее помещены покровные стекла, покрытые адгезивным раствором L-полилизина (Sigma-Aldrich, США). Клеткам давали возможность прикрепиться к покровным стеклам и расти в течение 96 часов. В отдельном эксперименте в лунки планшета через 24 часа культивирования добавляли ИМ (1 мкмоль/л) и его комбинацию с BGJ398 (1 мкмоль/л) и инкубировали 72 часа.

Далее клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в ФСБ (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 минут при комнатной t° . В случае иммунофлуоресцентного окрашивания рецептора FGFR2 после фиксации формальдегидом выполняли пермобилизацию клеток ледяным раствором 100% метанола в течение 10 минут при $t^{\circ} = -20^{\circ}\text{C}$. Далее лунки планшета промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) и добавляли 1 мл блокирующего раствора, содержащего ФСБ, 5% козью сыворотку, 0,3% Triton X-100 и инкубировали 60 минут при комнатной t° . Далее покровные стекла с фиксированными клетками ГИСО инкубировали с первичными АТ к белкам c-KIT (№ A4502, Dako, Carpinteria, США), FGFR1 (№ 9740, Cell Signaling, США), FGFR2 (№ 23328, Cell Signaling, США), VEGFR1 (№ sc-271789, Santa Cruz Biotechnology, США), VEGFR2 (№ ab39378, Abcam, Великобритания), растворенными в буфере, содержащем ФСБ, 1% бычий сывороточный альбумин и 0,3% Triton X-100 в течение 10-12 часов при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$.

Далее покровные стекла с фиксированными клетками ГИСО промывали ФСБ три раза по 5 минут в темноте и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами Alexa Fluor 488 или TexRed (Invitrogen, США), которые были растворены в буфере, содержащем ФСБ, 1 % бычий сывороточный альбумин и 0,3% Triton X-100. Инкубация со вторичными антителами происходила в темноте при комнатной t° в течение 60 минут. После этого покровные стекла с фиксированными клетками ГИСО промывали

ФСБ три раза по 5 минут в темноте и окрашивали раствором DAPI (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 секунд. Далее покровные стекла с фиксированными клетками ГИСО промывали ФСБ и помещали на предметные стекла, покрытые флуоресцентным маслом (Vector Laboratories, Inc., США). После этого выполнялась микроскопия клеток ГИСО с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX63 (Япония). Визуализация изображений осуществлялась с помощью программного обеспечения cellSens Dimension 1.9 (Olympus, Япония).

2.11 Нокдаун *KIT* в клетках ГИСО с помощью трансфекции короткой интерферирующей РНК

Для нокдауна *KIT* использовалась соответствующая короткая интерферирующая РНК киРНК *KIT* (№ L-003150-00-005, Dharmacon RNA Technologies, США) и реагент для трансфекции Lipofectamine RNAimax Reagent (№ 1928036, США). Липофектамин (12мкл) и киРНК *KIT* (2,5 нмоль/л) растворяли в 1мл специальной безсывороточной культуральной среды для трансфекции Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США). Далее 1мл среды Opti-MEM, содержащей липофектамин и киРНК *KIT*, добавляли в чашку Петри диаметром 60 мм (Servicebio, Китай) с клетками ГИСО и инкубировали в течение 24 часов. После этого в чашку Петри с клетками ГИСО дополнительно вносили 1мл культуральной среды RPMI-1640 (Панэко, Москва, Россия) и инкубировали еще 24 часа. В дальнейшем готовились клеточные лизаты ГИСО с использованием RIPA-буфера. После этого выполнялась процедура иммуноблоттинга для исследования экспрессии фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора с-KIT. Нокдаун *KIT* в клетках ГИСО подтверждался отсутствием экспрессии фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора с-KIT.

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

Для проведения генетического анализа осуществляли выделение матричной РНК (мРНК) из клеток ГИСО. Для этого клетки ГИСО трипсинизировали, собирали в 15 мл центрифужные пробирки (Servicebio, Китай), отмывали ФСБ. Далее к клеточному осадку добавлялся 1мл TRIzol reagent (Invitrogen, США) и проводилась инкубация в течение 5 минут при комнатной t° . После этого к образцу добавляли 200 мкл хлороформа и инкубировали 3 минуты при комнатной t° . Далее выполнялось центрифугирование образцов (10 600 об/мин, 15 минут при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$). После центрифугирования из пробирки забирали верхний прозрачный слой жидкости, содержащий общую мРНК клеток и переносили его в пластиковую пробирку типа эппендорф (Biologix, Китай) объемом 1 мл. Далее к образцу с мРНК добавляли 500 мкл изопропилового спирта и выполняли центрифугирование (10 600 об/мин, 10 минут при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$). После этого супернатант удаляли и к клеточному осадку, содержащему общую мРНК добавляли 1 мл 75% этилового спирта. Далее выполняли центрифугирование (8 400 об/мин, 5 минут при $t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$). Супернатант удаляли, а клеточный осадок, содержащий общую мРНК высушивали в термостате BioSan (Латвия) при $t^{\circ} = +50^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут. После этого клеточный осадок, содержащий общую мРНК растворяли в 20 мкл воды, не содержащей РНКазы (RNase-free water - TransGen Biotech, Китай). Образцы мРНК хранили в морозильной камере при $t^{\circ} = -80^{\circ}\text{C}$.

Далее изучалась экспрессия генов FGFR-сигнального пути (*FGF-2*, *FGFR1-4*) и VEGFR-сигнального пути (*VEGF-A*, *VEGFR1-3*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Для этого на матрице РНК клеток ГИСО выполняли синтез комплементарной ДНК (кДНК) методом обратной транскрипции с использованием набора реагентов RT2 First Strand Kit (SABiosciences, США). Амплификацию кДНК осуществляли с помощью набора реагентов qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), а также прямых и обратных праймеров *FGF-2*, *FGFR1-4*, *VEGF-A*, *VEGFR1-3* (Евроген, Россия).

Амплификация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) использовалась в качестве контроля. Для проведения ПЦР использовался аплификатор CFX96 (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя.

Для определения вторичных мутаций гена *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 гена *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.

2.13 Оценка экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT в клетках ГИСО методом проточной цитометрии

Клетки ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 в количестве $0,5 \times 10^5$ /мл засевали в чашки Петри диаметром 100 мм (Servicebio, Китай). Клеткам давали возможность прикрепиться к пластику и расти в течение 96 часов. Далее клетки трипсинизировали, собирали в 15 мл центрифужные пробирки (Servicebio, Китай), отмывали ФСБ и фиксировали 4% раствором параформальдегида в ФСБ (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 минут при комнатной t° . После отмыва клеток ФСБ выполняли их пермобилизацию ледяным раствором 100% метанола в течение 10 минут на льду. Далее клетки отмывали ФСБ и инкубировали с первичными АТ к белку с-KIT (№ 3308, Cell Signaling, США), растворенными в буфере (ФСБ, 0,5 % бычий сывороточный альбумин) в течение 60 минут при комнатной t° . Далее клетки отмывали ФСБ и инкубировали со вторичными АТ, конюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (№ 4408, Cell Signaling, США), растворенными в буфере (ФСБ, 0,5 % бычий сывороточный альбумин) в течение 30 минут при комнатной t° . После отмыва ФСБ клетки ресуспензировали в 500 мкл ФСБ и анализировали флуоресценцию с-KIT на проточном цитометре

BD FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, США) с помощью программного обеспечения BD FACSDiva, Version 7.0.

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

Концентрацию FGF-2 (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора реагентов Human FGF basic Quantikine ELISA Kit (№ DFB50, R&D Systems, Tustin, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО определяли методом ИФА при помощи набора реагентов Human VEGF-A ELISA Kit (№ RAB0507, 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.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

3.1.1 Характеристика клеточных линий ГИСО, чувствительных резистентных к таргетному препарату ИМ

В представленной работе использовалась ИМ-чувствительная клеточная линия ГИСО Т1. В присутствии ИМ в концентрациях 0,5мкмоль/л и 1 мкмоль/л, жизнеспособность опухолевых клеток ГИСО Т1 существенно снижалась, что подтверждалось наличием большого количества флотирующих (т.е. погибших) клеток при световой микроскопии (Рисунок 3).

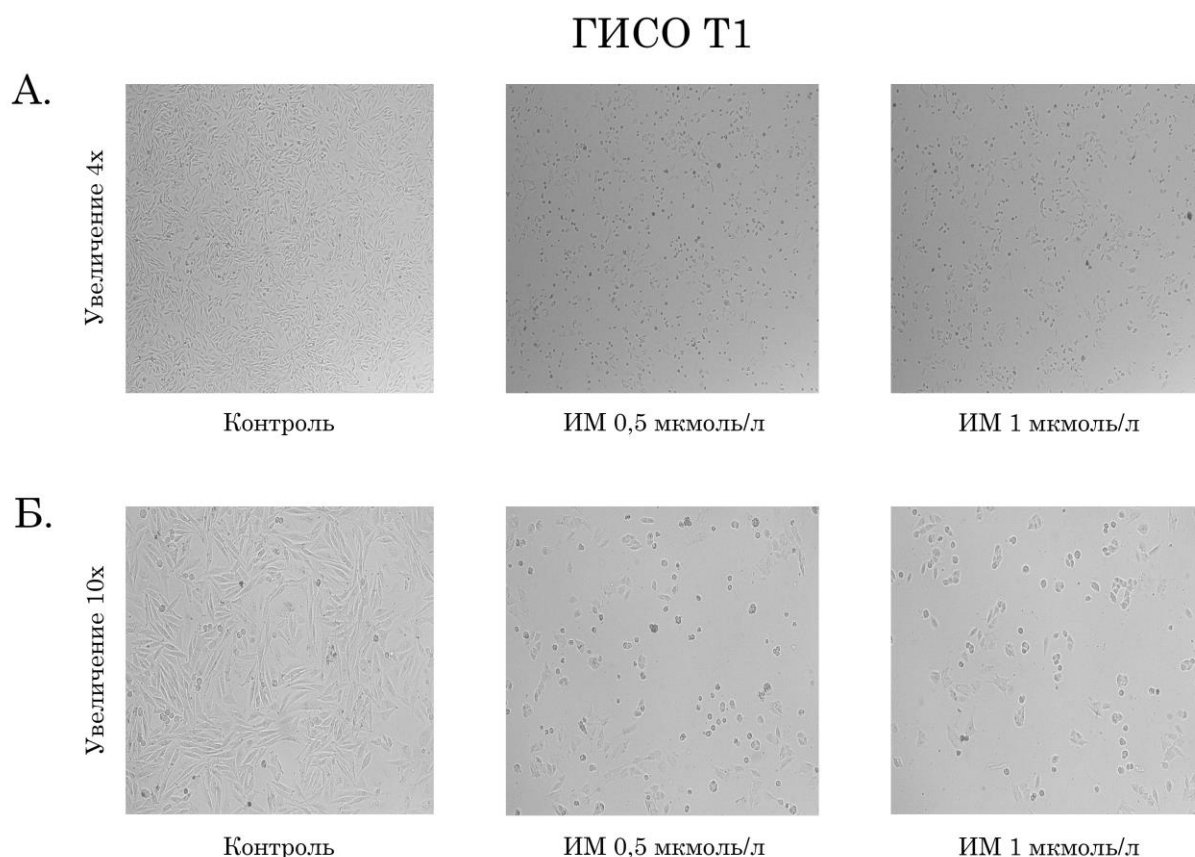


Рисунок 3 – Световая микроскопия ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1. Клетки культивировались в течение 72 часов в отсутствии ИМ (контроль) и в его присутствии в концентрации 0,5 мкмоль/л и 1 мкмоль/л. А: микроскопия клеток при увеличении 4х; Б: микроскопия клеток при увеличении 10х.

ИМ-чувствительные клетки ГИСО Т1 культивировали в присутствии таргетного препарата ИМ в течение 20 месяцев (выполнено, приблизительно, 250 пассажей). Концентрация ИМ увеличивалась каждые 14 дней. Начальная концентрация ИМ составляла 10 нмоль/л. Через 20 месяцев культивирования клетки ГИСО Т1 начали сохранять жизнеспособность в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л, что свидетельствует о развитии у опухолевых клеток вторичной (приобретенной) резистентности к данному таргетному препарату (Рисунок 4). Полученная ИМ-резистентная линия опухолевых клеток ГИСО Т1 была обозначена как ГИСО Т1-ИМ-Р [28].

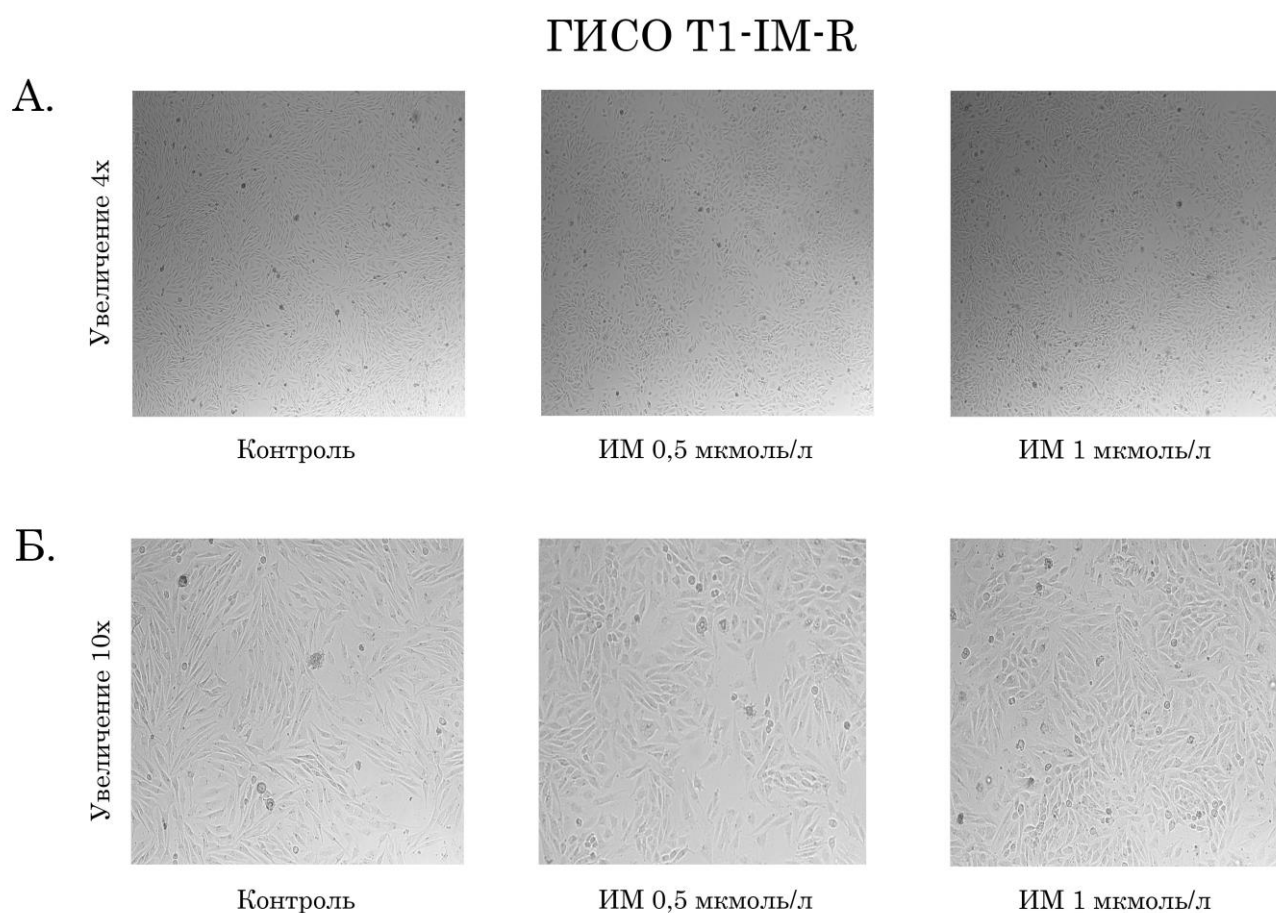


Рисунок 4 – Световая микроскопия ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-Р. Клетки культивировались в течение 72 часов в отсутствии ИМ (контроль) и в его присутствии в концентрации 0,5 мкмоль/л и 1 мкмоль/л. А – микроскопия клеток при увеличении 4х; Б – микроскопия клеток при увеличении 10х.

В присутствии ИМ в концентрации 0,5 мкмоль/л и 1 мкмоль/л, сохранялась жизнеспособность опухолевых клеток ГИСО 430, имеющих вторичную гетерозиготную миссенс-мутацию в 13 экзоне *KIT* (V654A), что подтверждает вторичную резистентность опухолевых клеток к данному препарату (Рисунок 5).

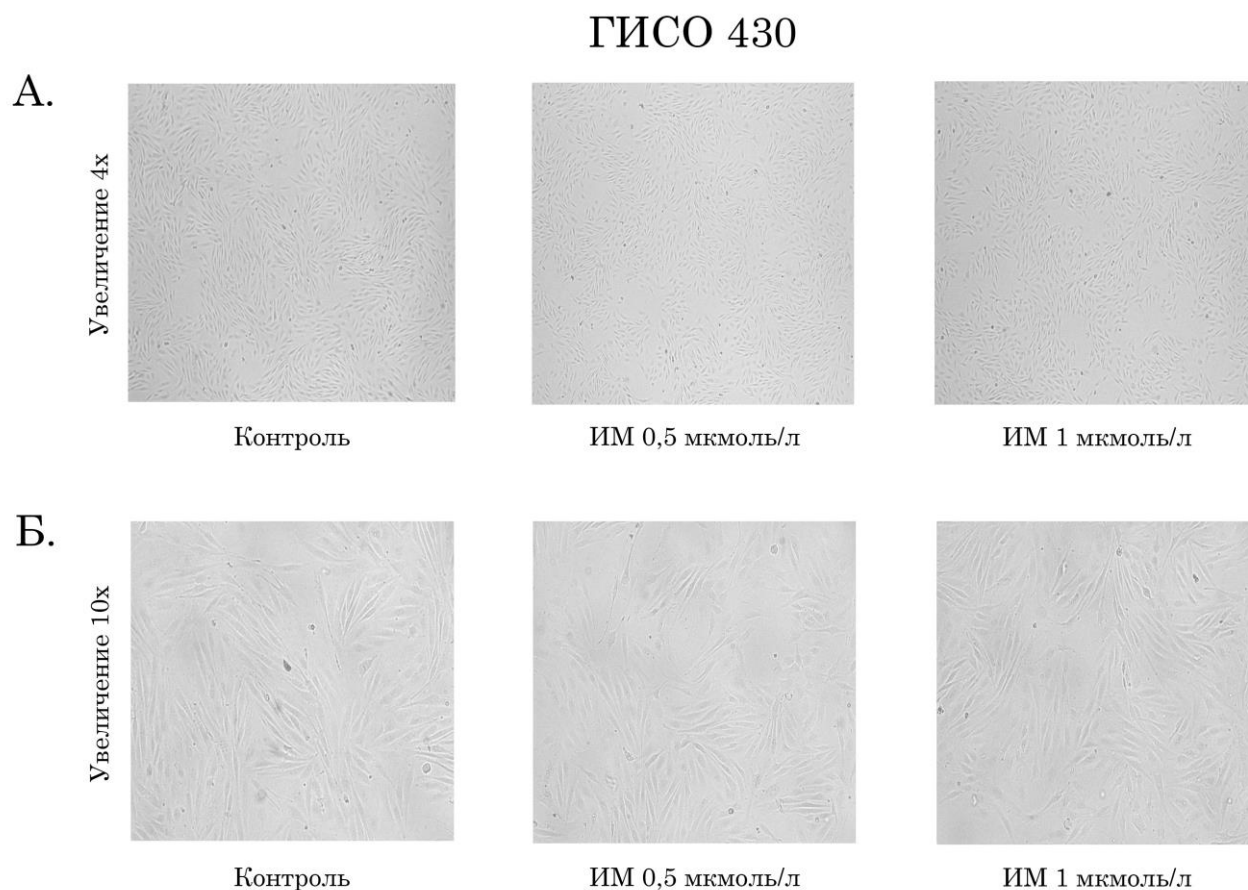


Рисунок 5 – Световая микроскопия ИМ-резистентных клеток ГИСО 430. Клетки культивировались в течение 72 часов в отсутствии ИМ (контроль) и в его присутствии в концентрации 0,5 мкмоль/л и 1 мкмоль/л. А – микроскопия клеток при увеличении 4х; Б – микроскопия клеток при увеличении 10х.

Полученные результаты световой микроскопии подтверждаются окраской чашек Петри с клетками ГИСО T1, ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового (Рисунок 6А-В).

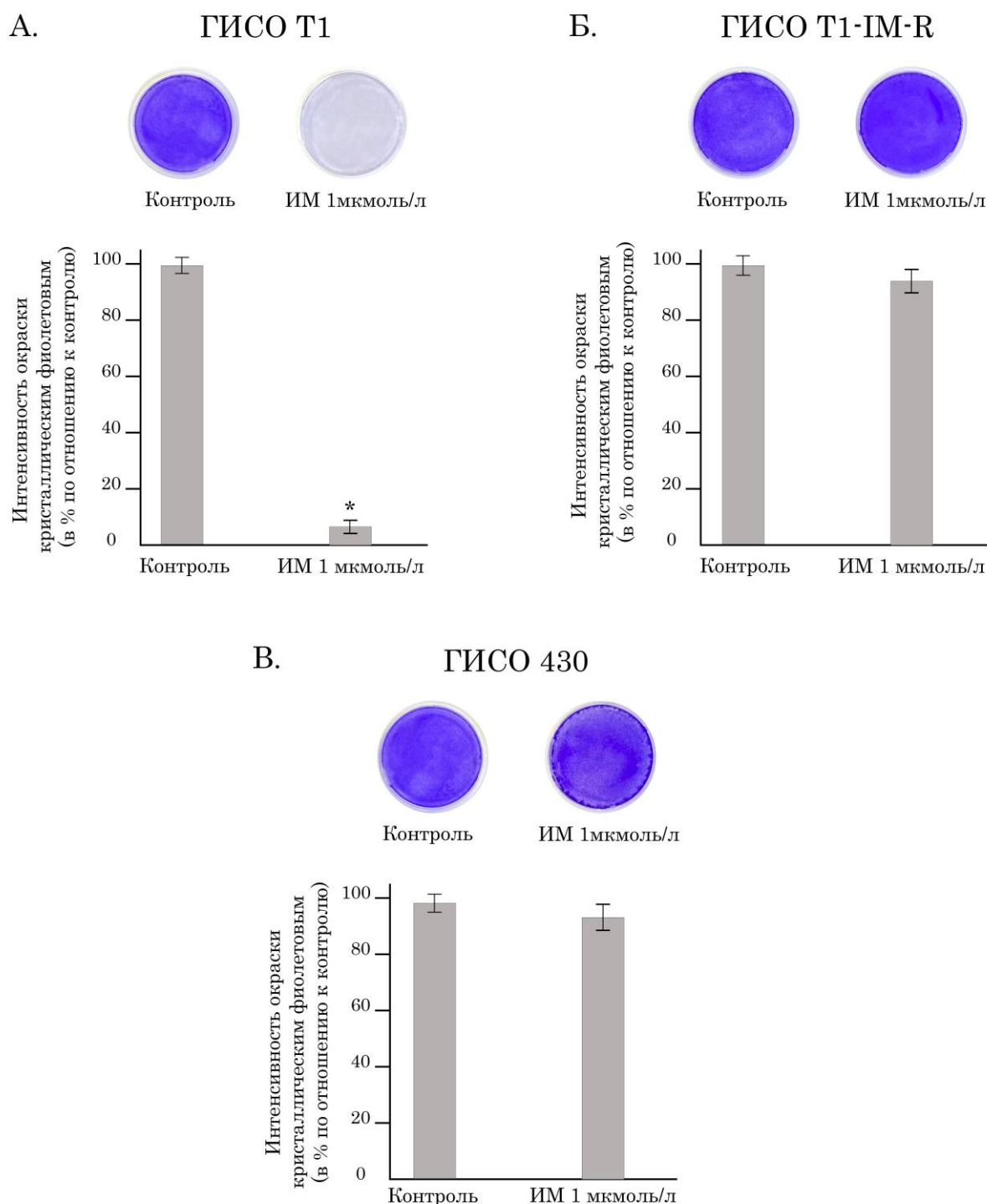


Рисунок 6 – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО Т1 (А), ГИСО Т1-ИМ-R (Б) и ГИСО 430 (В) фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Клетки ГИСО культивировались в течение 72 часов в отсутствии ИМ (контроль) и в его присутствии в концентрации 1 мкмоль/л. После этого чашки Петри фотографировали. На графиках – интенсивность окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,001$.

В присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО Т1 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла не более 10% от контроля, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток под действием таргетного препарата (Рисунок 6А). Напротив, в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль в чашках Петри с клетками ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности клеток в присутствии таргетного препарата (Рисунок 6Б-В).

Таким образом, клетки ГИСО Т1-ИМ-R, как и клетки ГИСО 430, сохраняли жизнеспособность в присутствии ИМ. В тоже время, жизнеспособность опухолевых клеток ГИСО Т1 в присутствии ИМ существенно снижалась.

В присутствии ИМ наблюдалось дозозависимое снижение пролиферативной активности клеток ГИСО Т1, что подтверждает чувствительность клеток к таргетному препарату (Рисунок 7А). В тоже время, пролиферативная активность клеток ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 в присутствии ИМ не изменялась (Рисунок 7Б-В), что является признаком резистентности к препарату.

Учитывая известный факт, что под влиянием ИМ происходит гибель опухолевых клеток ГИСО преимущественно по механизму апоптоза [15, 220], было проведено сравнительное исследование способности препарата индуцировать апоптоз клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430. Методом иммуноблоттинга было обнаружено отсутствие экспрессии маркеров апоптоза – расщепленных форм каспазы-3 и поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП) – в клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 после их инкубации с ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в течение 72 часов (Рисунок 7Г). Напротив, клетки ГИСО Т1 под влиянием ИМ погибали по механизму апоптоза, о чем свидетельствует высокая экспрессия расщепленных форм каспазы-3 и ПАРП (Рисунок 7Г).

Таким образом, ИМ индуцировал апоптоз только клеток ГИСО Т1. Программированная гибель клеток ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 под влиянием данного препарата отсутствовала.

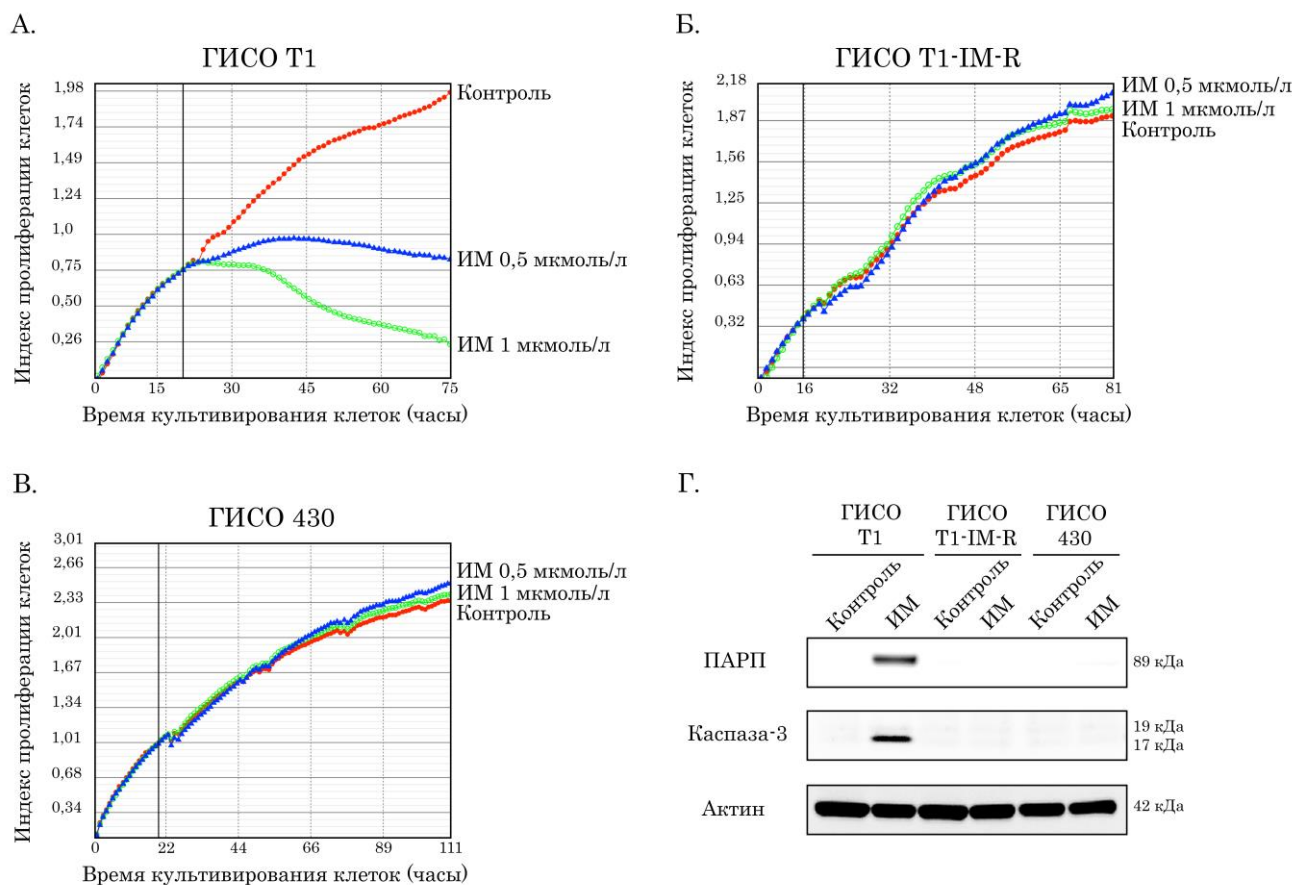


Рисунок 7 - Изучение способности ИМ ингибировать пролиферацию клеток ГИСО и индуцировать их гибель по механизму апоптоза. Клетки ГИСО культивировались в отсутствии ИМ (контроль) и в его присутствии в концентрации 0,5 мкмоль/л и 1 мкмоль/л. Оценка пролиферации клеток ГИСО Т1 (А), ГИСО Т1-ИМ-R (Б) и ГИСО 430 (В) в присутствии ИМ проводилась с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); Г – Исследование апоптоза клеток ГИСО в присутствии ИМ (1 мкмоль/л, инкубация 72 часа) методом иммуноблотинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах.

На основании результатов колориметрического МТТ-теста были определены эффективные концентрации ИМ, вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC_{50}) клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 (Таблица 1).

Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО 430 составило $54,3 \pm 7,9$ мкмоль/л, что незначительно превышает значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R ($47,1 \pm 1,3$ мкмоль/л). В тоже время, показатели IC_{50} ИМ для клеточных линий ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 более чем в 1000 раз превышают значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1, которое составило $0,04 \pm 0,0003$ мкмоль/л.

Таблица 1 – Показатели IC_{50} ИМ для клеточных линий
ГИСО T1, ГИСО T1-ИМ-R, ГИСО 430

Показатель	ГИСО T1	ГИСО T1-ИМ-R	ГИСО 430
IC_{50} ИМ, мкмоль/л	$0,04 \pm 0,0003$	$47,1 \pm 1,3$	$54,3 \pm 7,9$
Кратность увеличения IC_{50} ИМ относительно ГИСО T1		1 177,5	1 357,5
Кратность увеличения IC_{50} ИМ относительно ГИСО T1-ИМ-R			1,15

Примечание – Клетки ГИСО культивировали в присутствии иматиниба в течение 72 часов. Полученные результаты представлены в виде ср. арифм. $\pm$ станд. ош.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о наличии вторичной (приобретенной) резистентности к ИМ у опухолевых клеток линии ГИСО T1-ИМ-R. Подобно ГИСО 430, имеющим первичную резистентность к ИМ, клетки ГИСО T1-ИМ-R сохраняют жизнеспособность в присутствии ИМ, таргетный препарат не вызывает их апоптоз. Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R незначительно отличается от значения IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО 430 и более чем в 1000 раз превышают значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1.

Вторичная (приобретенная) резистентность клеток ГИСО к ИМ может быть обусловлена развитием вторичных мутаций *KIT*, возникших в ходе длительного культивирования опухолевых клеток в присутствии таргетного препарата [134, 149, 129, 191]. В связи с этим, было выполнено секвенирование *KIT* методом Сэнгера в клеточной линии ГИСО T1-IM-R (Таблица 2).

Таблица 2 – Мутационный статус *KIT* в клеточных линиях
ГИСО T1 и ГИСО T1-IM-R

Мутации <i>KIT</i>	ГИСО T1	ГИСО T1- IM-R
<i>KIT</i> , 9-й экзон, AY502-503	—	—
<i>KIT</i> , 11-й экзон	Делеция (V570 - Y578)	Делеция (V570 -Y578)
<i>KIT</i> , 13-й экзон, K642E	—	—
<i>KIT</i> , 13-й экзон	—	—
<i>KIT</i> , 14-й экзон, T670I, T701I	—	—
<i>KIT</i> , 17-й экзон, D816A/G/H/V, D820A/E/G/Y, Y823D	—	—
<i>KIT</i> , 17-й экзон, N822H/K/Y	—	—
<i>KIT</i> , 18-й экзон, A829P	—	—

Результаты секвенирования *KIT* свидетельствуют о наличии идентичной мутации в 11-м экзоне в клеточных линиях ГИСО T1 и ГИСО T1-IM-R. Вторичные мутации *KIT* в клетках ГИСО T1-IM-R отсутствуют, в отличие от клеток ГИСО 430, имеющих вторичную мутацию в 13-м экзоне *KIT* [150]. За счет вторичной мутации *KIT* клетки ГИСО 430 обладают резистентностью к ИМ. Таким образом, развитие вторичной резистентности к ИМ в клетках ГИСО T1-IM-R не связано с возникновением вторичных мутаций *KIT* [28].

3.1.2 Экспрессии рецепторных тирозинкиназ в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО

Развитие вторичной резистентности клеток ГИСО к ИМ может быть обусловлено возникновением гиперактивации рецепторных тирозинкиназ (РТК), которые будут обеспечивать запуск пролиферативных каскадов в опухолевых клетках [19, 124, 175, 218]. В связи с этим был проведен скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм РТК (49 наименований) в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 с использованием набора Proteome Profiler Human Phospho-Receptor tyrosine kinase Array Kit (R&D Systems, ARY001B, США).

В клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430, имеющих признаки резистентности к ИМ, отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированных форм рецепторов 1-го и 2-го типа фактора роста фибробластов (pFGFR, pVEGFR2), рецепторов 1-го и 2-го типа фактора роста эндотелия сосудов (pVEGFR1, pVEGFR2), а также сниженная экспрессия фосфорилированной формы α -рецептора тромбоцитарного фактора роста (pPDGFR α) по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (Рисунок 8А-Г). Важно отметить, что в клетках ГИСО T1-ИМ-R по сравнению с клетками ГИСО T1 наибольшего значения достигала экспрессия pFGFR2 и pVEGFR1 (Рисунок 8Г).

Кроме того, экспрессия pFGFR1-2 и pVEGFR1-2 была существенно выше в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R, в которых отсутствуют вторичные мутации *KIT*, по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентными к ИМ за счет вторичных мутаций *KIT* (Рисунок 8Д).

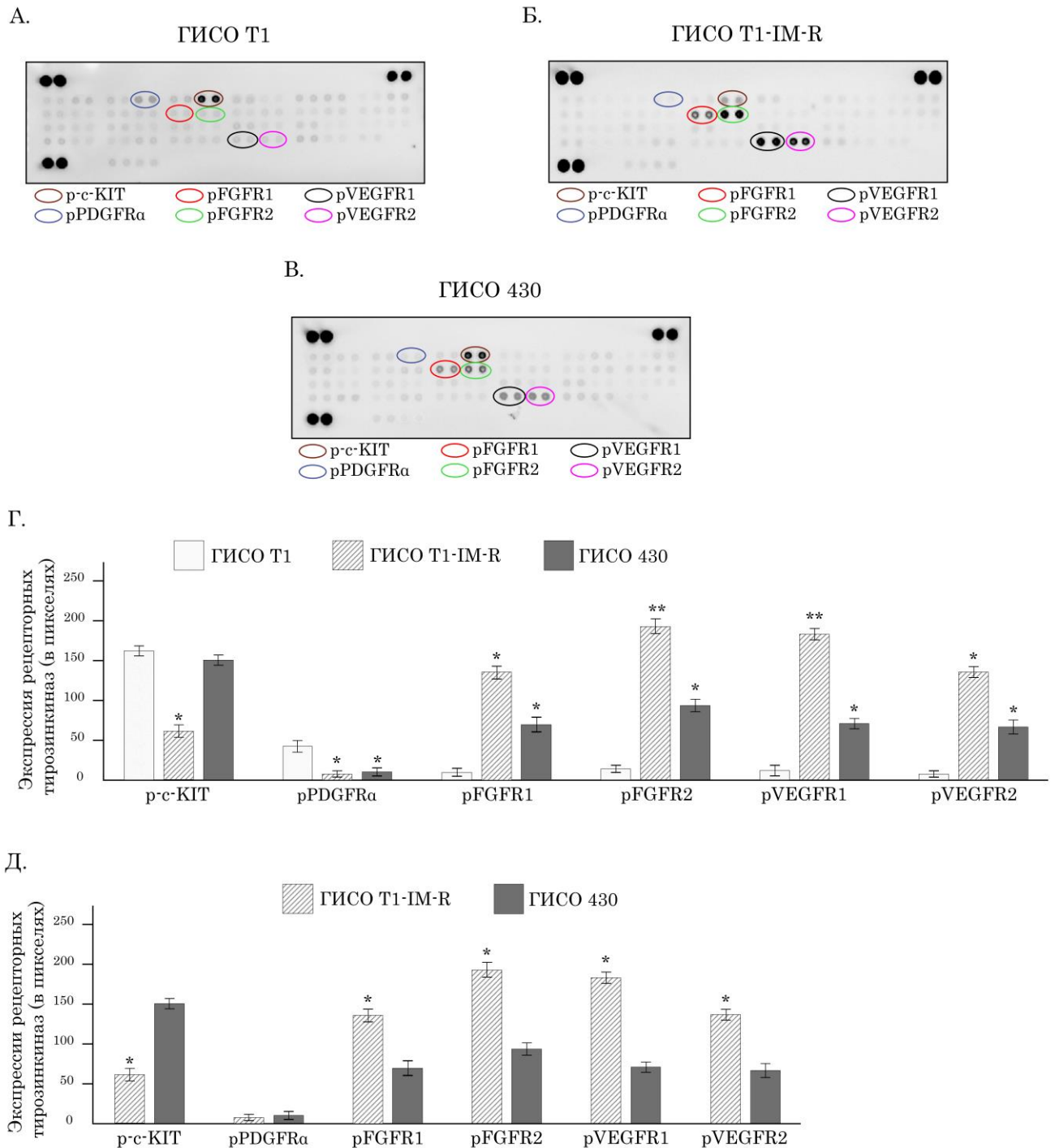


Рисунок 8 – Скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм РТК – c-KIT, PDGFR α , FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии ИМ. Оценка экспрессии РТК в клеточных линиях ГИСО Т1 (А), ГИСО Т1-IM-R (Б) и ГИСО 430 (В) проводилась методом иммуноблоттинга; На графиках (Г, Д) представлен количественный анализ экспрессии РТК в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Так же следует отметить, что в клетках ГИСО Т1 и ГИСО 430 отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированной формы рецептора с-КІТ. Напротив, в клетках ГИСО Т1-ІМ-Р, по сравнению с клетками ГИСО Т1 и ГИСО 430, экспрессия р-с-КІТ была существенно снижена (Рисунок 8А-Д).

Таким образом, в ІМ-резистентных клеточных линиях ГИСО Т1-ІМ-Р и ГИСО 430, в отличие от ІМ-чувствительной линии ГИСО Т1, отмечаются признаки активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей. Важно отметить, что в ІМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ІМ-Р с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, отмечается снижение активности с-КІТ-сигнального пути, по сравнению с ІМ-резистентными клетками ГИСО 430, имеющими вторичную мутацию *KIT*.

Полученные результаты скринингового анализа экспрессии рецепторных тирозинкиназ в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-ІМ-Р и ГИСО 430 коррелируют с результатами иммуноблоттинга по исследованию признаков активации FGFR-, с-КІТ- и VEGFR-сигнальных путей в указанных клеточных линиях (Рисунок 9-11). В ІМ-резистентных клеточных линиях ГИСО Т1-ІМ-Р и ГИСО 430 отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1 и FGFR2 по сравнению с ІМ-чувствительными клетками ГИСО Т1 (Рисунок 9А-В). Кроме того, в ІМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ІМ-Р и ГИСО 430 по сравнению с ІМ-чувствительными клетками ГИСО Т1 отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированной формы белка FRS-2 (pFRS-2) – мембранного адаптерного протеина [55, 91, 95], передающего сигнал от рецепторов фактора роста фибробластов к нижележащим цитоплазматическим белкам (Рисунок 9 Б). Следует отметить, что в ІМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ІМ-Р с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, отмечалась более высокая экспрессия белков pFRS-2 и pFGFR1/2, по сравнению с ІМ-резистентными клетками ГИСО 430, имеющими вторичную мутацию *KIT* (Рисунок 9Г). На Рисунке 9Б продемонстрировано, что в клетках ГИСО Т1-ІМ-Р по сравнению с клетками ГИСО 430 и ГИСО Т1 отмечалась повышенная экспрессия фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF-2) – лиганда рецепторов FGFR1-4 [55, 91, 95].

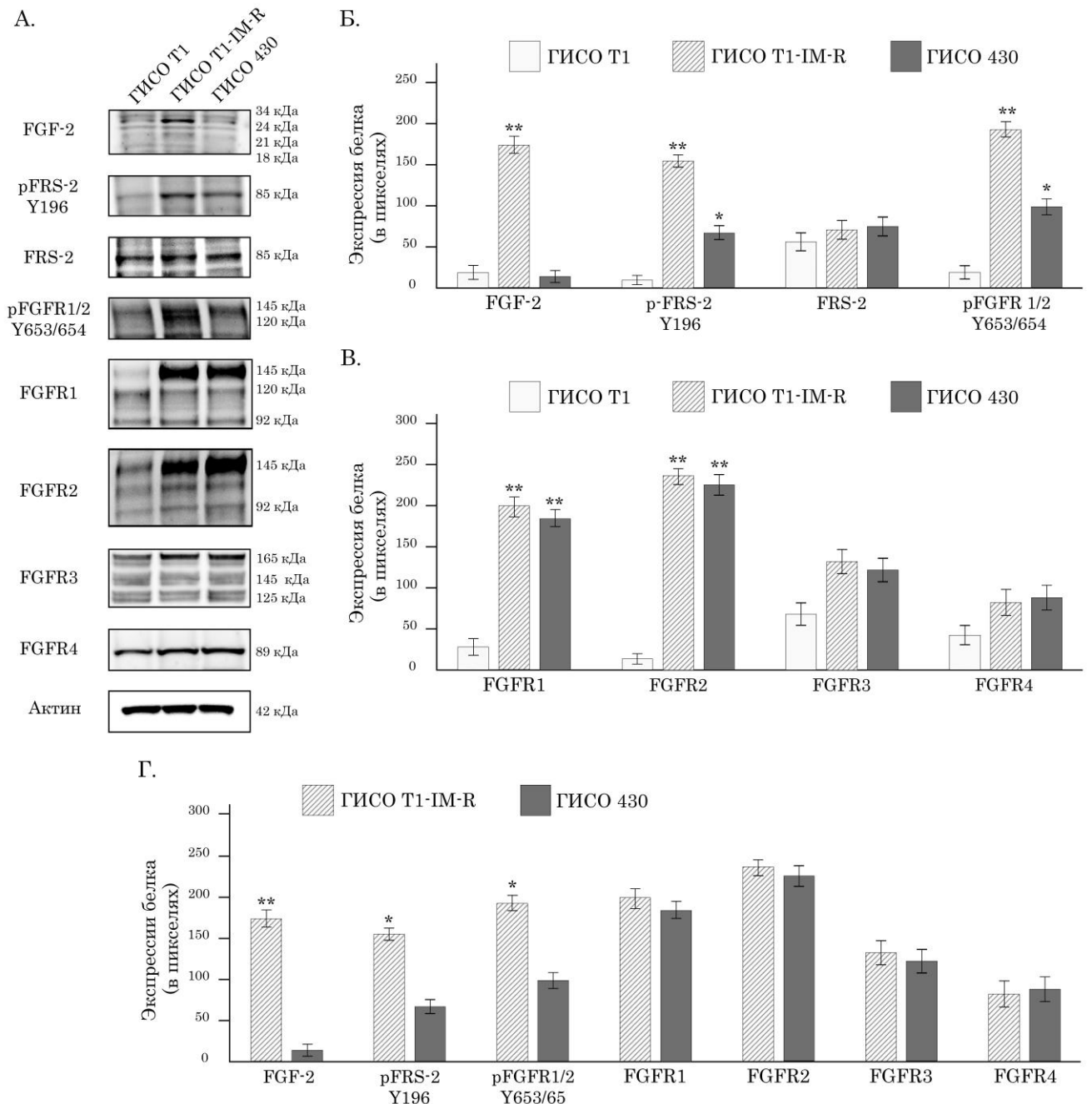


Рисунок 9 – Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии таргетных препаратов. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков FGFR-сигнального пути (FGF-2, FRS-2, FGFR1-4) методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, Г) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия) * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Кроме того, было обнаружено, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R, по сравнению с клетками ГИСО 430 и ГИСО Т1, отмечалось существенное снижение фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (Рисунок 10А-Б). Данный факт свидетельствует о снижении активности с-KIT сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R. Напротив, в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430, как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1, отмечалась высокая активность с-KIT-сигнального пути, что подтверждается гиперэкспрессией фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (Рисунок 10А-Б).

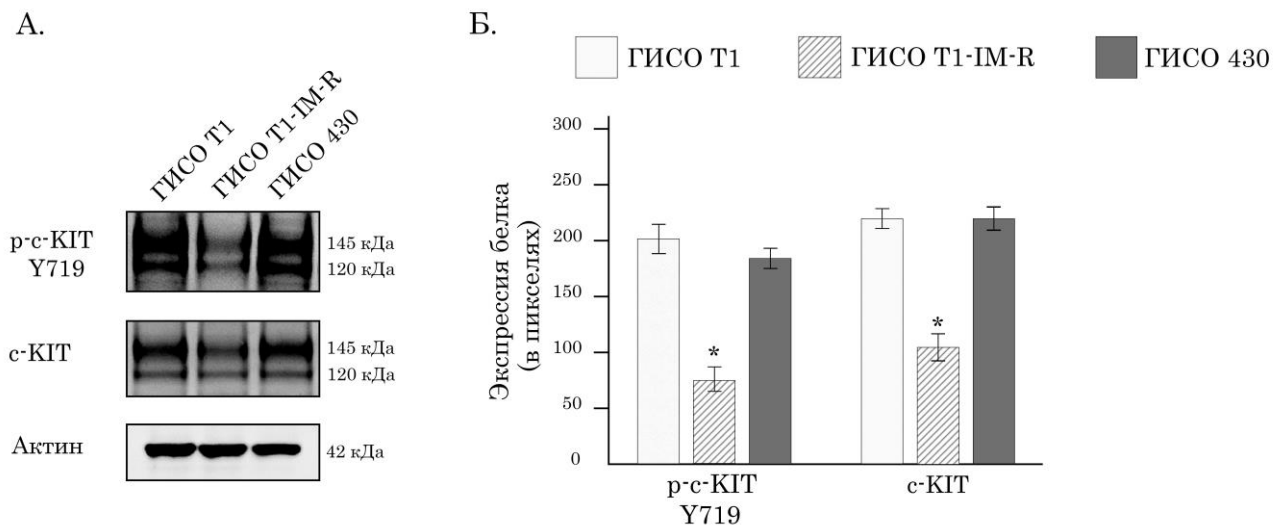


Рисунок 10 – Активация с-KIT-сигнального пути в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии таргетных препаратов. А: Оценка экспрессии фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах. Б – Количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

В ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 по сравнению с ИМ-чувствительными клетками

ГИСО Т1 (Рисунок 11А-В). Следует отметить, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, отмечалась более высокая экспрессия белков pVEGFR1 и pVEGFR2, по сравнению с ИМ-резистентными клетками ГИСО 430, имеющими вторичную мутацию *KIT* (Рисунок 11Г). На Рисунке 11Б продемонстрировано, что в клетках ГИСО Т1-ИМ-Р по сравнению с клетками ГИСО 430 и ГИСО Т1 отмечалась повышенная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) – лиганда рецепторов VEGFR1-2 [235, 240].

Таким образом, в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, вероятно, отмечается аутокринный механизм активации FGFR-сигнального пути: высокая экспрессия лиганда FGF-2, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2 и фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2. Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р отмечается аутокринный механизм активации VEGFR-сигнального пути: высокая экспрессия лиганда VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2. При этом в клетках ГИСО Т1-ИМ-Р продемонстрировано снижение активности с-KIT-сигнального пути: низкая экспрессия фосфорилированной и общей формы с-KIT.

Напротив, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, отмечается высокая активность с-KIT-сигнального пути (как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1): повышенная экспрессия фосфорилированной и общей формы с-KIT. В тоже время, в клетках ГИСО 430 отмечаются признаки активации FGFR-сигнального пути: повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2, фосфорилированной формы белка FRS-2. Тем не менее, в клетках ГИСО 430 экспрессия pFGFR1/2 и pFRS-2 значимо ниже, чем в клетках ГИСО Т1-ИМ-Р. Кроме того, активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 не связана с увеличением аутокринной продукции лиганда FGF-2, т.к. его экспрессия (как и в клетках ГИСО Т1) понижена.

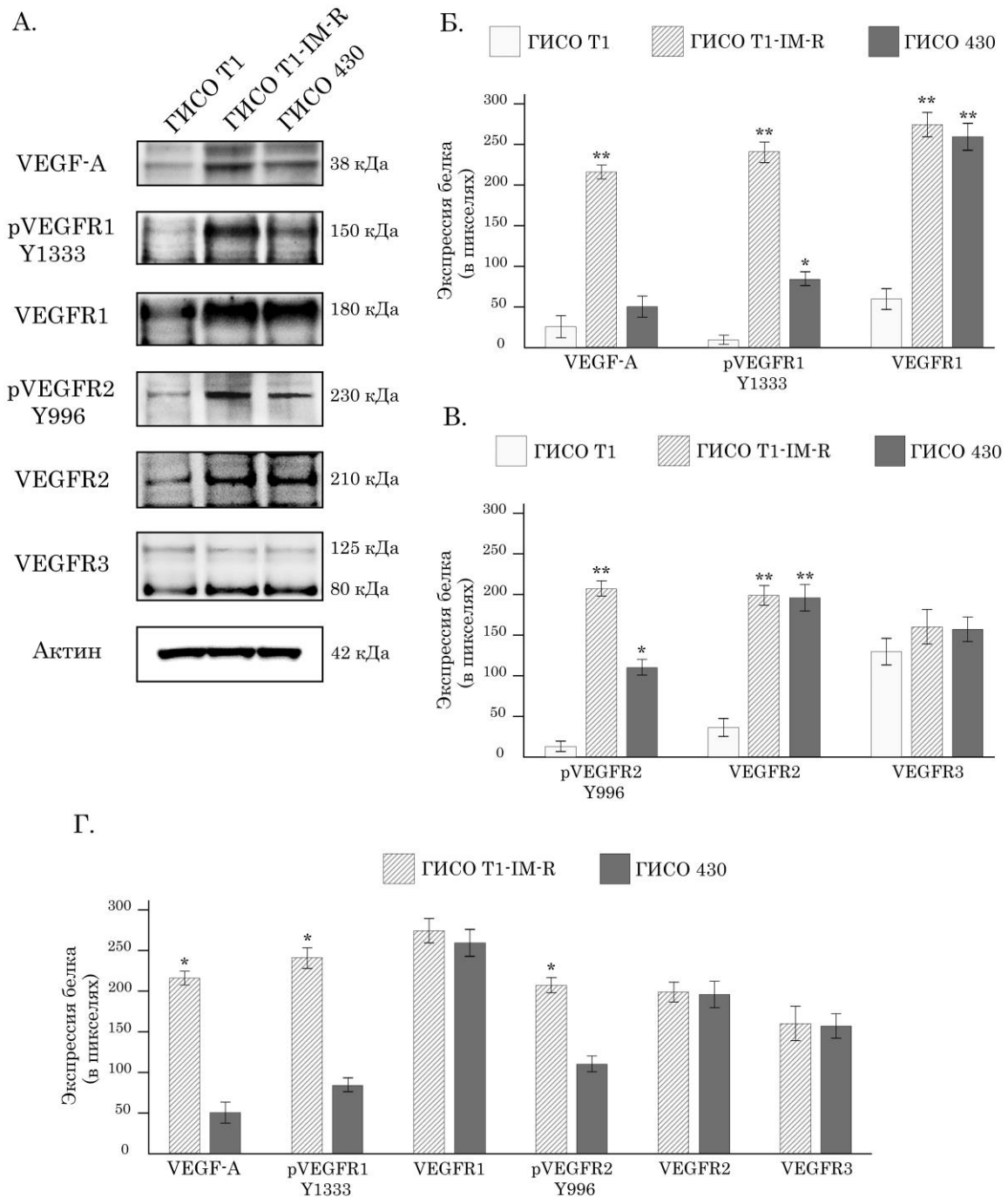


Рисунок 11 – Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии таргетных препаратов. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков VEGFR-сигнального пути (VEGF-A, VEGFR1-3) методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В, Г) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Следует отметить, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 отмечаются признаки активации VEGFR-сигнального пути: повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм рецепторов VEGFR1-2. Тем не менее, в клетках ГИСО 430 экспрессия pVEGFR1 и pVEGFR2 значимо ниже, чем в клетках ГИСО T1-IM-R. Кроме того, активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО 430 не связана с увеличением аутокринной продукции лиганда VEGF-A, т.к. его экспрессия (как и в клетках ГИСО T1) понижена.

3.1.3 Экспрессия нерцепторных тирозинкиназ в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО

Резистентность клеток ГИСО к ИМ может быть вызвана активацией нерцепторных (внутриклеточных) тирозинкиназ (НТК), которые обеспечивают передачу пролиферативного сигнала в ядро клетки и, тем самым, активируют вступление клетки в цикл деления [37, 100, 137, 193]. В связи с этим был проведен скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм НТК (43 наименования) в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 с использованием набора Proteome Profiler Human Phospho-kinase Array Kit (R&D Systems, ARY003B, США).

В клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430, имеющих признаки резистентности к ИМ, отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированных форм НТК – STAT1, MAPK и AKT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (Рисунок 12А-Г). Важно отметить, что экспрессия фосфорилированных форм НТК – STAT1 MAPK и AKT и была существенно выше в клетках ГИСО T1-IM-R, обладающих вторичной резистентностью к ИМ, по сравнению с клетками ГИСО 430, имеющими первичную резистентность к ИМ (Рисунок 12Д).

Полученные результаты скринингового анализа экспрессии НТК в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 коррелируют с результатами иммуноблоттинга по исследованию экспрессии фосфорилированных и общих форм НТК – STAT1 MAPK и AKT в указанных клеточных линиях (Рисунок 13).

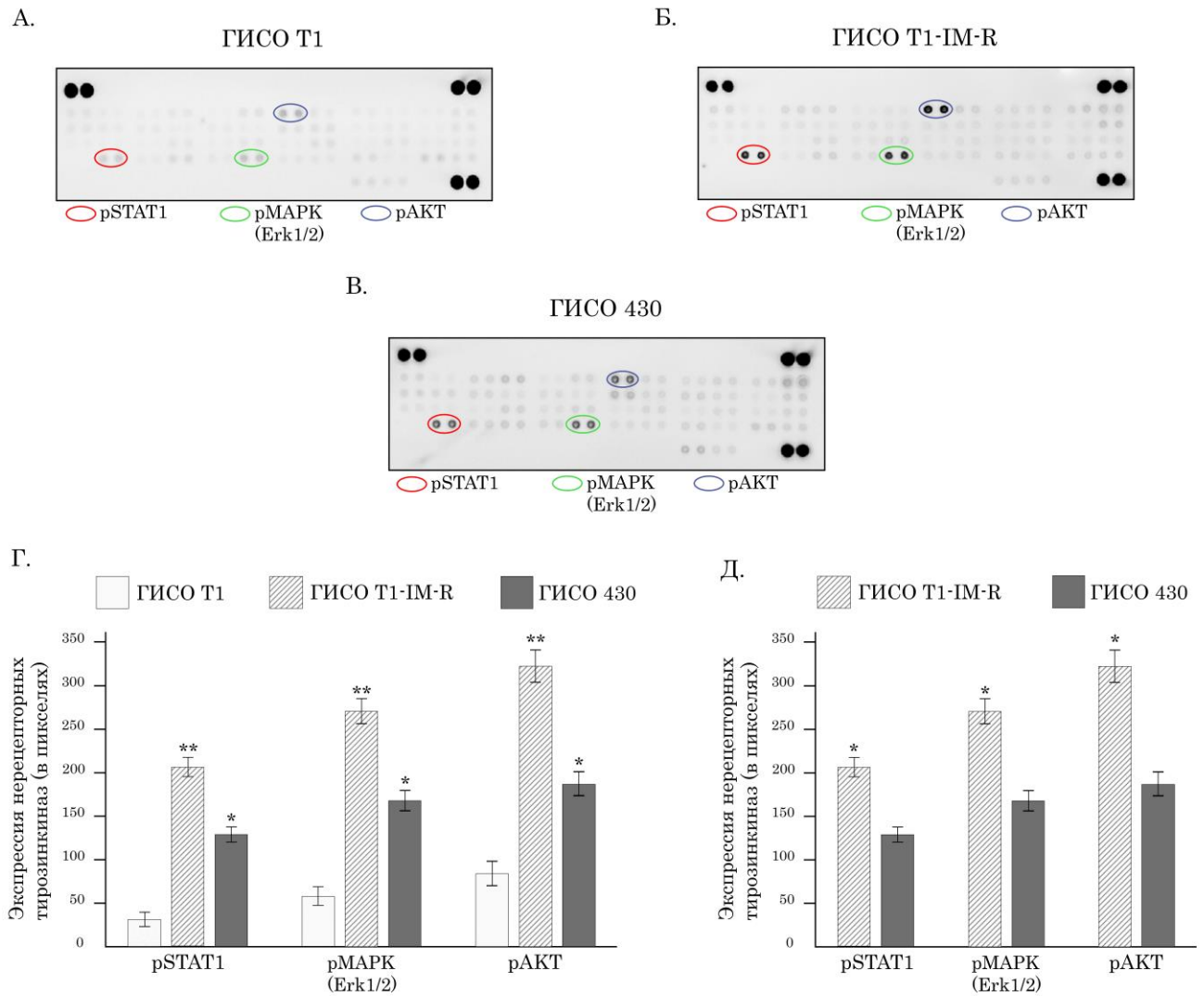


Рисунок 12 – Скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм НТК – STAT1, MAPK и AKT в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии таргетных препаратов. Оценка экспрессии НТК в клеточных линиях ГИСО Т1 (А), ГИСО Т1-ИМ-Р (Б) и ГИСО 430 (В) проводилась методом иммуноблоттинга; На графиках (Г, Д) представлен количественный анализ экспрессии НТК в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

В клетках ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430, имеющих признаки резистентности к ИМ, отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм НТК – STAT1, MAPK и AKT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1 (Рисунок 13А-Б). Важно отметить, что экспрессия фосфорилированных

форм НТК – STAT1, MAPK и АКТ и 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 вторичных мутаций *KIT* (Рисунок 13В).

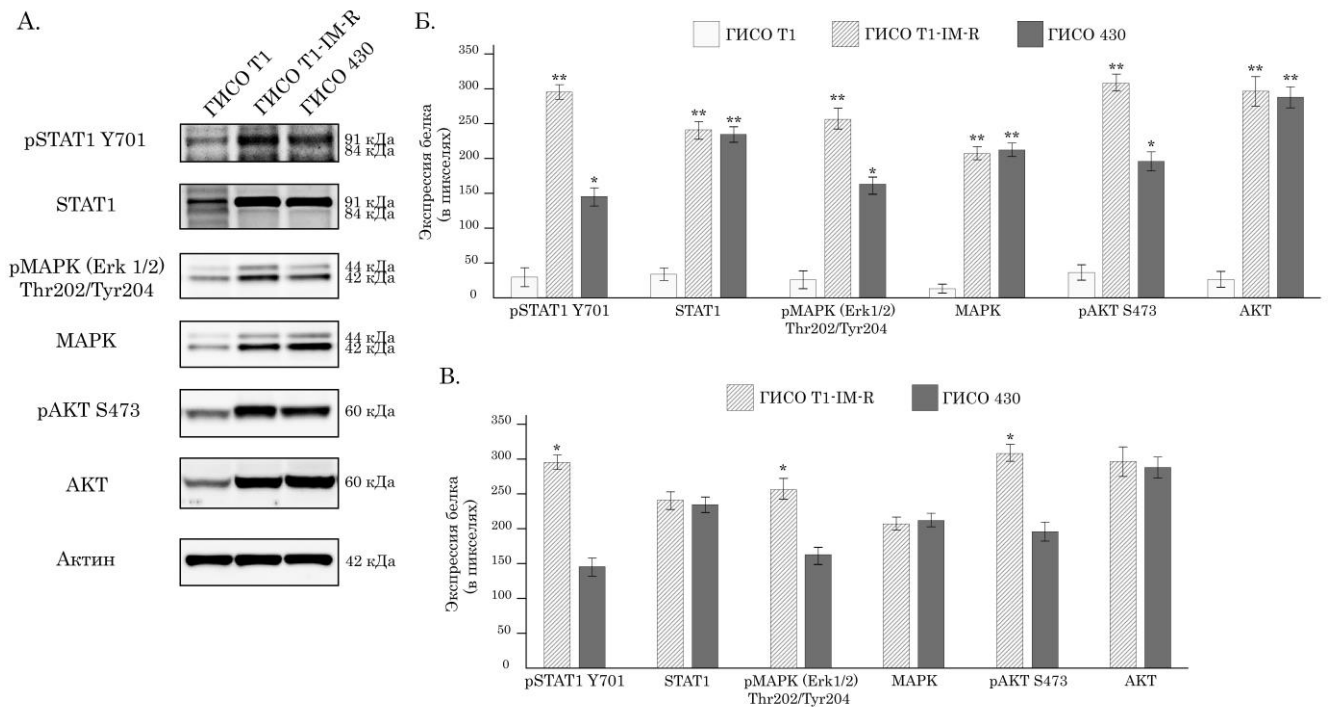


Рисунок 13 – Экспрессия НТК – STAT1, MAPK и АКТ в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии таргетных препаратов. А: Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм НТК – STAT1, MAPK и АКТ методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии НТК в пикселях (денситометрия); * - p < 0,05; ** - p < 0,001.

Продemonстрировано, что транскрипционный фактор STAT1 участвует в развитии внутриклеточного JAK-STAT-сигнального пути, имеющего важное значение для активации, пролиферации и выживаемости опухолевых клеток [140, 245]. MAPK-киназа (Erk1/2) участвует в развитии RAS-RAF-MAPK-сигнального пути, являющегося ключевым для деления опухолевых клеток, усиления их миграции и развития ангиогенеза [155, 203]. АКТ-киназа представляет собой

ключевой компонент PI3K-AKT-mTOR -сигнального пути, который имеет важное значение для пролиферации и выживаемости опухолевых клеток [39, 205]. Таким образом, нерецепторные тирозинкиназы STAT1, MAPK и AKT являются важными компонентами внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающих процессы активации и пролиферации опухолевых клеток, их миграции и ангиогенеза, а также подавления программируемой гибели (апоптоза). Следует отметить, что перечисленные внутриклеточные сигнальные пути (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) могут быть активизированы различными факторами роста. В частности, фактор роста фибробластов 2-го типа (FGF-2), связываясь со своими рецепторами FGFR1 и FGFR2 запускает активацию указанных путей (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) [55, 91, 95]. Продemonстрировано, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A) связываясь со своими рецепторами VEGFR1 и VEGFR2 активизирует RAS-RAF-MAPK- и PI3K-AKT-mTOR-сигнальные пути [162, 212].

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1, отмечаются: 1) повышенная экспрессия FGF-2, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2, фосфорилированной формы белка FRS-2 (см. Рисунок 8, 9); 2) повышенная экспрессия VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (см. Рисунок 11); 3) сниженная экспрессия фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы c-KIT (см. Рисунок 10). Вероятно, вследствие аутокринной продукции факторов роста (FGF-2, VEGF-A) в клетках ГИСО T1-IM-R отмечается гиперактивация JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR-сигнальных путей.

В клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичных мутаций *KIT*, экспрессия pFGFR1/2 и pFRS-2 и лиганда FGF-2 значимо ниже, чем в клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* (см. Рисунок 8, 9). Кроме того, в клетках ГИСО 430, по сравнению с клетками ГИСО T1-IM-R, значимо ниже экспрессия pVEGFR1-2 и лиганда VEGF-A (см. Рисунок 11). Важно

отметить, что в клетках ГИСО 430, как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1, отмечается гиперэкспрессия фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (см. Рисунок 10). Вероятно, вследствие отсутствия аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A в клетках ГИСО 430 активация сигнальных путей (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) была значимо ниже, чем в клетках ГИСО Т1-ИМ-R.

Таким образом, как показано в Таблице 3, ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 отличаются от ИМ-чувствительной линии ГИСО Т1 наличием признаков активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что проявляется повышенной экспрессией рецепторных тирозинкиназ (FGFR1-2, VEGFR1-2) и нерецепторных тирозинкиназ (STAT1, MAPK и AKT). Важно отметить, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей сопровождается гиперэкспрессией лигандов FGF-2 и VEGF-A, а также снижением активности с-KIT-сигнального пути. Следовательно, в клетках ГИСО Т1-ИМ-R отмечается аутокринный механизм активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что требует дальнейшего экспериментального изучения.

Таблица 3 – Экспрессия фосфорилированных форм РТК и НТК, а также факторов роста (FGF-2, VEGF-A) в клеточных линиях ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R, ГИСО 430

Экспрессия исследуемого белка	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО 430
p-c-KIT	++++	+	++++
pFGFR1/2	+	++++	+++
FGF-2	+	++++	+
pVEGFR1	+	++++	+++
pVEGFR2	+	++++	+++
VEGF-A	+	++++	+
pSTAT1	+	++++	+++
pMAPK	+	++++	+++
pAKT	+	++++	+++

Примечание – «+» - слабая экспрессия; «+++», «++++» - гиперэкспрессия

3.2 Механизмы активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО и его роль в формировании вторичной резистентности опухолевых клеток к таргетному препарату ИМ

3.2.1 Исследование активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО в условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT

Как показано выше (см. Рисунок 10), ИМ-чувствительные клетки ГИСО T1 обладают гиперэкспрессией фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT, что обусловлено первичной мутацией (делеция V570 - Y578) в 11 экзоне *KIT* [61]. За счет активности с-KIT-сигнального пути обеспечивается пролиферация и жизнеспособность клеток ГИСО T1. Таргетный препарат ИМ в концентрации 1 мкмоль/л вызывает апоптоз клеток ГИСО T1 (см. Рисунок 7Г), что обусловлено способностью ИМ блокировать тирозинкиназный рецептор с-KIT и, следовательно, ингибировать в опухолевых клетках активность сигнальных путей (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), необходимых для их пролиферации [178, 231].

Поскольку ИМ-резистентные клетки ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* имеют повышенную экспрессию лиганда FGF-2, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2 (см. Рисунок 8, 9) и сниженную экспрессию фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (см. Рисунок 10), представляло интерес выяснить способность ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1 продуцировать лиганд FGF-2 и экспрессировать рецепторы FGFR1-2 в условиях ингибирования тирозинкиназного рецептора с-KIT. Для этого клетки ГИСО T1 культивировали в течение 48 часов в присутствии субтоксичной концентрации ИМ (0,02 мкмоль/л). Кроме того, в клетках ГИСО T1 выполнялся нокдаун *KIT* с помощью трансфекции соответствующей короткой интерферирующей РНК (киРНК *KIT*) в концентрации 2,5 нмоль/л (инкубация 48 часов).

Под влиянием ИМ и киРНК *KIT* в клетках ГИСО T1 отмечалось полное отсутствие экспрессии фосфорилированной формы рецепторной тирозинкиназы

с-KIT (Рисунок 14А-Б). После трансфекции киРНК *KIT* в клетках ГИСО Т1 полностью отсутствовала экспрессия фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора с-KIT, что свидетельствует о нокдауне *KIT* (Рисунок 14А-Б). Таким образом, под влиянием ИМ и киРНК *KIT* в клетках ГИСО Т1 отмечалось подавление активности рецепторной тирозинкиназы с-KIT.

В условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в опухолевых клетках ГИСО Т1 отмечалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждается увеличением экспрессии FGF-2 лиганда, фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2, фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2 (Рисунок 14А-Г). Кроме того, при ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в опухолевых клетках ГИСО Т1 повышалась экспрессия *FGF-2* (в 5 раз), *FGFR1* (в 3 раза), *FGFR2* (в 4 раза), что также свидетельствует об активации FGFR-сигнального пути (Рисунок 14Д).

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что под влиянием ИМ в концентрации 0,02 мкмоль/л в клетках ГИСО Т1 отмечалось время-зависимое снижение экспрессии фосфорилированной формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (Рисунок 15А-Б). В присутствии ИМ экспрессия р-с-KIT в клетках ГИСО Т1 постепенно уменьшалась, достигая максимального снижения через 48 часов от начала культивирования с таргетным препаратом.

В тоже время, ИМ в концентрации 0,02 мкмоль/л индуцировал в клетках ГИСО Т1 время-зависимое повышение экспрессии маркеров FGFR-сигнального пути: лиганда FGF-2, фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2, фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2 (Рисунок 15А, В, Г). В присутствии ИМ экспрессия маркеров FGFR-сигнального пути постепенно увеличивалась, достигая максимального значения через 48 часов от начала культивирования с таргетным препаратом.

Таким образом, в клетках ГИСО Т1 при снижении экспрессии с-KIT-сигнального пути отмечалось увеличение экспрессии FGFR-сигнального пути.

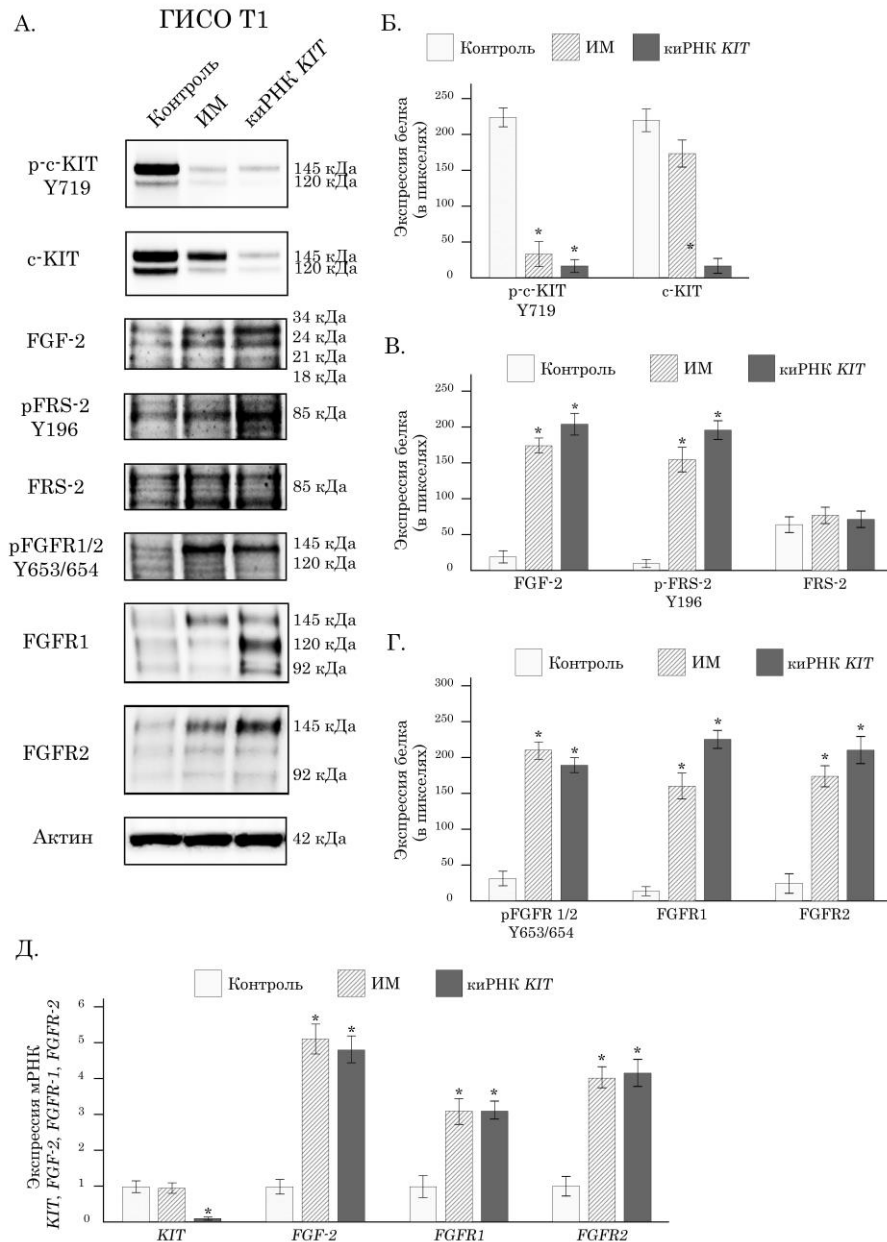


Рисунок 14 – Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях ингибирования тирозинкиназного рецептора с-KIT. Клетки ГИСО Т1 культивировались в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль); в присутствии ИМ (0,02 мкмоль/л); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм с-KIT, FGF-2, FRS-2, FGFR1-2 методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В, Г) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,001$. Д – Оценка экспрессии *KIT*, *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR-2* в клетках ГИСО методом ПЦР. Амплификация *GAPDH* использовалась в качестве контроля; * - $p < 0,001$.

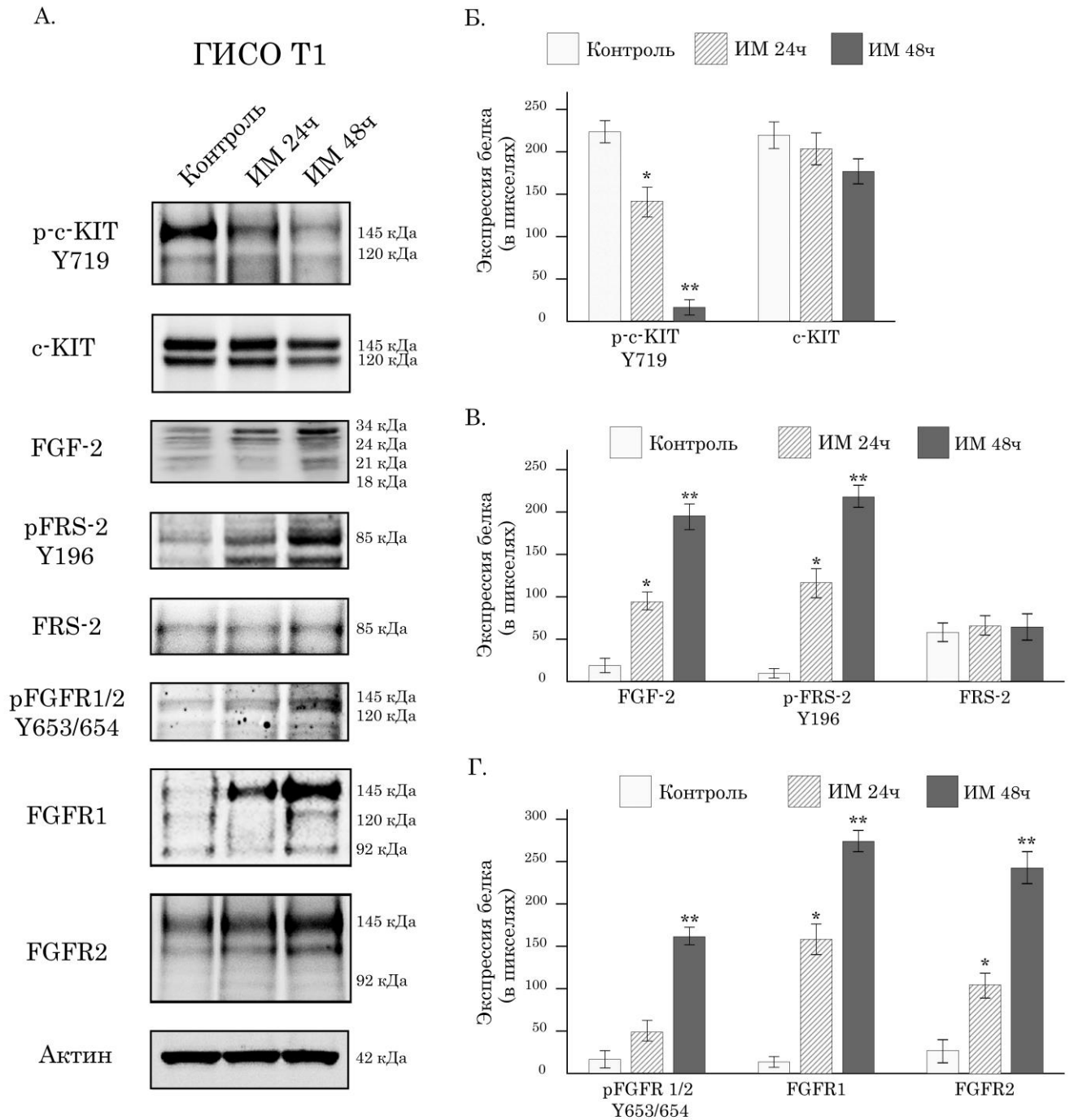


Рисунок 15 – Влияние ИМ на экспрессию маркеров с-KIT- и FGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировались в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии ИМ (0,02 мкмоль/л). А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков с-KIT, FGF-2, FRS-2, FGFR1-2 методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б-Г) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

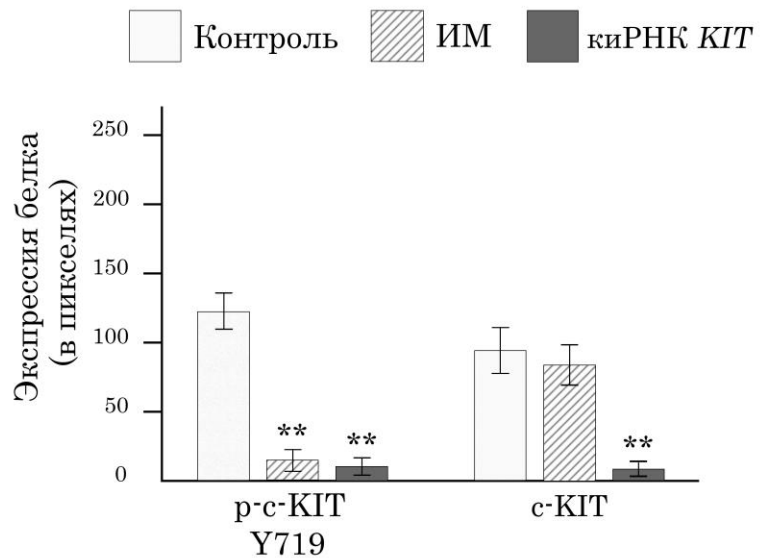
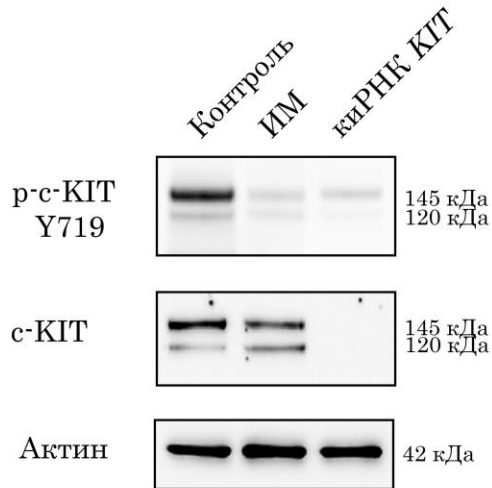
Обнаруженное изменение киназного профиля клеток ГИСО Т1 в виде снижения активности с-KIT-сигнального пути и активации FGFR-сигнального пути, вероятно, является молекулярным механизмом развития их вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ.

Для подтверждения указанной гипотезы далее проводилось ингибирование рецепторной тирозинкиназы с-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 с целью последующего исследования концентрации лиганда FGF-2 в супернатантах клеточных культур ГИСО. Для этого клетки ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 культивировали в течение 48 часов в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л. Кроме того, в клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 выполнялся нокдаун *KIT* с помощью трансфекции киРНК *KIT* в концентрации 2,5 нмоль/л (инкубация 48 часов).

Под влиянием ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалось полное ингибирование экспрессии фосфорилированной формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (Рисунок 16А). В тоже время, ИМ индуцировал лишь значимое снижение экспрессии фосфорилированной формы с-KIT в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 16Б).

После трансфекции киРНК *KIT* в клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 полностью отсутствовала экспрессия фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT, что свидетельствует о нокдауне *KIT* (Рисунок 16А-Б). Таким образом, под влиянием ИМ и киРНК *KIT* в клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 отмечалось ингибирование активности рецепторной тирозинкиназы с-KIT.

А. ГИСО T1-IM-R



Б. ГИСО 430

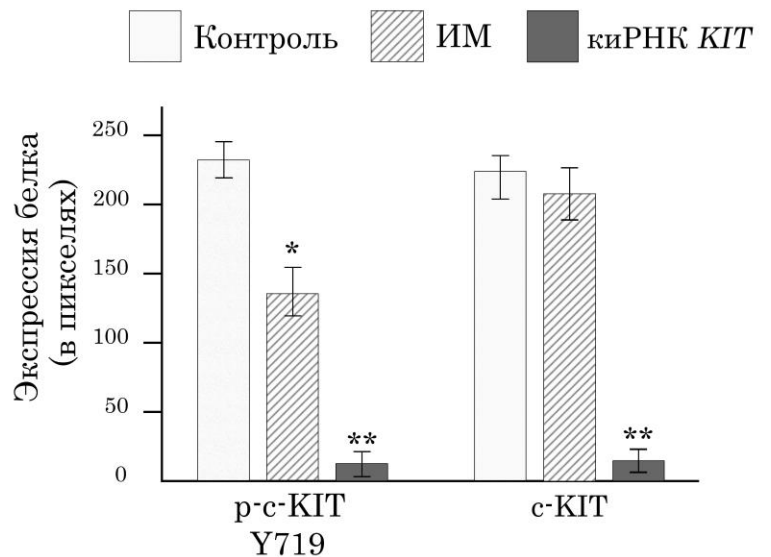
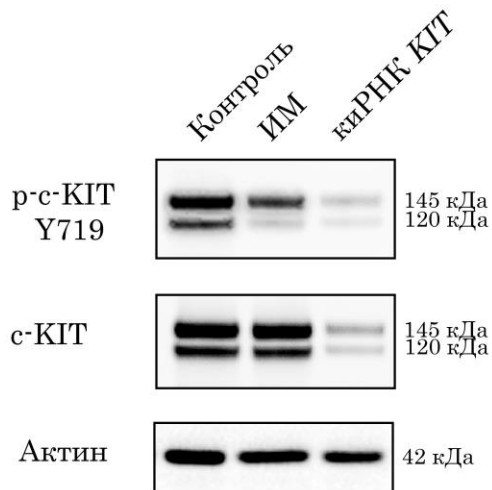


Рисунок 16 – Ингибирование экспрессии рецепторной тирозинкиназы c-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (А) и ГИСО 430 (Б). Клетки ГИСО культивировались в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль); в присутствии ИМ (1 мкмоль/л); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. Экспрессия фосфорилированной и общей формы белка c-KIT в клетках ГИСО оценивалась методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

В супернатантах контрольных образцов ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 и клеток ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, отмечалась низкая концентрация лиганда FGF-2 (Рисунок 17А). Напротив, в супернатантах контрольных образцов клеток ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, было обнаружено значимое повышение концентрации FGF-2 (в 8 раз) по сравнению с клетками ГИСО Т1 и клетками ГИСО 430 (Рисунок 17А). Полученные результаты согласуются с выше описанными данными о наличии повышенной экспрессии FGF-2 в клетках ГИСО Т1-ИМ-R по сравнению с клетками ГИСО Т1 и ГИСО 430 (Рисунок 9А-Б, Таблица 3).

Под влиянием ИМ в концентрации 0,02 мкмоль/л в супернатантах клеток ГИСО Т1 отмечалось значимое увеличение концентрации лиганда FGF-2 (в 9,5 раз) через 48 часов культивирования в присутствии препарата (Рисунок 17Б). Полученные результаты согласуются с выше описанными данными об активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (см. Рисунок 14, 15). При дальнейшем культивировании в присутствии ИМ уровень FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1 снижался, достигая через 72 часа значений неотличимых от контроля. Снижение FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1 можно объяснить гибелью опухолевых клеток под действием ИМ.

Под влиянием ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в супернатантах клеток ГИСО Т1-ИМ-R постепенно повышалась концентрация FGF-2, достигая максимального значения (увеличение в 32 раза) через 96 часов культивирования в присутствии препарата (Рисунок 17В). Следовательно, под влиянием ИМ в клетках ГИСО Т1-ИМ-R отмечалось время-зависимое увеличение продукции лиганда FGF-2.

Под влиянием ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в супернатантах клеток ГИСО 430 постепенно повышалась концентрация FGF-2, достигая максимального значения (увеличение в 12 раз) через 96 часов культивирования в присутствии препарата (Рисунок 17Г).

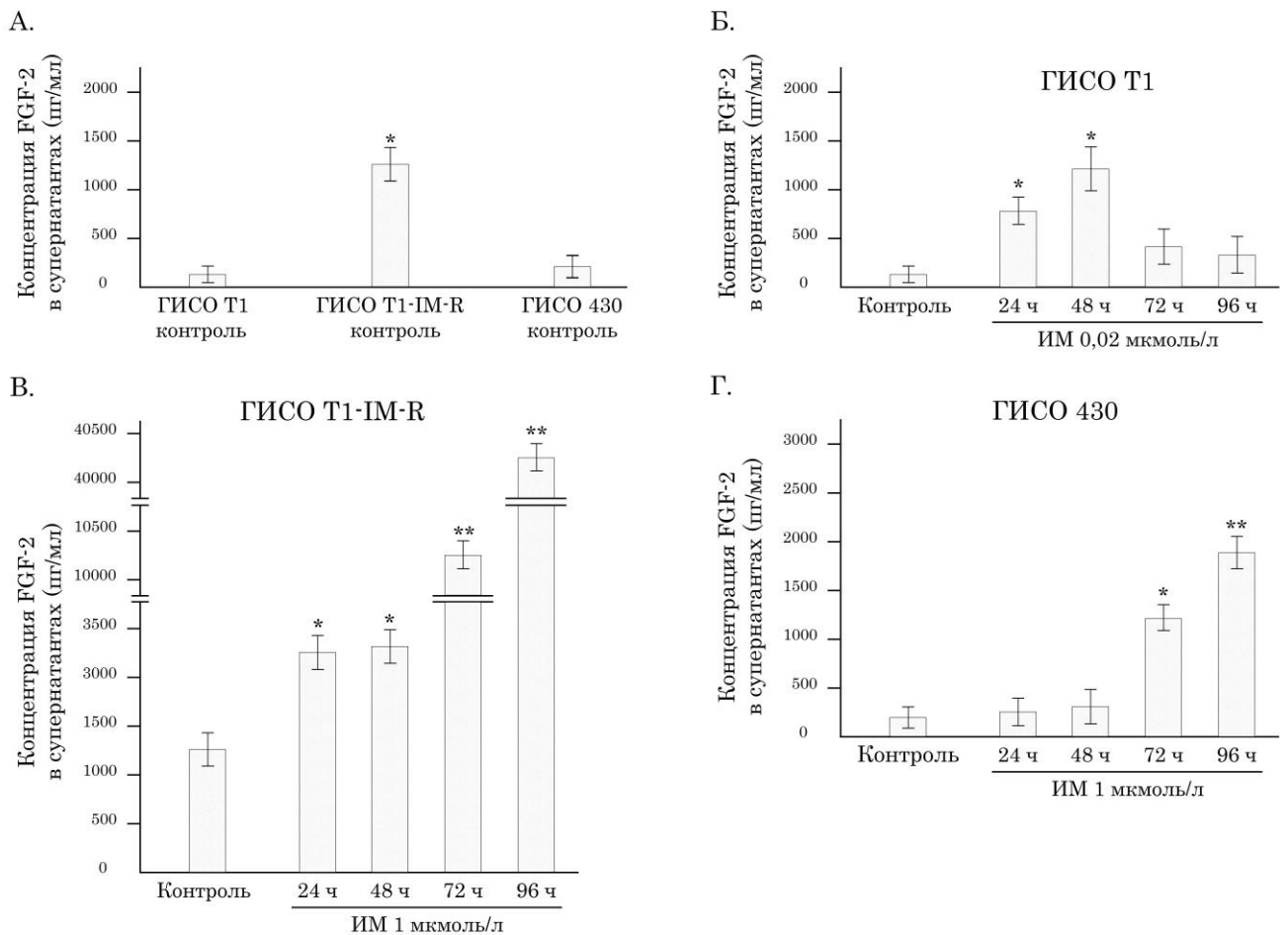


Рисунок 17 – Концентрация FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-IM-R и ГИСО 430 в присутствии ИМ. Клетки ГИСО культивировали в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии ИМ в течение 96 часов. Концентрация FGF-2 (пг/мл) в супернатантах контрольных образцов клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-IM-R и ГИСО 430 (А) и в присутствии ИМ (Б, В, Г) оценивалась методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Следовательно, под влиянием ИМ в клетках ГИСО 430, как и в клетках ГИСО Т1-IM-R, отмечалось время-зависимое увеличение продукции лиганда FGF-2. Тем не менее, через 96 часов культивирования в присутствии ИМ концентрация FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО 430 была значимо ниже, чем в супернатантах клеток ГИСО Т1-IM-R (Таблица 4, Рисунок 17В, Г).

Таблица 4 – Концентрация FGF-2 (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО, культивированных в присутствии ИМ

Образец	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО 430
Контроль	130 ± 26,2	1250 ± 94,7	153 ± 22,5
ИМ – 24 часа	986 ± 42,9	3248 ± 181,8	157 ± 42,7
ИМ – 48 часов	1237 ± 34,4	3254 ± 244,6	162 ± 61,1
ИМ – 72 часа	144 ± 39,7	10247 ± 453,3	1311 ± 89,7
ИМ – 96 часов	121 ± 36,1	40261 ± 547,1	1837 ± 92,4

Примечание – Концентрация ИМ: 0,02 мкмоль/л (для клеток ГИСО Т1) и 1 мкмоль/л (для клеток ГИСО Т1-ИМ-R, ГИСО 430). Результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. откл.

Через 48 часов после трансфекции киРНК *KIT* в супернатантах клеток ГИСО Т1 отмечалось значимое увеличение концентрации лиганда FGF-2 (в 7 раз) (Рисунок 18А). Полученные результаты согласуются с выше описанными данными об активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (см. Рисунок 14, 15). Тем не менее, через 72 часа после трансфекции киРНК *KIT* уровень FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1 снизился до значений, соответствующих контрольному образцу (Рисунок 18А). Снижение FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1 можно объяснить гибелью опухолевых клеток вследствие нокдауна *KIT*.

После трансфекции киРНК *KIT* в супернатантах клеток ГИСО Т1-ИМ-R постепенно повышалась концентрация FGF-2, достигая максимального значения (увеличение в 12 раз) через 96 часов (Рисунок 18Б). Следовательно, под влиянием нокдауна *KIT* в клетках ГИСО Т1-ИМ-R отмечалось время-зависимое увеличение продукции FGF-2.

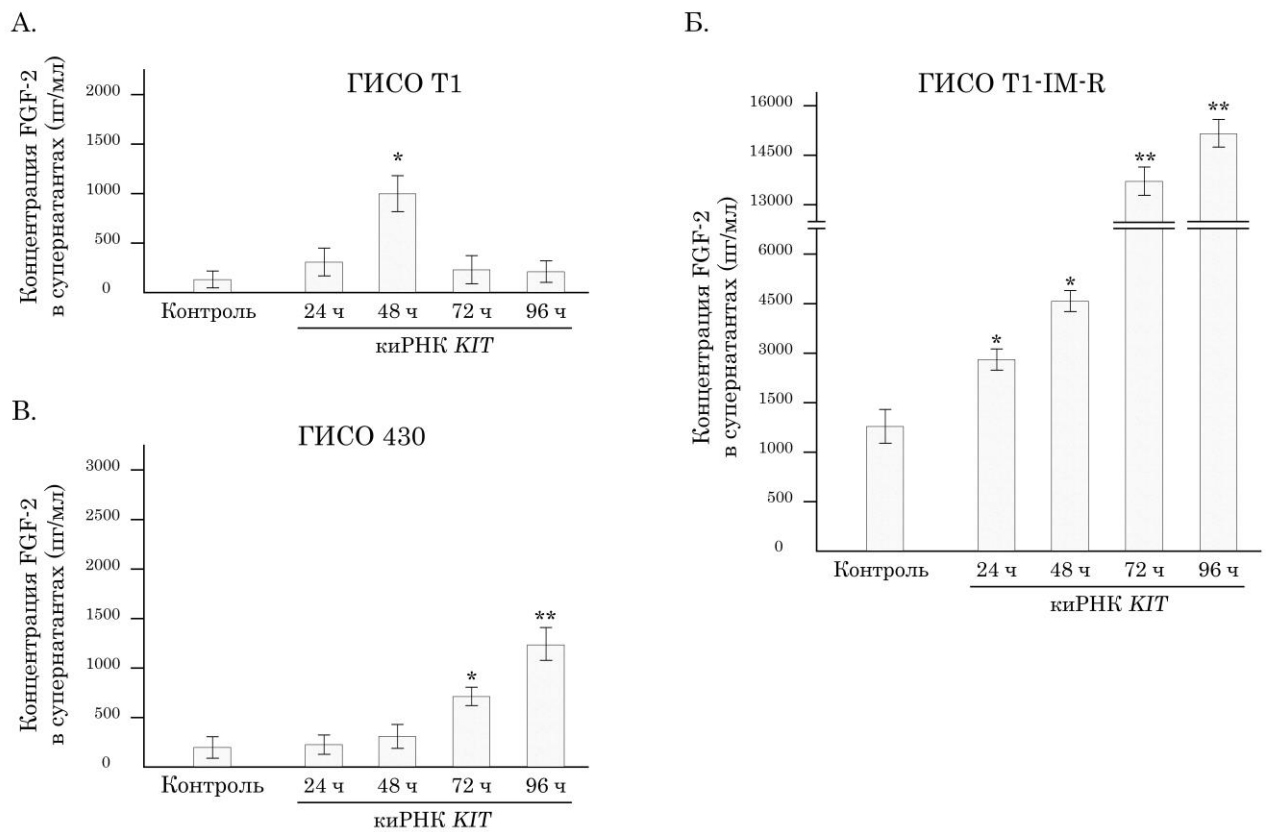


Рисунок 18 – Концентрация FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна *KIT*. Клетки ГИСО культивировались в течение 96 часов: в отсутствии препаратов (контроль); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. Концентрация FGF-2 (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО T1 (А), ГИСО T1-IM-R (Б) и ГИСО 430 (В) оценивалась методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

После трансфекции киРНК *KIT* в супернатантах клеток ГИСО 430 постепенно повышалась концентрация FGF-2, достигая максимального значения (увеличение в 8 раз) через 96 часов (Рисунок 18В). Следовательно, под влиянием нокдауна *KIT* в клетках ГИСО 430, как и в клетках ГИСО T1-IM-R, отмечалось время-зависимое увеличение продукции FGF-2.

Тем не менее, через 96 часов после трансфекции киРНК *KIT* концентрация FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, была значимо ниже, чем в супернатантах клеток ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* (Таблица 5, Рисунок 18Б, В).

Таблица 5 – Концентрация FGF-2 (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в условиях нокдауна *KIT* с помощью киРНК *KIT*

Образец	ГИСО T1	ГИСО T1-ИМ-R	ГИСО 430
Контроль	130 ± 26,2	1250 ± 94,7	153 ± 22,5
киРНК <i>KIT</i> - 24 часа	221 ± 23,4	2843 ± 204,7	168 ± 34,7
киРНК <i>KIT</i> - 48 часов	914 ± 33,8	4541 ± 289,2	272 ± 59,3
киРНК <i>KIT</i> - 72 часа	133 ± 38,2	13734 ± 392,4	721 ± 67,3
киРНК <i>KIT</i> - 96 часов	119 ± 37,3	15104 ± 378,5	1224 ± 78,7

Примечание: результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. откл.

При ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R значимо повышалась экспрессия *FGF-2* (в 8 раз), *FGFR1* (в 4 раза), *FGFR2* (в 6 раз) (Рисунок 19А). Аналогичным образом, при ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 значимо повышалась экспрессия *FGF-2* (в 3 раза), *FGFR1* (в 2,5 раза), *FGFR2* (в 3 раза) (Рисунок 19Б).

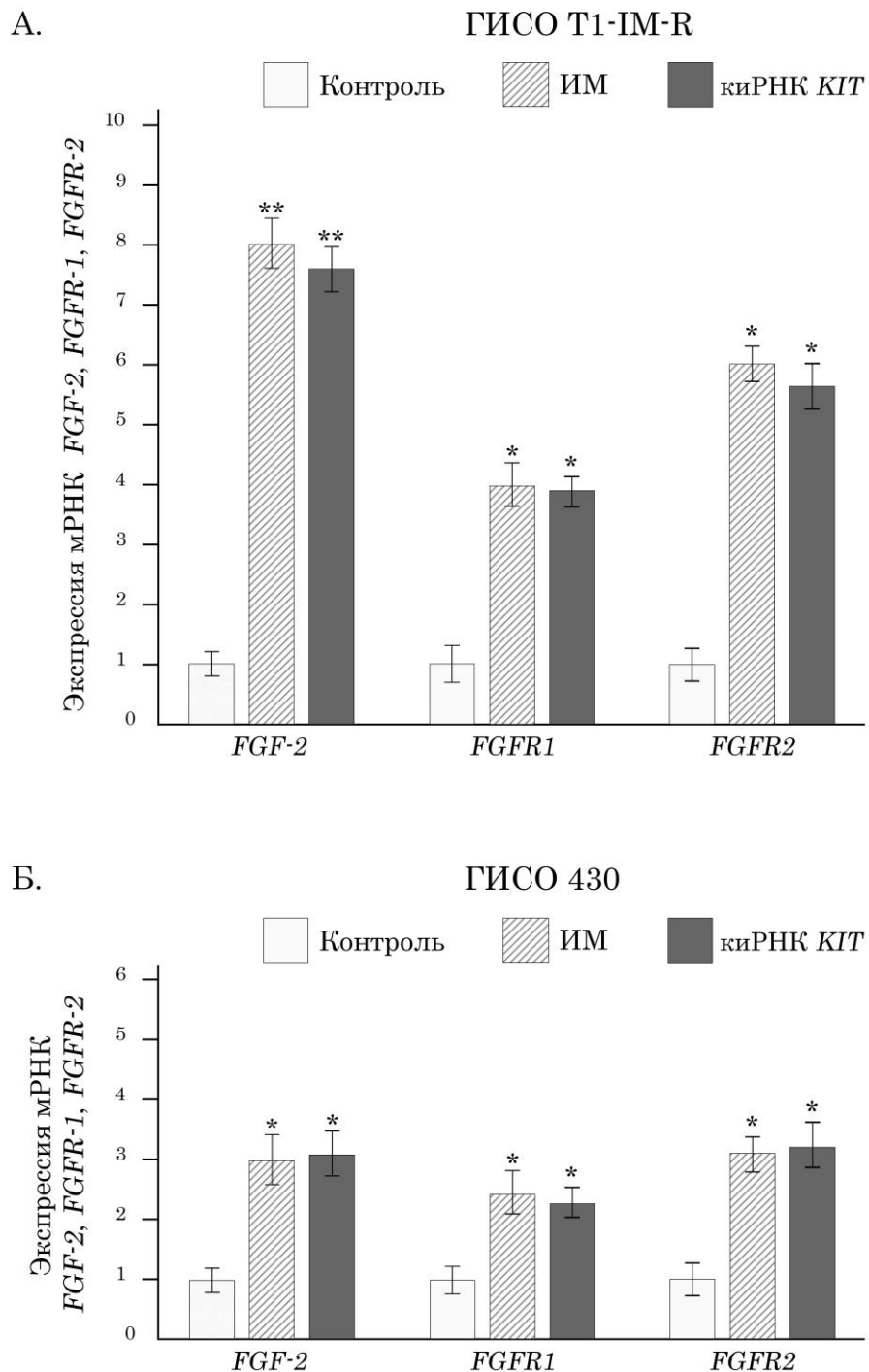


Рисунок 19 – Экспрессия *FGF-2*, *FGFR-1*, *FGFR-2* в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р (А) и ГИСО 430 (Б) условиях ингибирования тирозинкиназного рецептора с-KIT. Клетки ГИСО культивировались в течение 96 часов: в отсутствии препаратов (контроль); в присутствии ИМ (1 мкмоль/л); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. Экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR-2* в клетках ГИСО оценивалась методом ПЦР. Амплификация *GAPDH* использовалась в качестве контроля. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в опухолевых клетках ГИСО Т1 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 (см. Рисунок 14). ИМ в субтоксической концентрации 0,02 мкмоль/л индуцировал в клетках ГИСО Т1 время-зависимое повышение экспрессии указанных маркеров FGFR-сигнального пути (см. Рисунок 15). Кроме того, при ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в опухолевых клетках ГИСО Т1 повышалась экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2* (см. Рисунок 14Д). В условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ или киРНК *KIT*) в супернатантах клеток ГИСО Т1 отмечалось значимое увеличение концентрации лиганда FGF-2 (см Рисунок 17Б, 18А).

Ранее было показано, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430, по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1, отмечается повышенная экспрессия маркеров FGFR-сигнального пути: фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2, фосфорилированной формы белка FRS-2 (см. Рисунок 8, 9). При ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430 отмечалось время-зависимое увеличение концентрации FGF-2 (см. Рисунок 17В-Г, 18Б-В). При ингибировании рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием ИМ и киРНК *KIT*) в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430 повышалась экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2* (см. Рисунок 19).

В тоже время, ИМ-резистентные клетки ГИСО Т1-ИМ-Р, по сравнению с клетками ГИСО Т1 и ГИСО 430 имеют сниженную активность с-KIT-сигнального пути, что проявляется уменьшением экспрессии фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (см. Рисунок 10).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, о том, что активация FGFR-сигнального пути является характерным признаком клеток ГИСО, имеющих резистентность (первичную или вторичную) к таргетному препарату ИМ. Тем не менее, механизмы активации FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО при развитии первичной и вторичной резистентности к ИМ имеют отличия.

В клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, отмечалась низкая экспрессия FGF-2 (см. Рисунок 9) и, соответственно, его низкая концентрация в супернатантах контрольных образцов (см. Рисунок 17А). Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 отмечалась высокая экспрессия фосфорилированной и общей формы с-KIT, как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1, что свидетельствует о высокой активности с-KIT-сигнального пути (см. Рисунок 10). Следовательно, аутокринная продукция FGF-2 не является ключевым механизмом, обеспечивающим активацию FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*.

Напротив, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* активация FGFR-сигнального пути обусловлена аутокринной продукцией FGF-2 в ответ на снижение активности с-KIT-сигнального пути. В клетках ГИСО T1-IM-R отмечалась высокая экспрессия FGF-2 лиганда (см. Рисунок 9) и его высокая концентрация в супернатантах контрольных образцов (см. Рисунок 17А), что указывает на активацию аутокринной продукции FGF-2 в опухолевых клетках. Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось снижение экспрессии фосфорилированной и общей формы с-KIT, что свидетельствует о уменьшении активности с-KIT-сигнального пути (см. Рисунок 10).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что при развитии вторичной резистентности клеток ГИСО T1 к таргетному препарату ИМ, не связанной с появлением вторичных мутаций *KIT*, в опухолевых клетках возникает изменение профиля активности тирозинкиназ: снижается

активность с-KIT-сигнального пути и повышается активность FGFR-сигнального пути вследствие усиления аутокринной продукции FGF-2. Усиление аутокринной продукции FGF-2 лиганда клетками ГИСО возникает в ответ на ингибирующий эффект таргетного препарата ИМ в отношении с-KIT-сигнального пути.

Для подтверждения важной роли FGFR-сигналинга в механизмах вторичной резистентности клеток ГИСО к ИМ необходимо исследовать способность FGF-2 лиганда активировать указанный сигнальный путь в ИМ-чувствительных опухолевых клетках.

3.2.2 Изучение способности фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF-2) индуцировать активацию FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО

ИМ-чувствительные клетки ГИСО T1 культивировались в присутствии FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в течение 96 часов (Рисунок 20А-Б). FGF-2 лиганд не оказывал стимулирующего влияния на экспрессию фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы с-KIT (Рисунок 20А). В тоже время, FGF-2 в концентрации 100 нг/мл индуцировал в клетках ГИСО T1 время-зависимое повышение экспрессии маркеров FGFR-сигнального пути: фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2, фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2 (Рисунок 20А-Г). В присутствии FGF-2 экспрессия маркеров FGFR-сигнального пути постепенно увеличивалась, достигая максимального значения через 96 часов от начала культивирования (Рисунок 20А-Г).

В присутствии FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 отмечалось время-зависимое повышение экспрессии фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и АКТ (Рисунок 21А-Г). Под влиянием FGF-2 экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и АКТ постепенно увеличивалась, достигая максимального увеличения через 96 часов от начала культивирования (Рисунок 21А-Г).

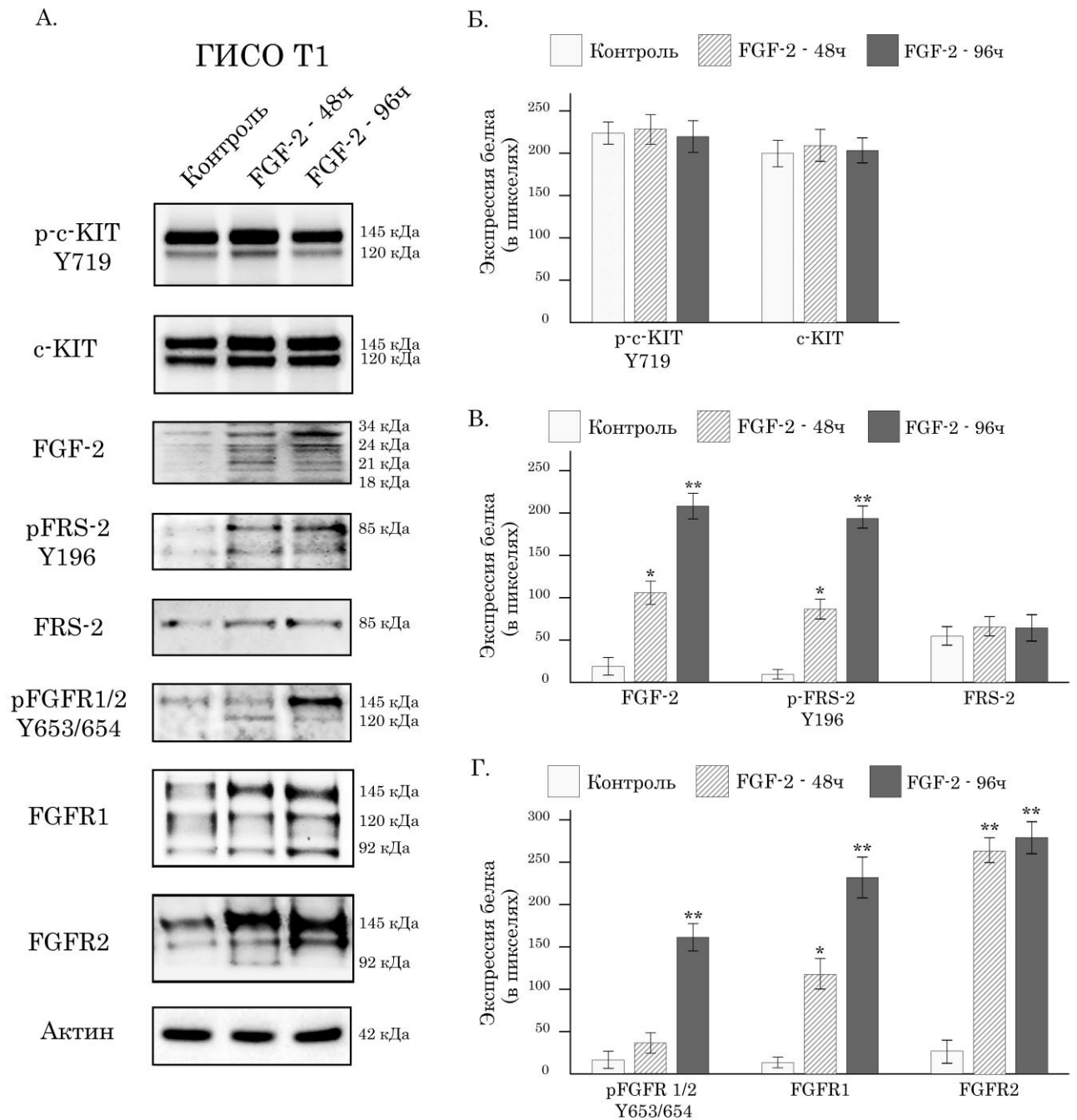


Рисунок 20 – Влияние FGF-2 на экспрессию маркеров с-KIT- и FGFR-сигнальных путей в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировались в течение 96 часов: в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии FGF-2 (100 нг/мл). А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков с-KIT, FGF-2, FRS-2, FGFR1-2 методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б-Г) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

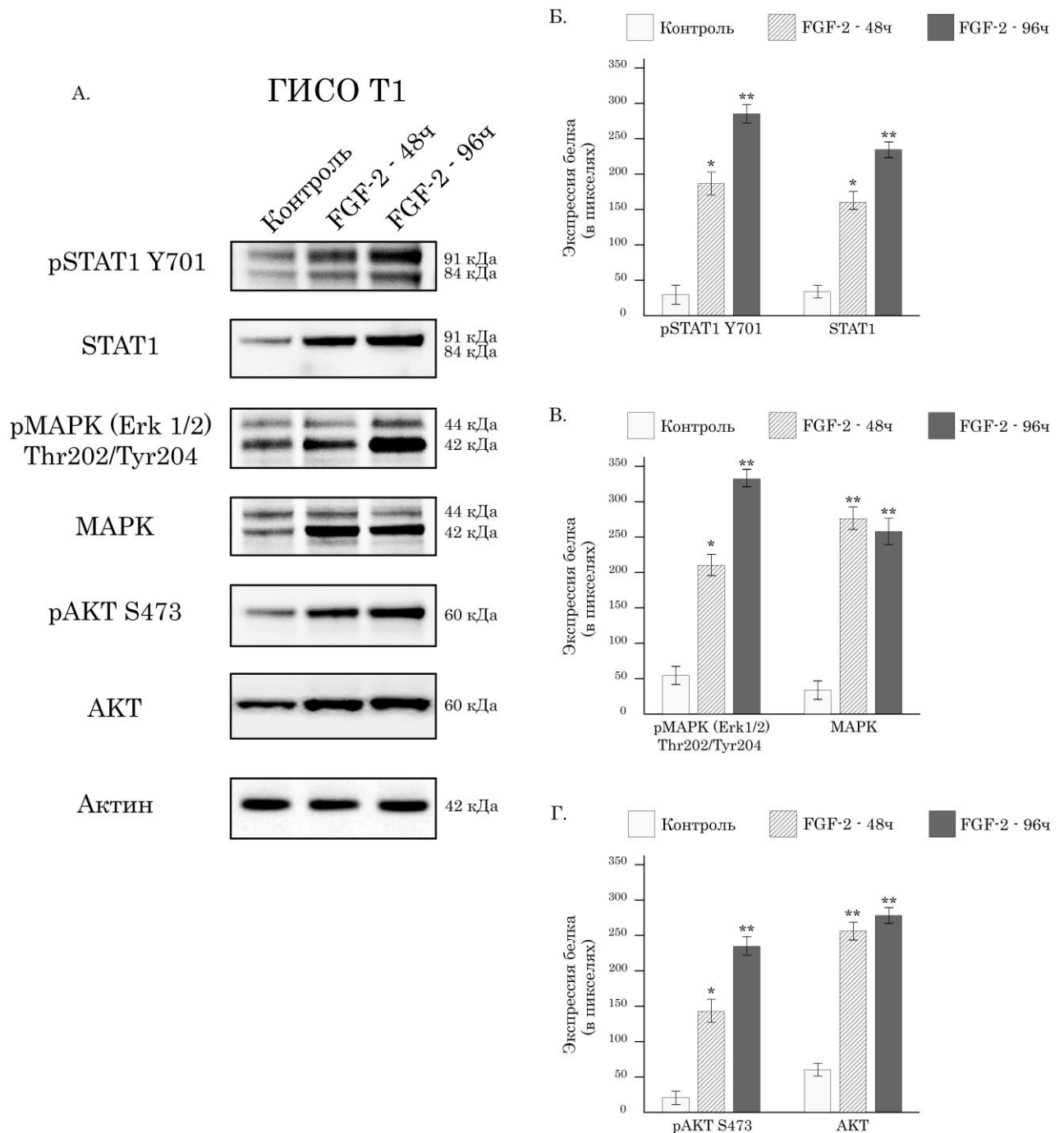


Рисунок 21 – Влияние FGF-2 на экспрессию НТК – STAT1, MAPK и АКТ в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1. Клетки ГИСО T1 культивировались в течение 96 часов: в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии FGF-2 (100 нг/мл). А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм НТК – STAT1, MAPK и АКТ методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б-Г) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Таким образом, FGF-2 индуцировал в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 активацию FGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2, фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2. В результате в опухолевых клетках активизировались сигнальные каскады (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-Akt-mTOR), обеспечивающие их пролиферацию и выживаемость.

Поскольку FGF-2 индуцировал в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 активацию FGFR-сигнального пути, то представляло интерес выяснить способность FGF-2 модулировать цитотоксическую активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1. Для этого клетки ГИСО Т1 культивировались в отсутствие препаратов (контроль) в присутствии FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,25 мкмоль/л) и их комбинации (Рисунок 22). На рисунке 22А видно, что ИМ в концентрации 0,25 мкмоль/л индуцировал апоптоз клеток ГИСО Т1, о чем свидетельствует высокая экспрессия маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспазы-3). Полученные результаты иммуноблоттинга подтверждаются окраской чашек Петри с клетками ГИСО Т1 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. В присутствии ИМ в концентрации 0,25 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО Т1 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла не более 20% от контроля, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток под действием таргетного препарата (Рисунок 22В). В присутствии ИМ в концентрации 0,25 мкмоль/л наблюдалось снижение пролиферативной активности клеток ГИСО Т1, что подтверждает чувствительность клеток к таргетному препарату (Рисунок 22Б).

Напротив, на рисунке 22А видно, что в присутствии комбинации FGF-2 (100 нг/мл) и ИМ (0,25 мкмоль/л) опухолевые клетки ГИСО Т1 сохраняли жизнеспособность, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспазы-3).

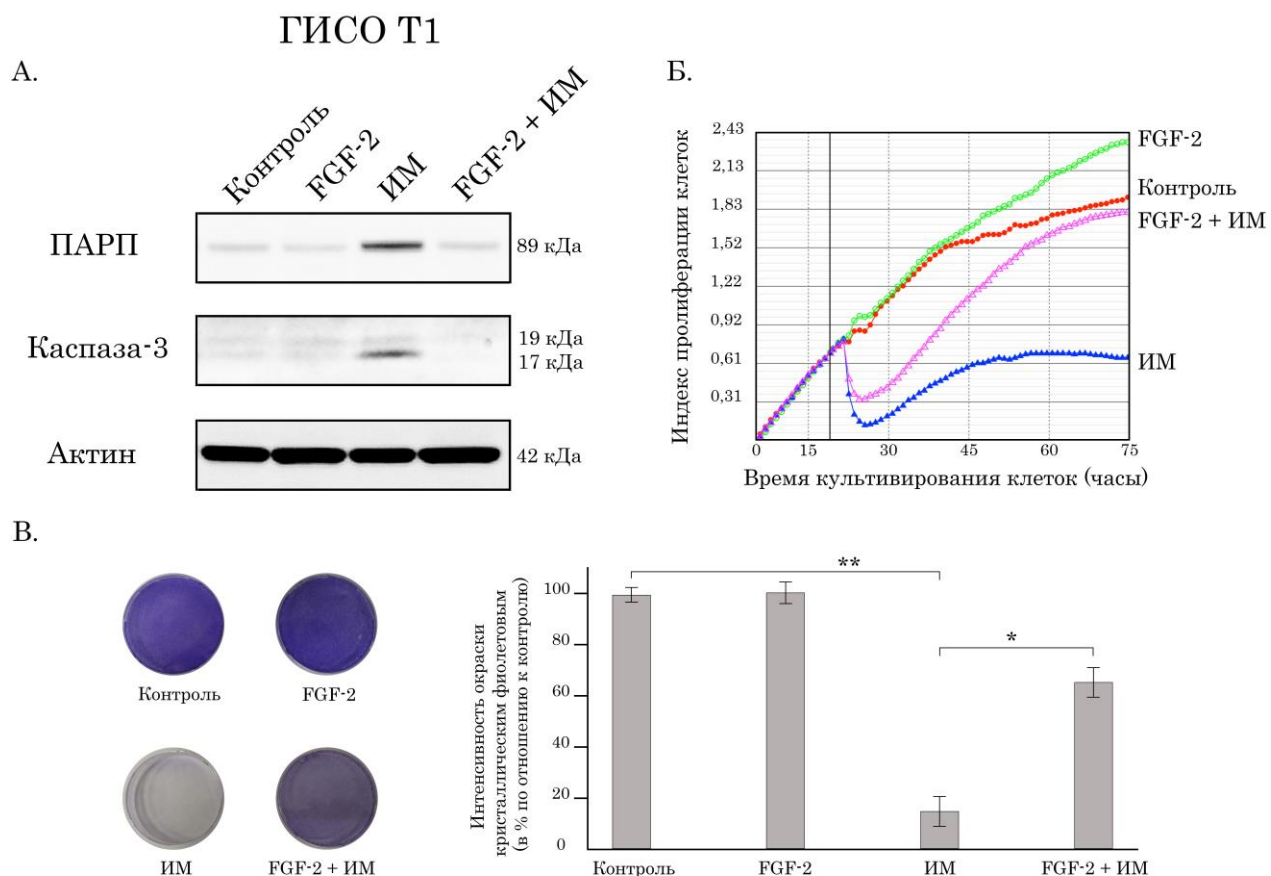


Рисунок 22 – Влияние FGF-2 на цитотоксическую и антипролиферативную активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировались в отсутствии препаратов (контроль) в присутствии FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,25 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование апоптоза клеток ГИСО Т1 (инкубация 72 часа) методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО Т1 с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); В – Окраска чашек Петри клетками ГИСО Т1 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – графики интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

В присутствии комбинации FGF-2 (100 нг/мл) и ИМ (0,25 мкмоль/л) в чашках Петри с клетками ГИСО Т1 интенсивность окраски кристаллическим

фиолетовым составляла 60 - 75% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности клеток ГИСО Т1 (Рисунок 22В). Следует отметить, что в присутствии комбинации FGF-2 (100 нг/мл) и ИМ (0,25 мкмоль/л) не нарушалась пролиферативная активность ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 (Рисунок 22 Б).

Далее клетки ГИСО Т1 культивировали в отсутствии и присутствии FGF-2 с целью последующего определения методом колориметрического МТТ-теста эффективной концентрации ИМ, вызывающей 50% ингибирование выживаемости (IC_{50}) опухолевых клеток (Таблица 6). В случае прикубации клеток ГИСО с FGF-2 (в концентрации 100 нг/мл) в течение 48 часов значение IC_{50} иматиниба увеличивалось в 1,6 раза. В случае предварительного культивирования клеток ГИСО Т1 в присутствии FGF-2 (в концентрации 100 нг/мл) в течение 14 дней значение IC_{50} иматиниба увеличивалось в 4,75 раза (Таблица 6).

Таблица 6 – Показатели IC_{50} иматиниба для клеток ГИСО Т1, культивированных в отсутствии или присутствии FGF-2

Показатель	ГИСО Т1 (без внесения FGF-2 в культуру)	ГИСО Т1 (прикубация с FGF-2 100нг/мл в течение 48 часов)	ГИСО Т1 (прекультивирование с FGF-2 100 нг/мл в течение 14 дней)
IC_{50} иматиниба, мкмоль/л	$0,04 \pm 0,0003$	$0,064 \pm 0,0002$	$0,19 \pm 0,0005$
Кратность увеличения IC_{50} иматиниба относительно ГИСО Т1 (культивированных без внесения FGF-2 в культуру)		1,6	4,75

Примечание – Клетки ГИСО Т1 культивировали в присутствии ИМ в течение 72 часов. Полученные результаты представлены в виде ср. арифм. $\pm$ станд. ош.

Таким образом, в присутствии FGF-2 цитотоксическая активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 снижалась. Добавление FGF-2 лиганда в культуру клеток ГИСО Т1 индуцировало активацию в опухолевых клетках FGFR-сигнального пути. В результате, в опухолевых клетках активизировались сигнальные каскады, которые обеспечивали их жизнеспособность и пролиферацию в присутствии таргетного препарата ИМ. Полученные результаты согласуются с литературными данными. Продemonстрировано, что FGF-2 лиганд, связываясь со своими рецепторами FGFR1 и FGFR2 запускает в клетках-мишенях (в том числе и в опухолевых) активацию сигнальных путей (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), которые обеспечивают выживаемость, пролиферацию и миграцию клеток [55, 91, 95]. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что в клетках ГИСО Т1 под влиянием ИМ снижается активность с-KIT-сигнального пути и повышается активность FGFR-сигнального пути вследствие усиления аутокринной продукции FGF-2.

Следовательно, активацию FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 можно рассматривать в качестве механизма, лежащего в основе развития их вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ в отсутствии вторичных мутаций *KIT*.

Поскольку активация FGFR-сигнального пути является характерным признаком клеток ГИСО, имеющих вторичную резистентность к таргетному препарату ИМ (см. Рисунок 8, 9, 17, 18, 19), то представляет интерес выяснить влияние ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в указанных клеточных линиях.

3.2.3 Влияния таргетного препарата ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО

Для изучения влияния ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 указанные клеточные линии культивировали в присутствии таргетного препарата, а также его комбинаций с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 моноклональных антител (анти-FGF-2 мАТ) и таргетного препарата BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4).

Под влиянием ИМ в клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствием вторичных мутаций *KIT* значительно повышалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2 (Рисунок 23). Кроме того, в присутствии ИМ в клетках ГИСО T1-IM-R не нарушалась экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, которые получая сигнал от FGFR-рецепторов обеспечивают выживаемость, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [55, 91, 95].

Напротив, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и BGJ398 – в клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось тотальное ингибирование активации FGFR-сигнального пути, что подтверждалось отсутствием экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2.

Кроме того, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и BGJ398 – в клетках ГИСО T1-IM-R полностью подавлялась экспрессия фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 23А-В).

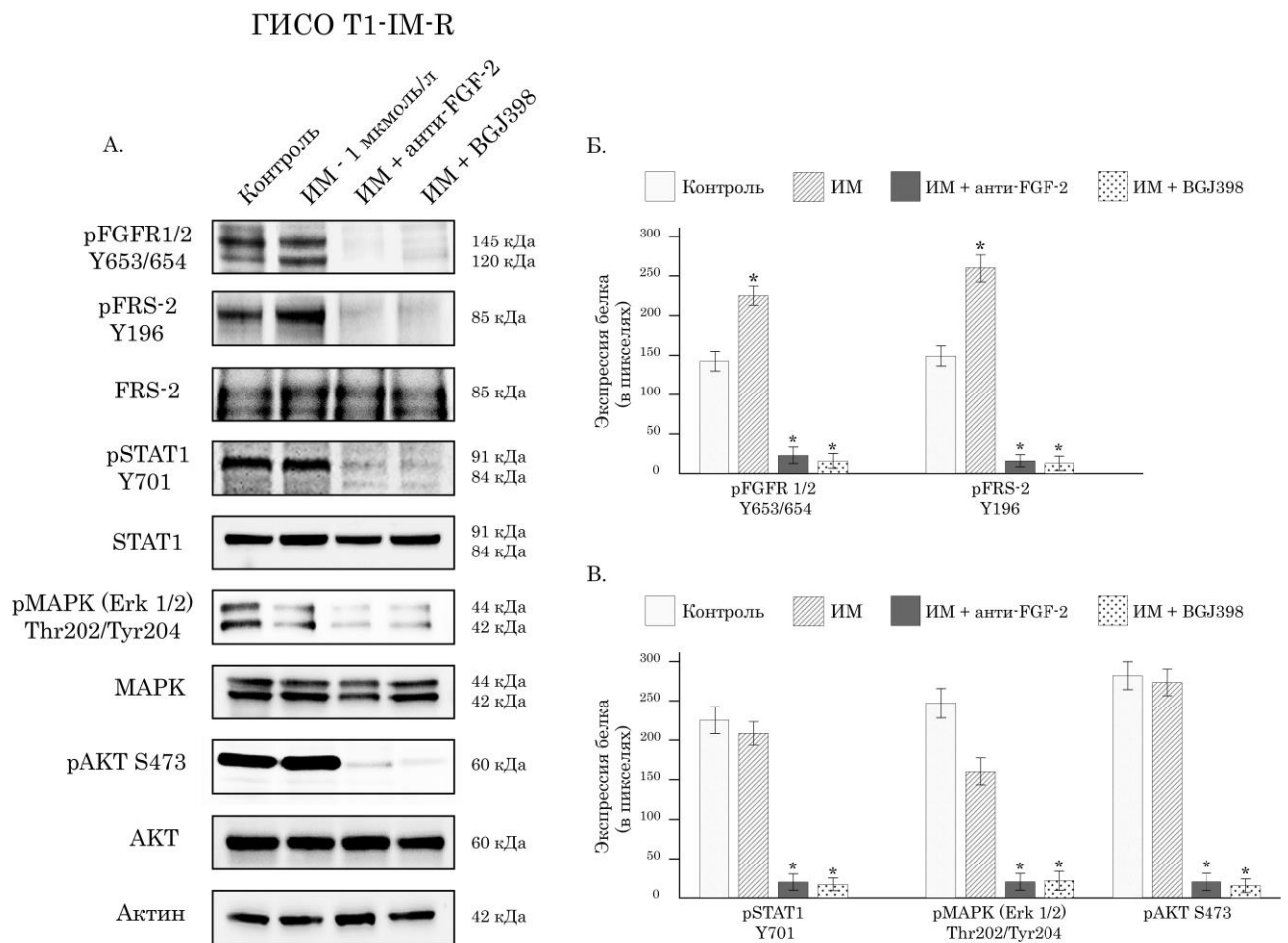


Рисунок 23 – Влияние ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л) и его комбинаций с анти-FGF-2 МАТ (20 мкг/мл) и BGJ398 (1 мкмоль/л). А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков FGFR-сигнального пути (FGFR1/2, FRS-2, STAT1, MAPK и AKT) методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия);* - $p < 0,05$.

В присутствии ИМ в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не нарушалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось наличием экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2 сравнимой по своему уровню с контрольным образцом. Кроме того, в присутствии ИМ в клетках ГИСО 430 не нарушалась экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и АКТ, значения денситометрии которых также соответствовали контрольному образцу (Рисунок 24А-В).

Напротив, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и BGJ398 – в клетках ГИСО 430 значительно снижалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось низкой экспрессией фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2. Кроме того, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и BGJ398 – в клетках ГИСО 430 значительно снижалась экспрессия фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1 и АКТ.

В тоже время, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО 430 отмечалась гиперэкспрессия фосфорилированной формы нерецепторной тирозинкиназы MAPK (Рисунок 24А-В). Вероятно, гиперэкспрессия фосфорилированной формы белка MAPK является компенсаторной реакцией опухолевых клеток на сниженную экспрессию фосфорилированных форм белков STAT1 и АКТ. Данный компенсаторный механизм обеспечивает жизнеспособность и пролиферацию клеток ГИСО 430 в условиях ингибирования FGFR-сигнального пути.

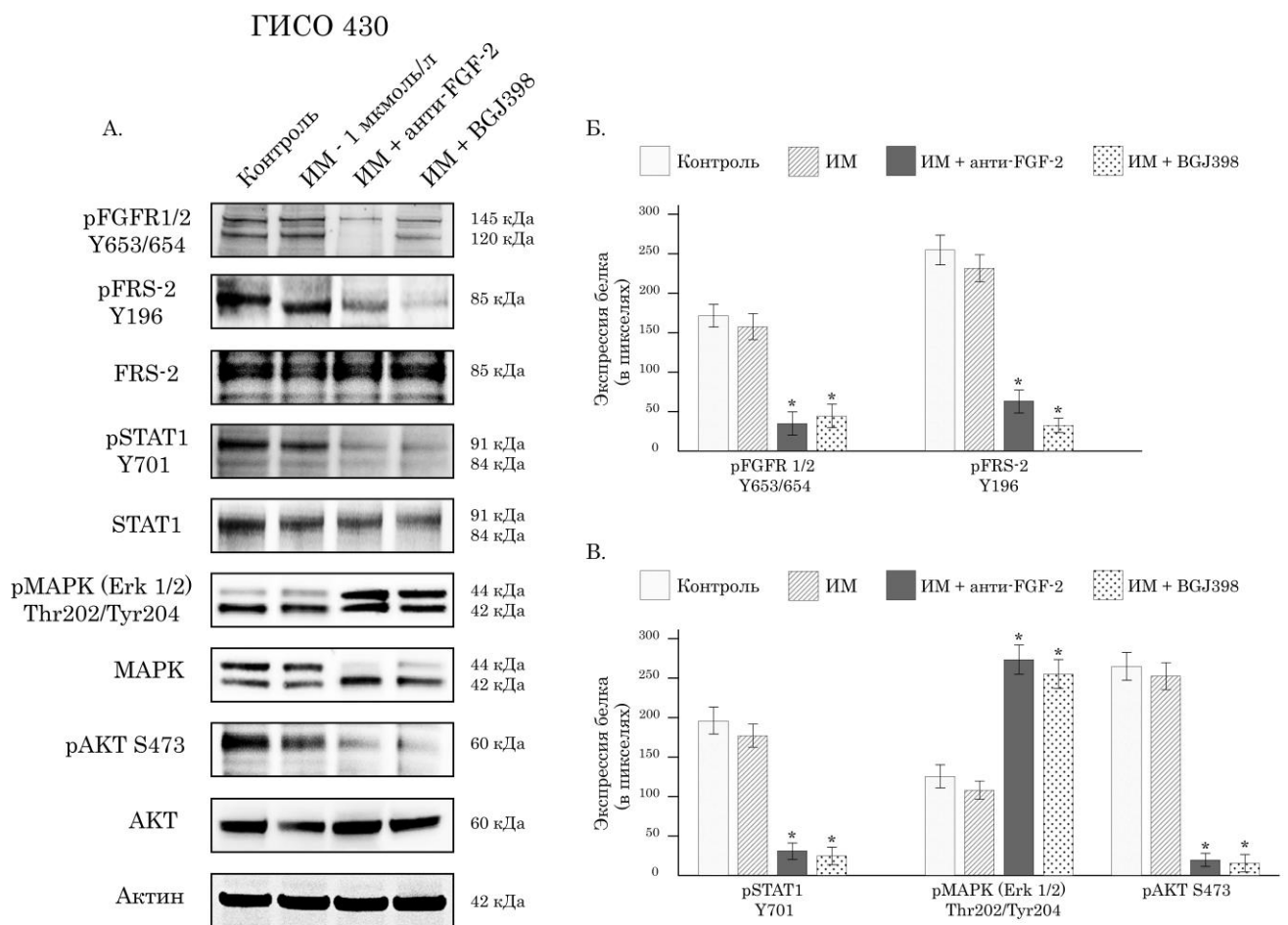


Рисунок 24 – Влияние ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430. Клетки ГИСО 430 культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л) и его комбинаций с анти-FGF-2 мАТ (20 мкг/мл) и BGJ398 (1 мкмоль/л). А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков FGFR-сигнального пути (FGFR1/2, FRS-2, STAT1, MAPK и AKT) методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что таргетный препарат ИМ активировал FGFR-сигнальный путь в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R, в которых отсутствуют вторичных мутаций *KIT*. За счет активации FGFR-сигналинга в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R повышалась экспрессия нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, играющих важную роль в процессах выживаемости, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Данная точка зрения подтверждается тем фактом, что в присутствии комбинации ИМ и ингибиторов FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и таргетного препарата BGJ398 – в клетках ГИСО T1-IM-R полностью подавлялось фосфорилирование рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2, что способствовало тотальному ингибированию фосфорилирования нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT и свидетельствует о нарушении жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток. Следовательно, таргетный препарат ИМ за счет активации FGFR-сигналинга способствует прогрессированию роста данной опухоли, т.е. формированию агрессивного фенотипа клеток ГИСО с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*.

В отличие от клеток ГИСО T1-IM-R, таргетный препарат ИМ не вызвал значимого увеличения экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2 в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичных мутаций *KIT*. Тем не менее, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и BGJ398 – в клетках ГИСО 430 значимо снижалось фосфорилирование рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2, что способствовало ингибированию фосфорилирования нерецепторных тирозинкиназ STAT1 и AKT, участвующих в поддержании жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток. Следовательно, FGFR-сигнальный путь также имеет значение для поддержания жизнеспособности ИМ-резистентных клеток ГИСО, имеющих вторичные мутации *KIT*.

3.3 Структурное и функциональное взаимодействие между тирозинкиназными рецепторами c-KIT и FGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО и модуляция их чувствительности к ИМ посредством воздействия на FGFR-сигналинг

3.3.1 Изучение взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами c-KIT и FGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО

Полученные результаты свидетельствуют, что при развитии вторичной резистентности клеток ГИСО Т1 к таргетному препарату ИМ, не связанной с возникновением вторичных мутаций *KIT*, в опухолевых клетках возникает изменение профиля активности тирозинкиназ: снижается активность c-KIT-сигнального пути и повышается активность FGFR-сигнального пути вследствие усиления аутокринной продукции FGF-2 лиганда и гиперэкспрессии его рецепторов FGFR1, FGFR2 (см. Рисунок 9, 10, 17, 19).

Под влиянием ИМ в клетках ГИСО Т1-ИМ-Р с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* значительно повышалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2 (см. Рисунок 23).

В присутствии ИМ в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не нарушалась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось наличием экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2 сравнимой по своему уровню с контрольным образцом (см. Рисунок 24).

Активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО могла быть обусловлена структурной и функциональной взаимосвязью между тирозинкиназными рецепторами c-KIT, FGFR1 и FGFR2. В связи с этим, было предпринято исследование взаимосвязи между указанными рецепторами в ИМ-резистентных клетках ГИСО методом коиммунопреципитации (Рисунок 25). В ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась коиммунопреципитация тирозинкиназных рецепторов

с-KIT/FGFR1 и с-KIT/FGFR2, что подтверждается наличием одновременной экспрессией указанных рецепторов (Рисунок 25). Напротив, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаруживалась коиммунопреципитация тирозинкиназных рецепторов с-KIT/FGFR1 и с-KIT/FGFR2, что подтверждается отсутствием одновременной экспрессии указанных рецепторов (Рисунок 25).

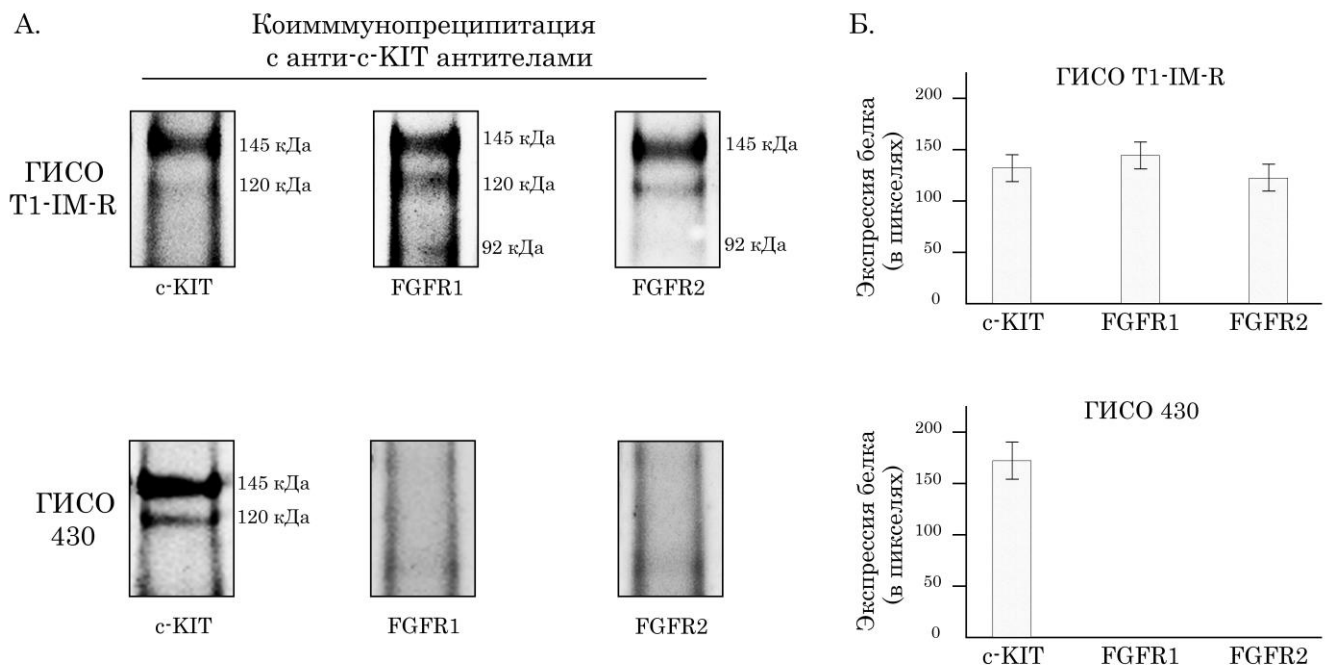


Рисунок 25 – Коиммунопреципитация тирозинкиназных рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов. После этого готовились клеточные лизаты, к которым добавлялись преципитирующие анти-с-KIT антитела и выполнялась методика коиммуноперципитации с-KIT/FGFR1, с-KIT/FGFR2. А – Оценка экспрессии общих форм белков с-KIT, FGFR1 и FGFR2 методом иммуноблоттинга; Б – Количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия).

Далее взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО исследовалось методом иммунофлуоресцентной микроскопии (Рисунок 26).

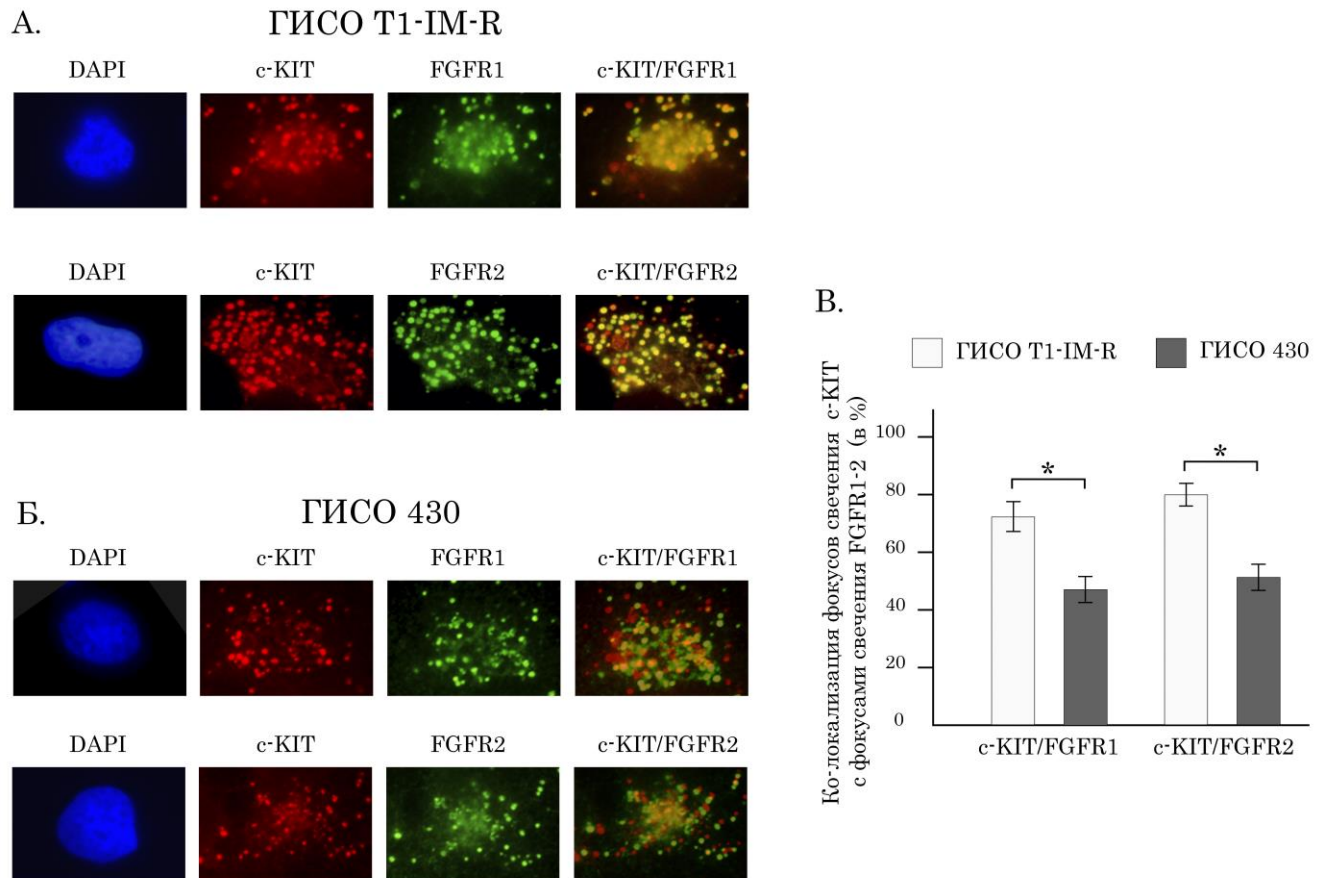


Рисунок 26 – Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназных рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (А) и ГИСО 430 (Б). Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов. После этого выполнялась иммунофлуоресцентная микроскопия рецепторов с-KIT (красное свечение), FGFR1 и FGFR2 (зеленое свечение) при увеличении 100х. На ко-локализацию рецепторов с-KIT/FGFR1, с-KIT/FGFR2 указывает желтое свечение. Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI; В – количественный анализ ко-локализации рецепторов с-KIT/FGFR1, с-KIT/FGFR2.

Было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* ко-локализация тирозинкиназных рецепторов с-KIT/FGFR1 составляла 72%, а ко-локализация с-KIT/FGFR2 – 79%. Напротив, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, ко-локализация тирозинкиназных рецепторов с-KIT/FGFR1 и с-KIT/FGFR2 была значительно ниже и составляла 47% и 52%, соответственно.

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие структурной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT/FGFR1 и с-KIT/FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R, что подтверждается коиммунопреципитацией рецепторов и высокой степенью их ко-локализации (с-KIT/FGFR1 – 72%, с-KIT/FGFR2 – 79%). В тоже время, в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 не обнаружилось структурной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT/FGFR1 и с-KIT/FGFR2, что подтверждается отсутствием коиммунопреципитации рецепторов и низкой степенью их ко-локализации (с-KIT/FGFR1 – 47%, с-KIT/FGFR2 – 52%).

Структурная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* подразумевает наличие функциональной взаимосвязи между указанными рецепторами. В пользу функциональной взаимосвязи с-KIT/FGFR1 и с-KIT/FGFR2 свидетельствует тот факт, что в присутствии ИМ, который является ингибитором с-KIT, в клетках ГИСО T1-IM-R значимо повышалась экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 (см. Рисунок 23). Поэтому далее методом иммунофлуоресцентной микроскопии изучалась экспрессия тирозинкиназных рецепторов с-KIT и FGFR1-2 в клетках ГИСО T1-IM-R в присутствии ИМ (Рисунок 27).

В присутствии таргетного препарата ИМ в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* ко-локализация тирозинкиназных рецепторов с-KIT/FGFR1 составляла 97%, а ко-локализация с-KIT/FGFR2 – 98% (Рисунок 27 А, Б, В).

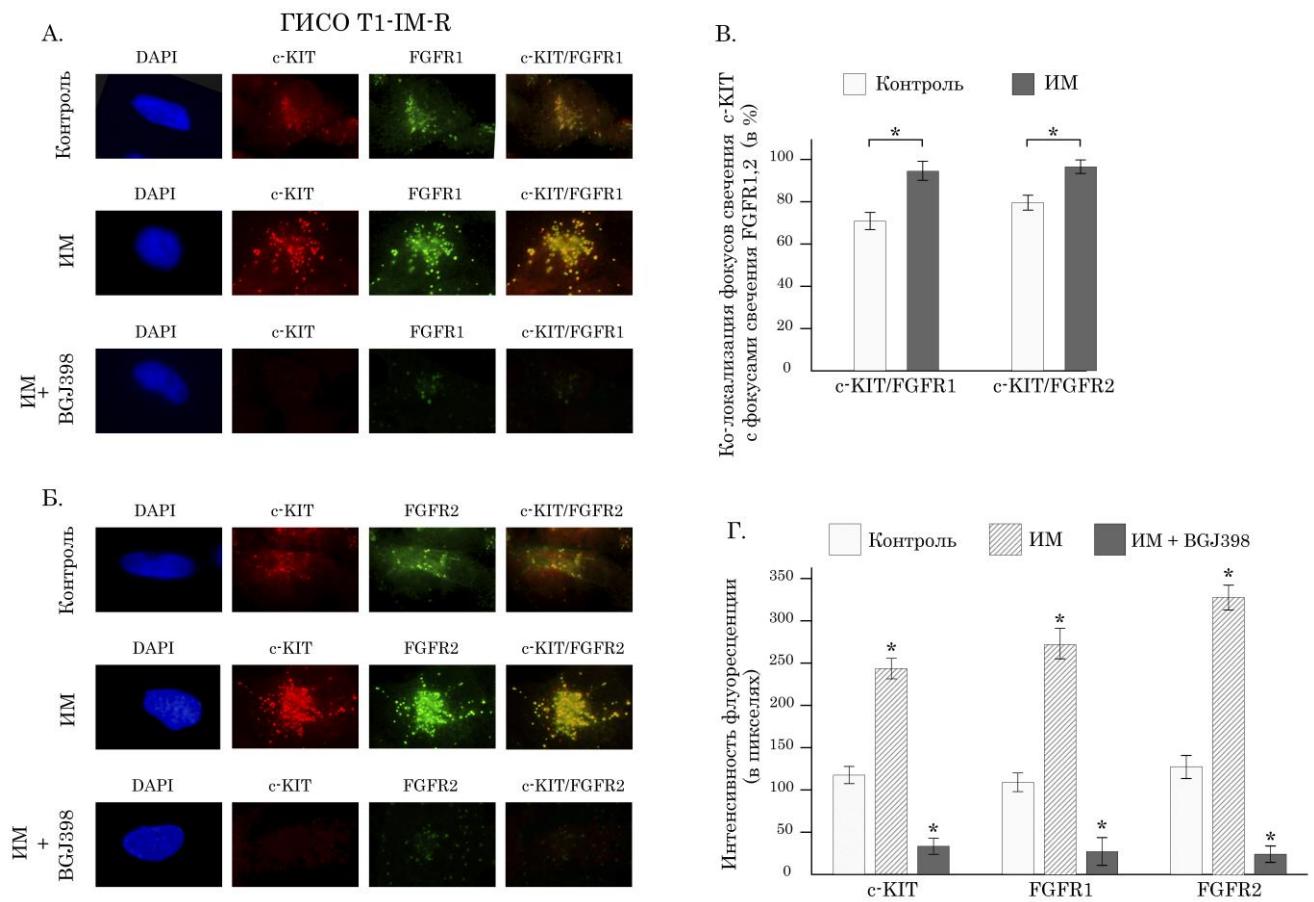


Рисунок 27 – Влияние ИМ на экспрессию и ко-локализацию тирозинкиназных рецепторов c-KIT, FGFR1 и FGFR2 в клетках ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л) и его комбинации с BGJ398 (1 мкмоль/л). После этого выполнялась иммунофлуоресцентная микроскопия рецепторов c-KIT (красное свечение), FGFR1 и FGFR2 (зеленое свечение) при увеличении 100х. На ко-локализацию рецепторов c-KIT/FGFR1, c-KIT/FGFR2 указывает желтое свечение. Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI. А – Исследование ко-локализации рецепторов c-KIT/FGFR1; Б – Исследование ко-локализации рецепторов c-KIT/FGFR2; В – количественный анализ ко-локализации рецепторов c-KIT/FGFR1 и c-KIT/FGFR2; Г – Интенсивность флуоресценции c-KIT, FGFR1 и FGFR2 в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

Следовательно, в присутствии таргетного препарата ИМ в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалось значимое увеличение ко-локализации тирозинкиназных рецепторов с-KIT/FGFR1, с-KIT/FGFR2. Кроме того, было обнаружено (Рисунок 27 А, Б, Г), что в присутствии таргетного препарата ИМ в клетках ГИСО T1-IM-R значимо увеличивалась интенсивность флуоресценции тирозинкиназных рецепторов с-KIT (в 2,2 раза), FGFR1 (в 2,5 раза), FGFR2 (в 2,6 раза). Напротив, в присутствии комбинации ИМ с BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) в клетках ГИСО T1-IM-R значимо снижалась интенсивность флуоресценции рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2, что свидетельствует об ингибировании с-KIT-сигнального пути и FGFR-сигнального пути (Рисунок 27 А, Б, Г).

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*. Структурная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 подтверждается коиммунопреципитацией рецепторов и их высокой степенью ко-локализации. На функциональную взаимосвязь тирозинкиназных рецепторов с-KIT и FGFR1 и FGFR2 указывает значимое увеличение интенсивности флуоресценции рецепторов и повышение степени их ко-локализации в присутствии таргетного препарата ИМ. Кроме того, на функциональную взаимосвязь тирозинкиназных рецепторов с-KIT и FGFR1 и FGFR2 указывает значимое снижение интенсивности флуоресценции рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в присутствии комбинации ИМ с BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4), свидетельствующее об ингибировании обоих сигнальных путей (с-KIT-сигнального пути и FGFR-сигнального пути).

В тоже время, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаружилось структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2, что

подтверждается отсутствием коиммунопреципитации рецепторов и низкой степенью их ко-локализации.

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

3.3.2 Модуляция чувствительности ИМ-резистентных клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ посредством ингибирования FGFR-сигналинга

Как и ожидалось, в присутствии ИМ в концентрации 0,25 мкмоль/л отмечалась массовая гибель ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1 (Рисунок 28). Под влиянием ИМ в клетках ГИСО T1 значительно снижалась экспрессия фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности опухолевых клеток. Таргетный препарат ИМ индуцировал апоптоз клеток ГИСО T1, что подтверждается высокой экспрессией расщепленных форм PARP и каспазы-3 (Рисунок 28А-В). В присутствии препарата BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) в концентрации 1 мкмоль/л сохранялась жизнеспособность клеток ГИСО T1, о чем свидетельствовала сравнимая с контрольным образцом экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, а также отсутствие экспрессии маркеров апоптоза.

В присутствии комбинации ИМ (0,25 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) ожидаемо отмечалась массовая гибель ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1 по механизму апоптоза (Рисунок 28А-В). Тем не менее, в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 в клетках ГИСО T1 не отмечалось значимого снижения экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, по сравнению с одиночным использованием ИМ. Кроме того, в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 в клетках ГИСО T1 не отмечалось значимого увеличения экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3, по сравнению с

одиночным использованием ИМ. Следовательно, гибель по механизму апоптоза ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 в присутствии комбинации препаратов ИМ и BGJ398 была обусловлена только цитотоксическим эффектом ИМ.

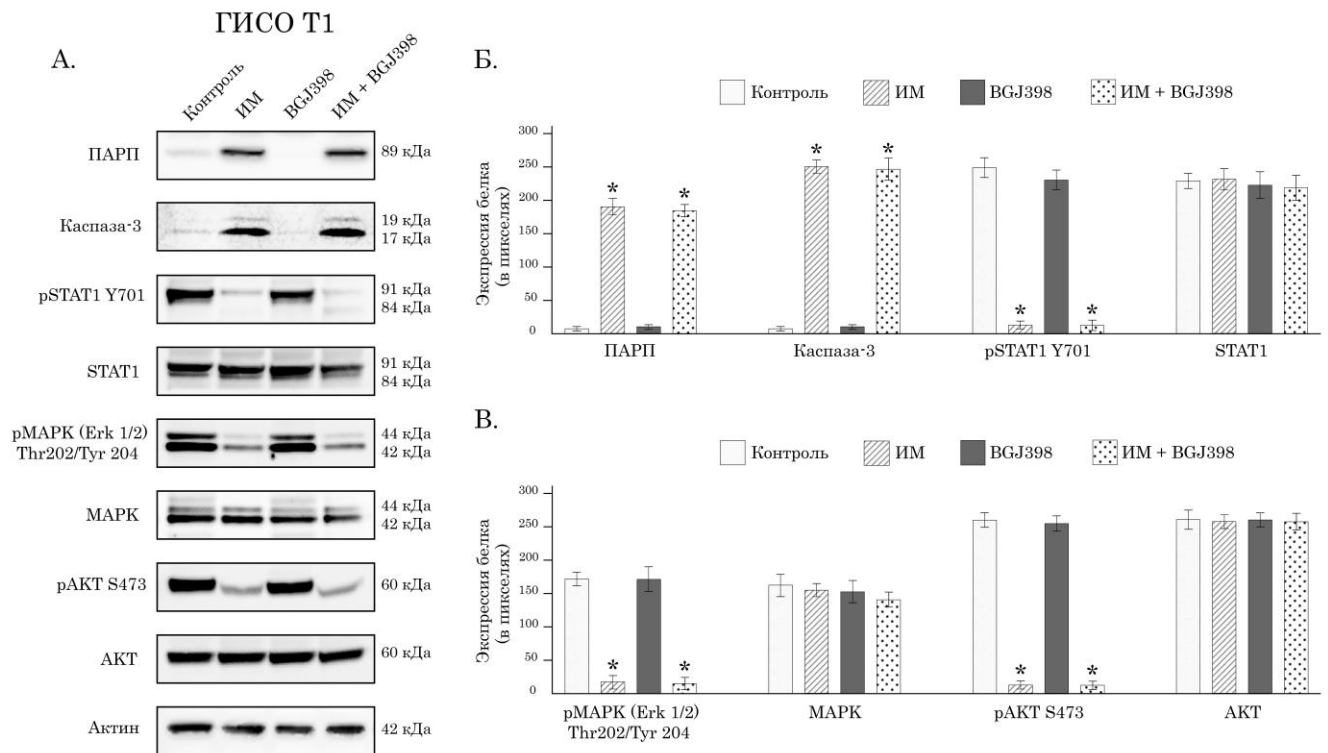


Рисунок 28 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (0,25 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование экспрессии маркеров апоптоза и нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK, АКТ в клетках ГИСО Т1 методом иммуноблотинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и PARP; Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

Полученные результаты подтверждаются исследованием пролиферации клеток ГИСО Т1 в присутствии ИМ, BGJ398 и их комбинации (Рисунок 29). В присутствии ИМ в концентрации 0,25 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО Т1 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла не более 20% от контроля, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток под действием таргетного препарата (Рисунок 29А). В присутствии ИМ наблюдалось значимое снижение пролиферативной активности клеток ГИСО Т1, что подтверждает чувствительность клеток к таргетному препарату (Рисунок 37Б).

В присутствии препарата BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО Т1 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 85-90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 29А). В присутствии BGJ398 не отмечалось снижения пролиферативной активности клеток ГИСО Т1, что также указывает на сохранение жизнеспособности опухолевых клеток в присутствии препарата (Рисунок 29Б).

В присутствии комбинации ИМ (0,25 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) ожидаемо отмечалось значимое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО Т1, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток (Рисунок 29А). Тем не менее, в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 интенсивность окраски чашек Петри с клетками ГИСО Т1 раствором кристаллического фиолетового составляла не более 20% от контроля, т.е. не отличалась от одиночного использования ИМ. В присутствии комбинации ИМ (0,25 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) ожидаемо отмечалось значимое снижения пролиферативной активности клеток ГИСО Т1, что также свидетельствует о гибели опухолевых клеток (Рисунок 29Б). Тем не менее, наблюдаемый антипролиферативный эффект комбинации препаратов ИМ и BGJ398 в отношении клеток ГИСО Т1 не отличался от антипролиферативного эффекта ИМ при его одиночном использовании (Рисунок 29Б). Следовательно, нарушение пролиферации ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 в присутствии комбинации препаратов ИМ и BGJ398 была обусловлена только эффектом ИМ.

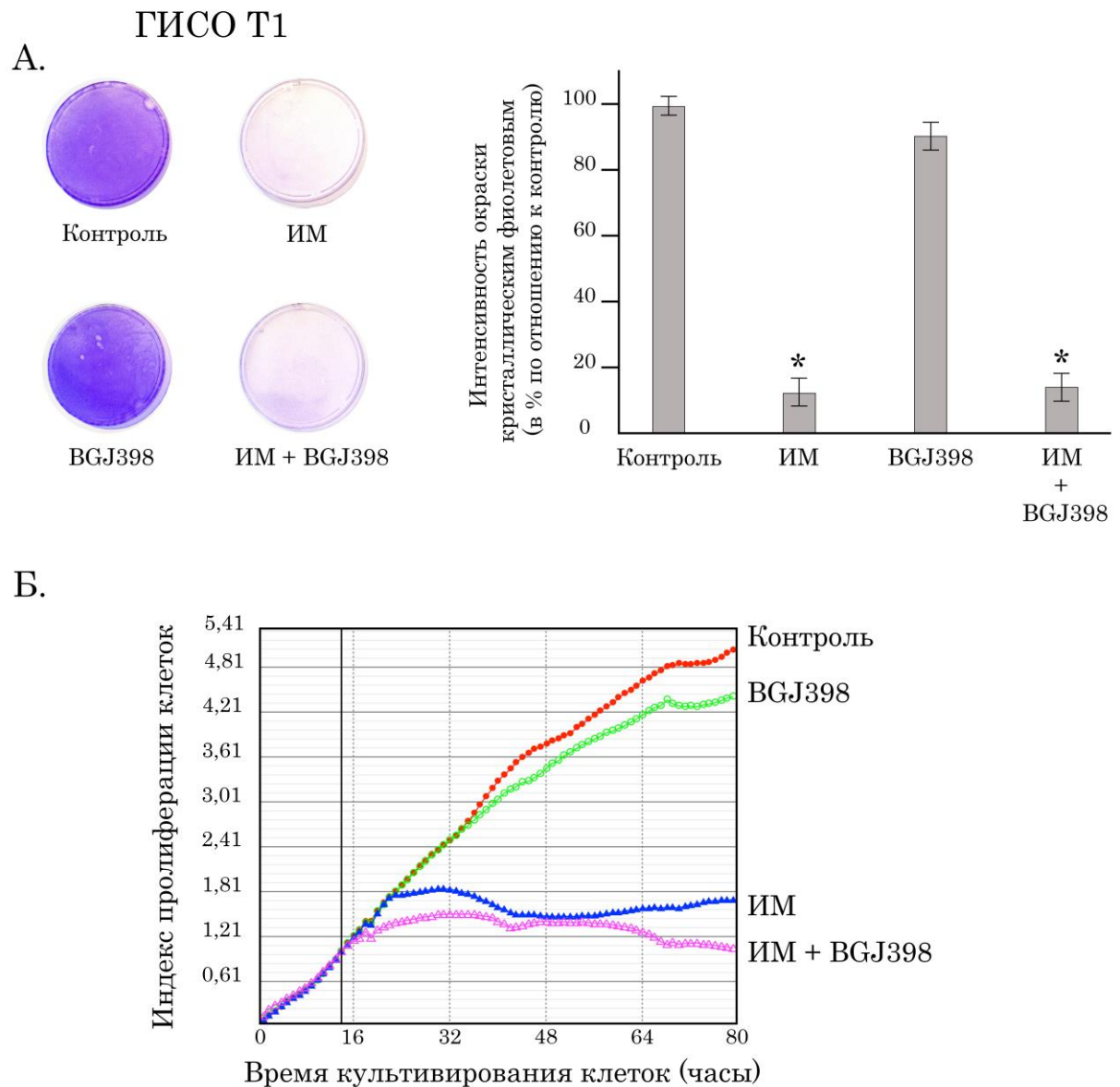


Рисунок 29 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировали в течение 80 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (0,25 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО Т1 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО Т1 с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США).

Таким образом, цитотоксический и антипролиферативный эффект комбинации препаратов ИМ и BGJ398 в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1 был обусловлен действием только таргетного препарата ИМ.

Далее исследовалась способность BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) модулировать чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* к таргетному препарату ИМ.

Как и ожидалось, в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л сохранялась жизнеспособность ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R (Рисунок 30). Под влиянием ИМ в клетках ГИСО T1-ИМ-R не отмечалось значимого снижения экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Таргетный препарат ИМ не вызывал апоптоз клеток ГИСО T1-ИМ-R, что подтверждается отсутствием экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3 (Рисунок 30А-В). В присутствии препарата BGJ398 в концентрации 1 мкмоль/л также сохранялась жизнеспособность клеток ГИСО T1-ИМ-R, о чем свидетельствовала сравнимая с контрольным образцом экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, а также отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (Рисунок 30А-В).

Напротив, в присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R (Рисунок 30А-В). Под влиянием комбинации ИМ и BGJ398 в клетках ГИСО T1-ИМ-R отмечалось резкое снижение экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности опухолевых клеток. Кроме того, при комбинированном использовании препаратов (ИМ + BGJ398) в клетках ГИСО T1-ИМ-R отмечалось резкое увеличение экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3, что свидетельствует о гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза. Таким образом, можно сделать вывод о том, что гибель по механизму апоптоза ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R отмечалась только при

использовании комбинации препаратов (ИМ + BGJ398). По отдельности препараты ИМ и BGJ398 не вызывали апоптоз ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*.

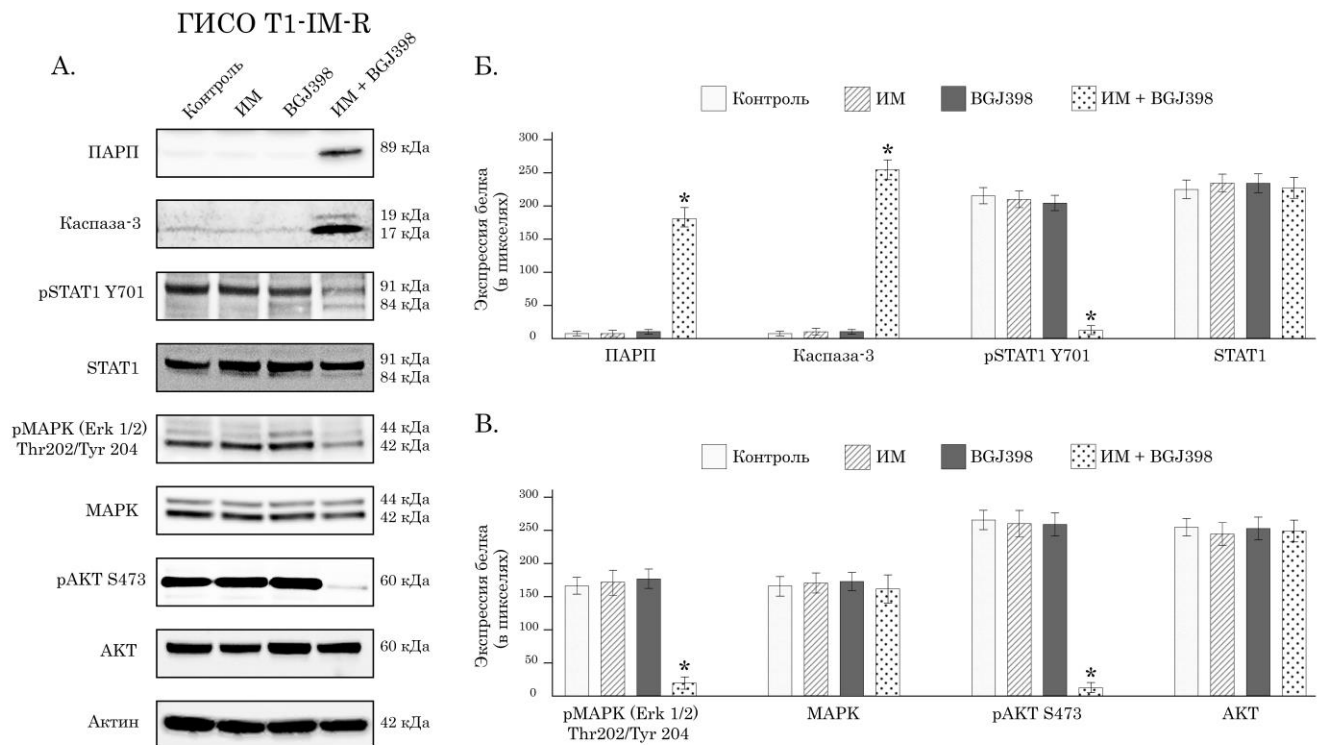


Рисунок 30 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R. Клетки ГИСО T1-ИМ-R культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование экспрессии маркеров апоптоза и нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK, AKT в клетках ГИСО T1-ИМ-R методом иммуноблотинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

Полученные результаты подтверждаются исследованием пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R в присутствии ИМ, BGJ398 и их комбинации (Рисунок 31). В присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО T1-ИМ-R интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 85-90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 31А). В присутствии ИМ не отмечалось снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-ИМ-R, что подтверждает резистентность клеток к данному таргетному препарату (Рисунок 31Б).

В присутствии препарата BGJ398 в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО T1-ИМ-R также наблюдалась высокая интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым (85-90% от контроля), что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 31А). Кроме того, препарат BGJ398 не вызывал снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-ИМ-R (Рисунок 31Б).

Напротив, под действием комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) отмечалось резкое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО T1-ИМ-R, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток (Рисунок 37А). В присутствии комбинации ИМ и BGJ398 интенсивность окраски чашек Петри с клетками ГИСО T1-ИМ-R раствором кристаллического фиолетового составляла не более 20% от контроля. В присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) отмечалось резкое снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-ИМ-R, что также свидетельствует о гибели опухолевых клеток (Рисунок 31Б).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что нарушение пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R отмечалась только при использовании комбинации препаратов (ИМ + BGJ398). По отдельности препараты ИМ и BGJ398 не оказывали антипролиферативный эффект в отношении клеток ГИСО T1-ИМ-R.

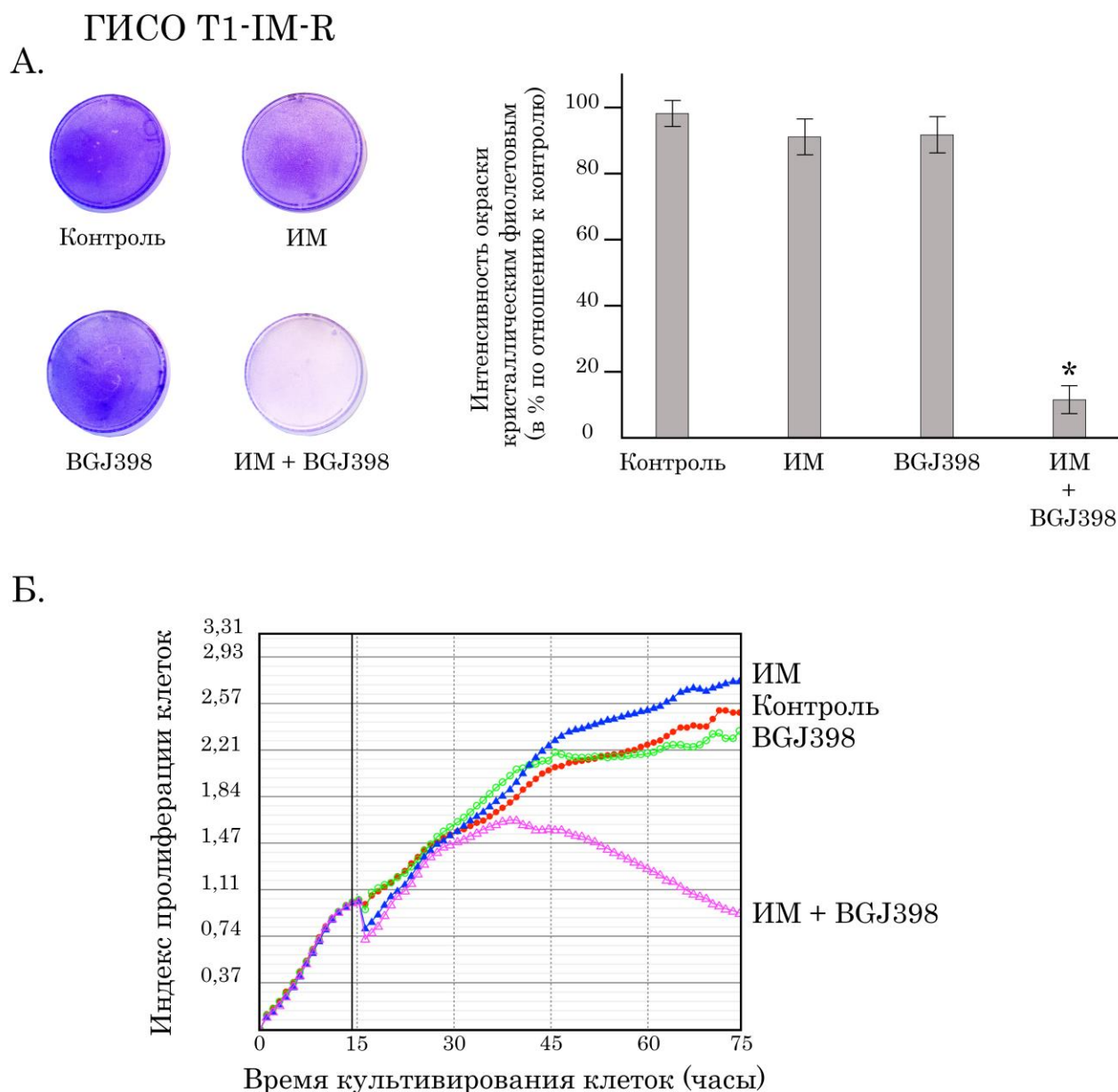


Рисунок 31 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 75 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США).

Таким образом, таргетные препараты ИМ и BGJ398 оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R только при комбинированном использовании. Поэтому далее исследовался вариант взаимодействия препаратов ИМ и BGJ398 при их совместном применении (аддитивное, синергитическое или антагонистическое взаимодействие). В таблице 7 продемонстрирован показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и BGJ398 в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R, который был определен с помощью компьютерной программы Synergy Finder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html>), дата обращения 12.05.2025).

Таблица 7 – Показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и BGJ398 для клеточной линии ГИСО T1-IM-R

Клеточная линия	Показатель синергизма ИМ + BGJ			
	ZIP	Bliss	Loewe	HSA
ГИСО T1-IM-R	62,53	62,48	65,82	65,21

Примечание – Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 в течение 72 часов. Концентрации препаратов: ИМ (0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л; 4 мкмоль/л), BGJ398 (0,125 мкмоль/л; 0,25 мкмоль/л; 0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л). Жизнеспособность клеток в присутствии препаратов оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста. На основании значений жизнеспособности клеток были вычислены показатели синергизма (ZIP, Bliss, Loewe, HSA), представленные в таблице. Интерпретация показателей синергизма: > 10 (синергитическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < -10 (антагонистическое взаимодействие)

Полученные результаты свидетельствуют, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма ИМ и BGJ398 был более 10 единиц (Таблица 7). Следовательно, между препаратами ИМ и BGJ398 при их комбинированном использовании в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R развивался синергитический

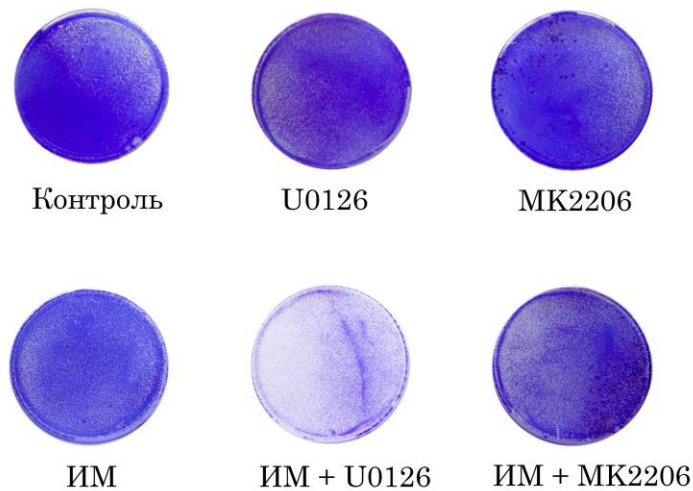
вариант взаимодействия. При синергизме препаратов их совместный эффект превышает сумму эффектов, возникающих при использовании каждого препарата по отдельности. Следовательно, при синергетическом взаимодействии препаратов развивается их преумножающий эффект. Таким образом, цитотоксический и антипролиферативный эффект комбинации ИМ и BGJ398 в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* был обусловлен синергетическим взаимодействием указанных препаратов.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препарат BGJ398, являясь селективным ингибитором рецепторов FGFR1-4, способствовал восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетному препарату ИМ.

Поскольку под влиянием комбинации ИМ и BGJ398 в клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось резкое снижение экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ MAPK и AKT (см. Рисунок 30А-В), то далее исследовалась способность селективного ингибитора MAPK-киназы (препарата U0126) и селективного ингибитора AKT-киназы (препарата MK2206) индуцировать ресинситизацию ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетному препарату ИМ (Рисунок 32). В присутствии препарата U0126 (селективный ингибитор MAPK-киназы) в концентрации 10 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО T1-IM-R наблюдалась высокая интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым (85-97% от контроля), что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 32А). Напротив, под действием комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и U0126 (10 мкмоль/л) отмечалось резкое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток. В присутствии комбинации ИМ и U0126 интенсивность окраски чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R раствором кристаллического фиолетового составляла не более 30% от контроля (Рисунок 32А).

ГИСО T1-IM-R

А.



Б.

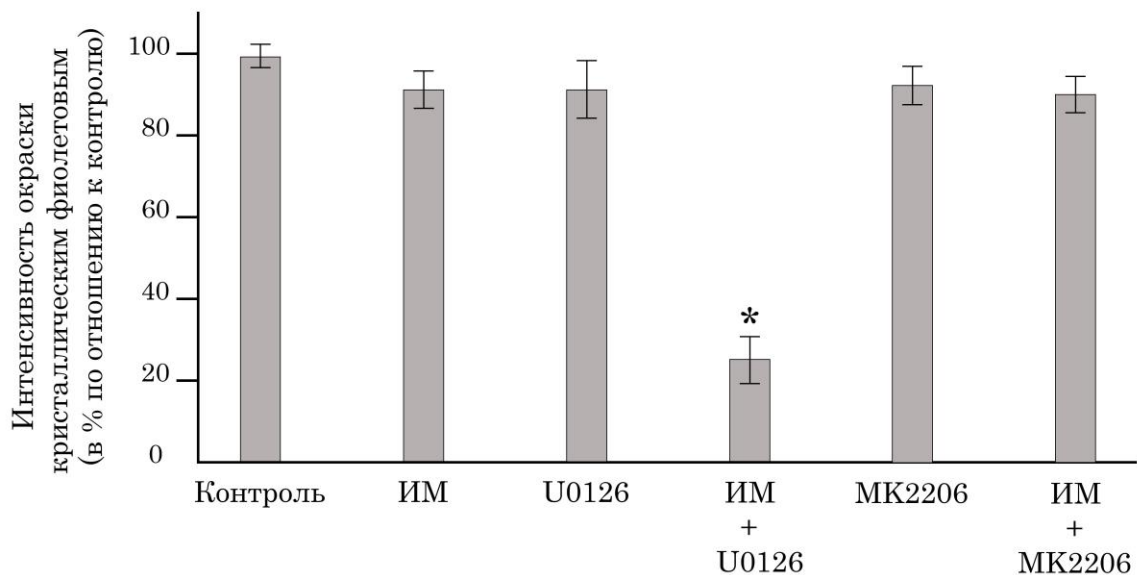


Рисунок 32 – Антипролиферативная активность ИМ, U0126, MK2206 и комбинаций препаратов (ИМ + U0126, ИМ + MK2206) в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 96 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), U0126 (10 мкмоль/л), MK2206 (3 мкмоль/л) и их комбинации. А – Фотографии чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R, окрашенных фиксирующим раствором кристаллического фиолетового; Б – графики интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$.

Показано, что МАРК-киназа (Erk1/2) участвует в развитии RAS-RAF-МАРК-сигнального пути, являющегося ключевым для деления опухолевых клеток, усиления их миграции и развития ангиогенеза [155, 203]. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препарат U0126, являясь селективным ингибитором МАРК-киназы, способствовал восстановлению чувствительности (т.е. ресенситизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R к таргетному препарату ИМ. Следовательно, пролиферация ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* происходит главным образом за счет активации МАРК-киназного каскада.

В присутствии препарата МК2206 (селективный ингибитор АКТ-киназы) в концентрации 3 мкмоль/л, а также в присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и МК2206 (3 мкмоль/л) в чашках Петри с клетками ГИСО T1-ИМ-R наблюдалась высокая интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым (85-95% от контроля), что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 40Б). АКТ-киназа представляет собой ключевой компонент PI3K-АКТ-mTOR-сигнального пути, который имеет важное значение для пролиферации и выживаемости опухолевых клеток [39, 205]. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препарат МК2206, являясь селективным ингибитором АКТ-киназы, не обеспечивал восстановление чувствительности (т.е. ресенситизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R к таргетному препарату ИМ. Следовательно, активация АКТ-киназы не является ключевым механизмом, обеспечивающим пролиферацию ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R.

Далее исследовалась способность других селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (препараты AZD4547 и TAS-120) индуцировать ресенситизацию ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R к таргетному препарату ИМ (Рисунок 33, 34).

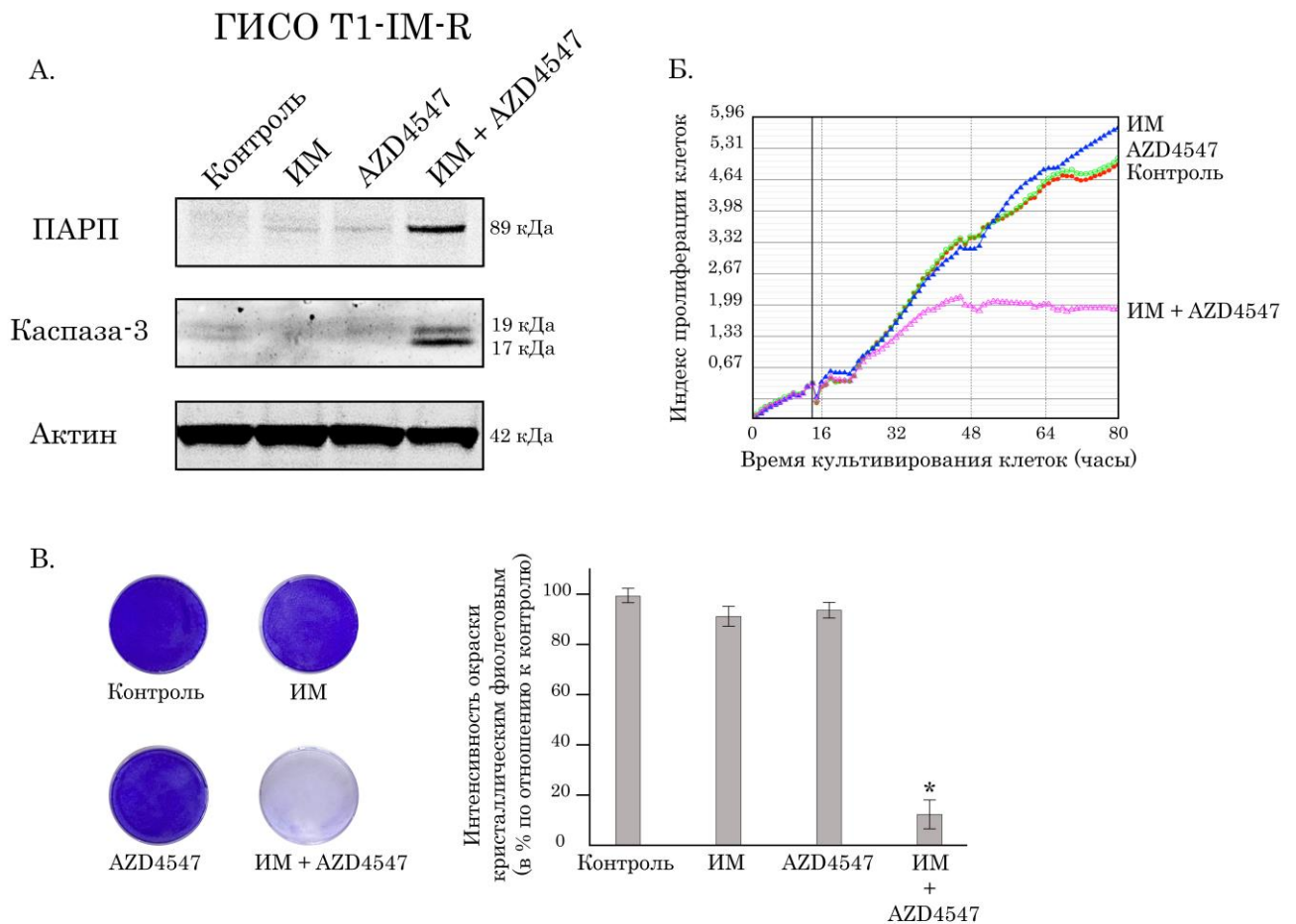


Рисунок 33 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ, AZD4547 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировались в течение 80 часов отсутствия препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), AZD4547 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование апоптоза клеток ГИСО T1-IM-R методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; 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 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$.

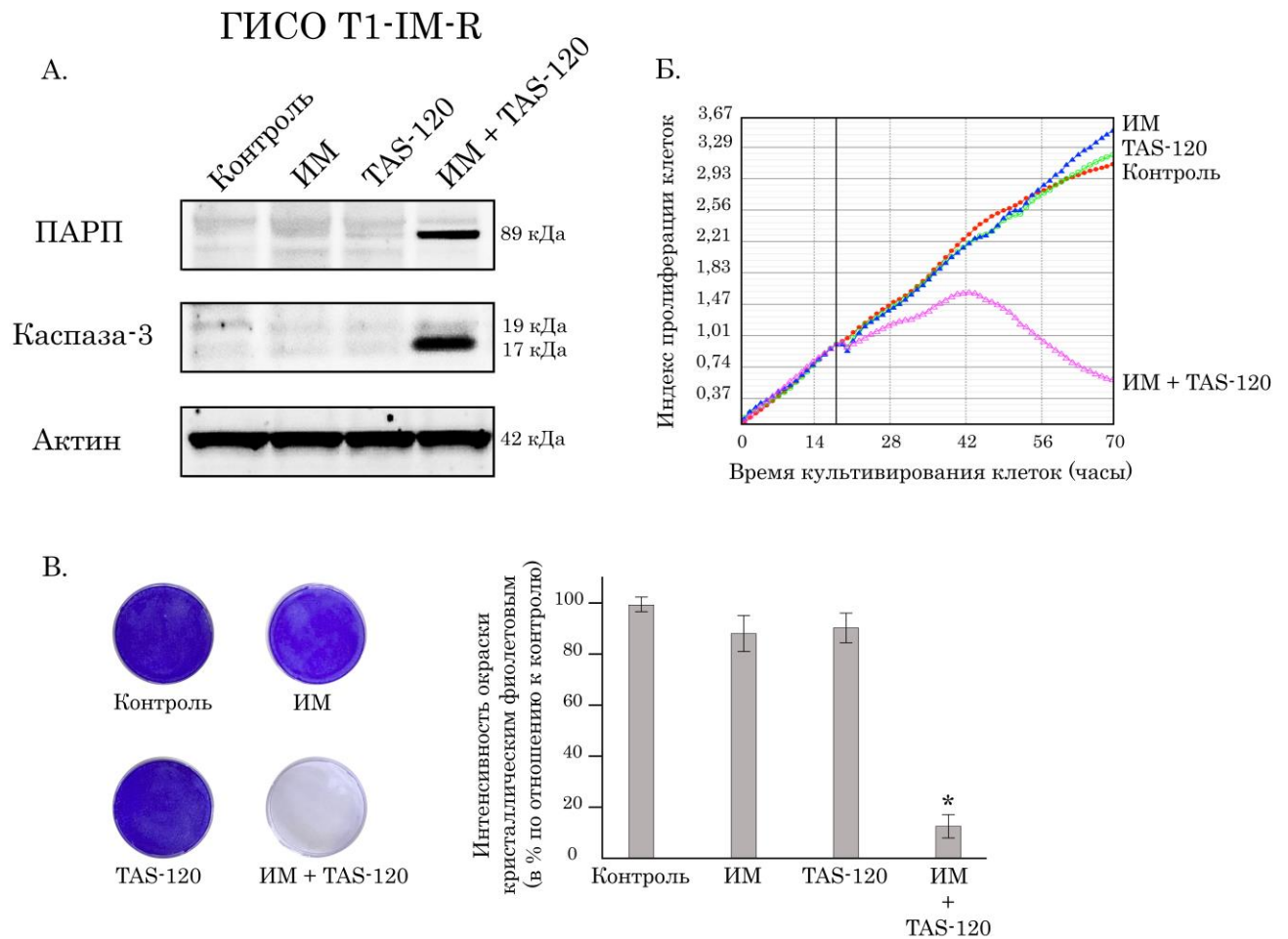


Рисунок 34 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ, TAS-120 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировались в течение 80 часов отсутствия препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), TAS-120 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование апоптоза клеток ГИСО T1-IM-R методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; 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 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$.

В присутствии препаратов AZD4547 (1 мкмоль/л) и ИМ (1 мкмоль/л) взятых по отдельности сохранялась жизнеспособность и пролиферация клеток ГИСО T1-IM-R, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы PARP и каспазы-3), сравнимые с контрольным образом индекс пролиферации опухолевых клеток и интенсивность окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового (см. Рисунок 33 А-В). Напротив, в присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и AZD4547 (1 мкмоль/л) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R по механизму апоптоза, что подтверждалось резким увеличением экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3, снижением индекса пролиферации опухолевых клеток и низкой интенсивностью окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового (см. Рисунок 33 А-В).

В присутствии препаратов TAS-120 (1 мкмоль/л) и ИМ (1 мкмоль/л) взятых по отдельности сохранялась жизнеспособность и пролиферация клеток ГИСО T1-IM-R, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы PARP и каспазы-3), сравнимые с контрольным образом индекс пролиферации опухолевых клеток и интенсивность окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового (Рисунок 34 А-В). Напротив, в присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и TAS-120 (1 мкмоль/л) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R по механизму апоптоза, что подтверждалось резким увеличением экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3, снижением индекса пролиферации опухолевых клеток и низкой интенсивностью окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового (Рисунок 34 А-В).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препараты AZD4547 и TAS-120, являясь селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, способствовали восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* к таргетному препарату ИМ. Поэтому далее исследовался вариант взаимодействия ИМ с данными селективными

ингибиторами рецепторов FGFR1-4 (AZD4547 и TAS-120) при их совместном применении (аддитивное, синергитическое или антагонистическое взаимодействие). В таблице 8 продемонстрирован показатель синергизма комбинации препаратов (ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120) в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R, который был определен с помощью компьютерной программы Synergy Finder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html> , дата обращения 12.05.2025).

Таблица 8 – Показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (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 + AZD4547	32,34	31,18	34,05	33,48
	ИМ + TAS-120	29,44	30,53	33,78	34,11

Примечание - Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в присутствии комбинации ИМ с препаратами AZD4547 и TAS-120 в течение 72 часов. Концентрации препаратов: ИМ (0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л; 4 мкмоль/л), AZD4547 и TAS-120 (0,125 мкмоль/л; 0,25 мкмоль/л; 0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л). Жизнеспособность клеток в присутствии препаратов оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста. На основании значений жизнеспособности клеток были вычислены показатели синергизма (ZIP, Bliss, Loewe, HSA), представленные в таблице. Интерпретация показателей синергизма: > 10 (синергетическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < - 10 (антагонистическое взаимодействие).

Полученные результаты свидетельствуют, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120 был более 10 единиц (Таблица 8). Следовательно, между препаратами (ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120) при их комбинированном использовании в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R развивался синергетический вариант взаимодействия.

Далее исследовалась способность BGJ398 модулировать чувствительность к таргетному препарату ИМ клеток ГИСО 430, резистентных к препарату за счет вторичной мутации *KIT*. Как и ожидалось, в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л сохранялась жизнеспособность ИМ-резистентных клеток ГИСО 430 (Рисунок 35). Под влиянием ИМ в клетках ГИСО 430 не отмечалось значимого снижения экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Таргетный препарат ИМ не вызывал апоптоз клеток ГИСО 430, что подтверждается отсутствием экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3 (Рисунок 35А-В). В присутствии препарата BGJ398 в концентрации 1 мкмоль/л также сохранялась жизнеспособность клеток ГИСО 430, о чем свидетельствовала сравнимая с контрольным образцом экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, а также отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (Рисунок 35А-В). При использовании комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) не отмечалось гибели ИМ-резистентных клеток ГИСО 430, о чем свидетельствовало отсутствие экспрессии маркеров апоптоза – расщепленных форм PARP и каспазы-3 (Рисунок 35А-В). Кроме того, в присутствии комбинации препаратов (ИМ + BGJ398) в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 отмечалось значимое повышение экспрессии фосфорилированной формы нерецепторной тирозинкиназы MAPK, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 35А-В). Таким образом, комбинация таргетного препарата ИМ и BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) не оказывала цитотоксического эффект в отношении клеток ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*.

Полученные результаты подтверждаются исследованием пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО 430 в присутствии ИМ, BGJ398 и их комбинации (Рисунок 36).

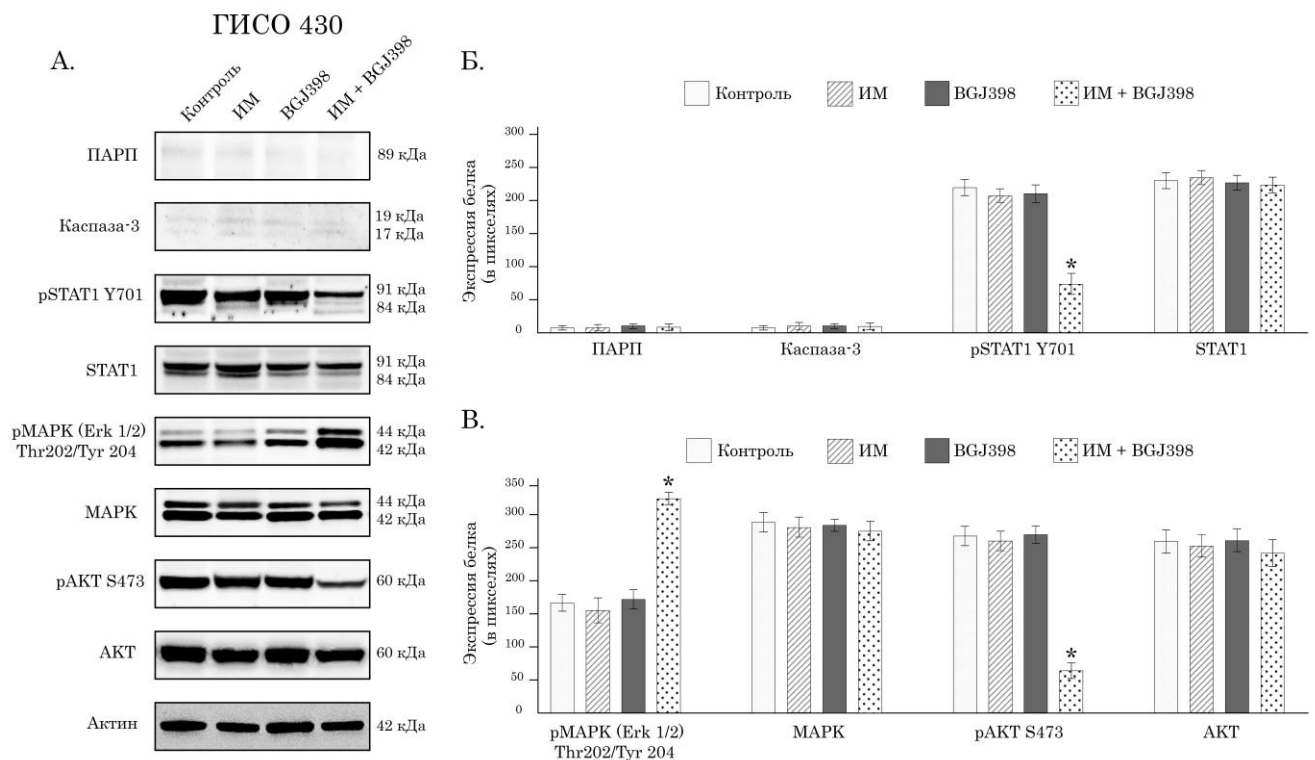


Рисунок 35 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430. Клетки ГИСО 430 культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование экспрессии маркеров апоптоза и нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK, AKT в клетках ГИСО T1-ИМ-R методом иммуноблотинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

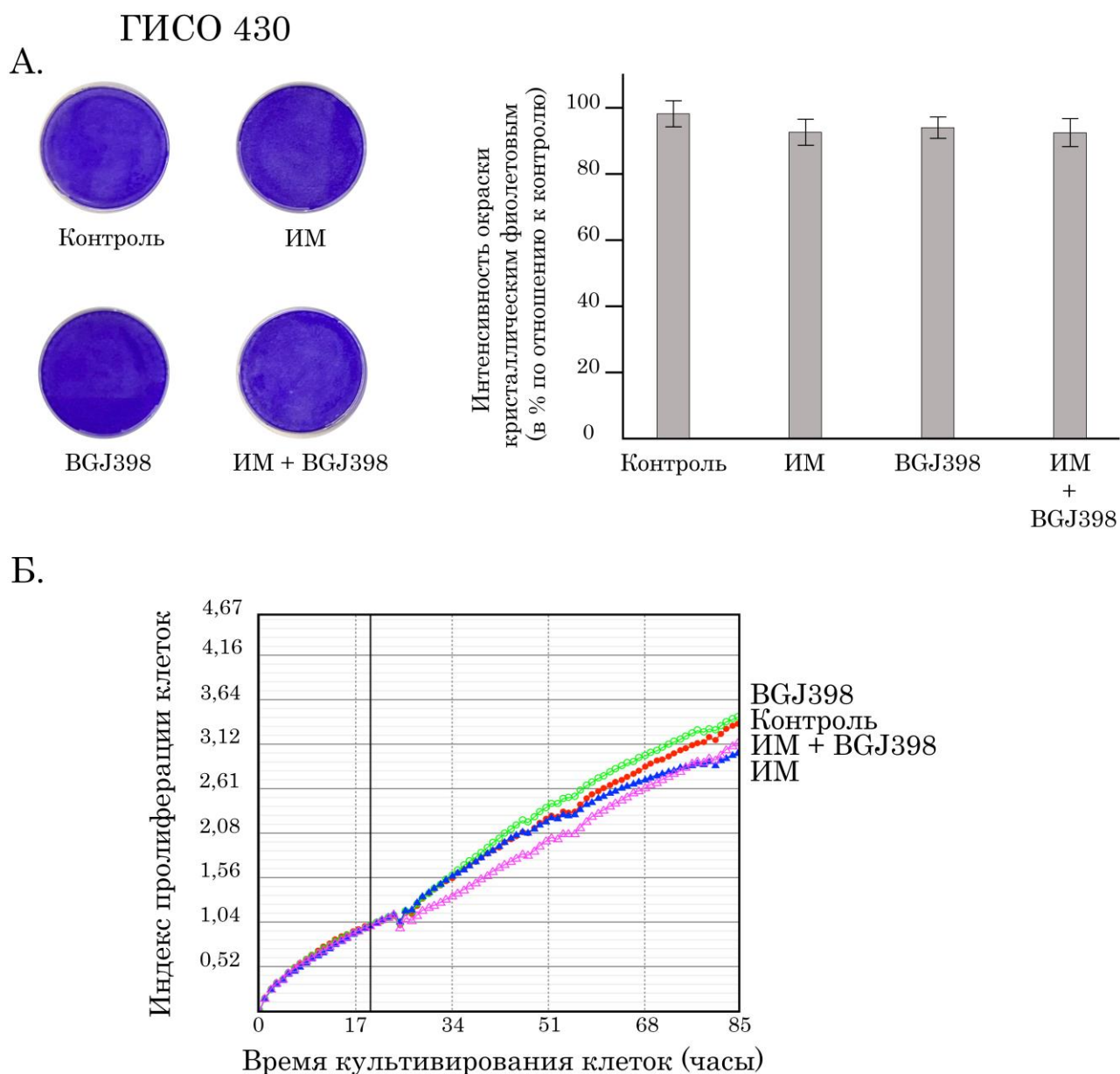


Рисунок 36 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430. Клетки ГИСО 430 культивировали в течение 85 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – окраска чашек Петри с клетками ГИСО 430 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО 430 с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США).

В присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО 430 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 85-90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 36А). В присутствии ИМ не отмечалось снижения пролиферативной активности клеток ГИСО 430, что подтверждает резистентность клеток к данному таргетному препарату (Рисунок 36Б). В присутствии препарата BGJ398 в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО 430 также наблюдалась высокая интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым (85-90% от контроля), что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 36А). Кроме того, препарат BGJ398 не вызывал снижения пролиферативной активности клеток ГИСО 430 (Рисунок 36Б).

При использовании комбинации препаратов (ИМ + BGJ398) в чашках Петри с клетками ГИСО 430 также наблюдалась высокая интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым (85-90% от контроля), что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 36А). Кроме того, в присутствии комбинации препаратов (ИМ + BGJ398) не возникало снижения пролиферативной активности клеток ГИСО 430 (Рисунок 36Б). Таким образом, комбинация препаратов ИМ и BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) не оказывала цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении клеток ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*.

Далее исследовался вариант взаимодействия препаратов ИМ и BGJ398 при их совместном применении (аддитивное, синергитическое или антагонистическое взаимодействие). В таблице 9 продемонстрирован показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и BGJ398 в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430, который был определен с помощью компьютерной программы Synergy Finder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html>), дата обращения 12.05.2025).

Таблица 9 – Показатель синергизма комбинации препаратов
ИМ и BGJ398 для клеточной линии ГИСО 430

Клеточная линия	Показатель синергизма ИМ + BGJ			
	ZIP	Bliss	Loewe	HSA
ГИСО 430	- 0,78	- 0,94	- 4,88	- 0,37

Примечание - Клетки ГИСО 430 культивировали в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 в течение 72 часов. Концентрации препаратов: ИМ (0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л; 4 мкмоль/л), BGJ398 (0,125 мкмоль/л; 0,25 мкмоль/л; 0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л). Жизнеспособность клеток в присутствии препаратов оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста. На основании значений жизнеспособности клеток были вычислены показатели синергизма (ZIP, Bliss, Loewe, HSA), представленные в таблице. Интерпретация показателей синергизма: > 10 (синергетическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < -10 (антагонистическое взаимодействие).

Полученные результаты свидетельствуют, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма ИМ и BGJ398 имел отрицательные значения (Таблица 9). Следовательно, между препаратами ИМ и BGJ398 при их комбинированном использовании в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430 отсутствовал синергетический вариант взаимодействия. Между препаратами ИМ и BGJ398 отмечалось аддитивное взаимодействие, при котором комбинированный эффект препаратов равен сумме эффектов этих препаратов, действующих независимо друг от друга. Поскольку ИМ и BGJ398 действуя по отдельности не оказывали цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430, то при комбинированном использовании препаратов (ИМ + BGJ398) указанные эффекты также отсутствовали.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что 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 (наличие коиммунопреципитации рецепторов и высокая степень их ко-локализации).

При отдельном ингибировании с-KIT-сигнального пути или FGFR-сигнального пути отсутствовала гибель опухолевых клеток ГИСО T1-IM-R. Напротив, одновременное ингибирование с-KIT-сигнального пути и FGFR-сигнального пути за счет использования комбинации таргетного препарата ИМ (ингибитор с-KIT) с селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) оказывало цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Развитие указанных эффектов было обусловлено синергетическим взаимодействием ИМ и ингибиторов FGFR-сигналинга, что явилось следствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R. Следовательно, селективные ингибиторы рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) способствовали восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетному препарату ИМ. Кроме того, было обнаружено, что препарат U0126, являясь селективным ингибитором MAPK-киназы, также способствовал восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетному препарату ИМ. Следовательно, активация MAPK-киназы является ключевым механизмом, обеспечивающим пролиферацию ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*.

Полученные результаты свидетельствуют, что в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаружилось структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 (отсутствие коиммунопреципитации рецепторов и низкая степень их ко-локализации). При отдельном ингибировании с-KIT-сигнального пути или FGFR-сигнального пути отсутствовала гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО 430.

Комбинация препаратов ИМ и BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) также не оказывала цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430. Между препаратами ИМ и BGJ398 не наблюдалось синергетического взаимодействия, что было обусловлено отсутствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами c-KIT, FGFR1 и FGFR2 в клетках ГИСО 430.

3.4 Механизмы активации FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных ГИСО со сниженной экспрессией *KIT* и их чувствительность к ингибиторам FGFR-рецепторов

3.4.1 Фенотипические признаки *KIT*-негативной ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО

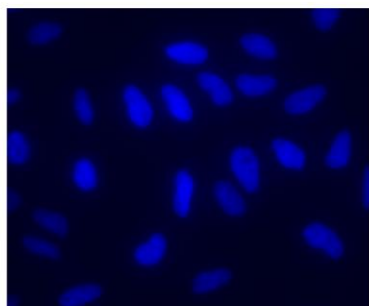
Выше было продемонстрировано, что в клетках ГИСО T1-IM-R, обладающих вторичной резистентностью к ИМ, отмечается сниженная экспрессия фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора c-KIT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (см. Рисунок 8, 10). Для подтверждения данных результатов была проведена иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназного рецептора c-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (Рисунок 37).

Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии свидетельствуют, что в популяции ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R присутствуют клетки с различным уровнем экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT: 1) Клетки с высокой экспрессией c-KIT составляли 65% популяции; 2) Клетки со сниженной экспрессией c-KIT составляли 25% популяции; 3) Клетки, у которых экспрессии c-KIT отсутствовала (т.е. c-KIT-негативные клетки) составляли 15% популяции.

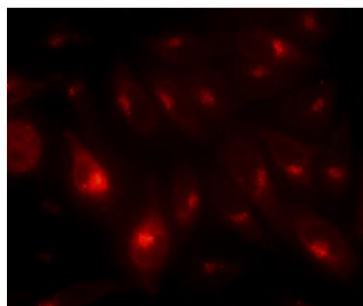
ГИСО T1-IM-R

А.

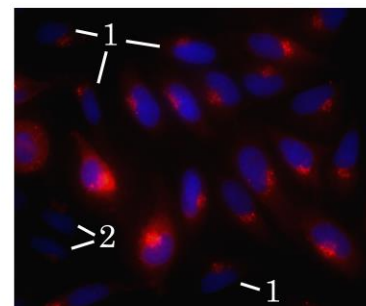
DAPI



c-KIT



DAPI/c-KIT



1 - Клетки со сниженной экспрессией c-KIT

2 - Клетки с отсутствующей экспрессией c-KIT

Б.

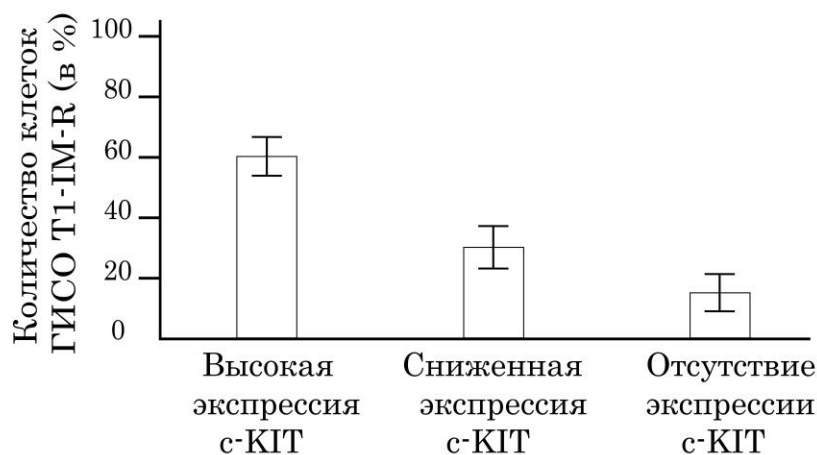


Рисунок 37 – Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназного рецептора c-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов. А – Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназного рецептора c-KIT (красное свечение) при увеличении 40х. Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI. Б – Количественный анализ экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT.

Таким образом, ИМ-резистентные клетки ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из клонов опухолевых клеток, имеющих различный уровень экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT. На основании полученных результатов было принято решение провести клонирование ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R с целью получения *KIT*-негативной клеточной линии ГИСО. Для клонирования ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R применялся метод серийных разведений [207].

Через 6 месяцев экспериментов с клонами ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R была получена *KIT*-негативная клеточная линия ГИСО, обозначенная ГИСО T1-IM-R-2 [233]. Клетки ГИСО T1-IM-R-2 имели веретеновидную форму и морфологически не отличались от клеток ГИСО T1-IM-R (Рисунок 38А). 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 (Рисунок 38Б-В). Кроме того, методом ПЦР было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2 отсутствует экспрессия *KIT* (Рисунок 38Г).

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2, в отличие от клеток ГИСО T1-IM-R, отсутствует свечение тирозинкиназного рецептора с-KIT (Рисунок 39А-Б). Методом проточной цитометрии было обнаружено отсутствие экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R-2 (Рисунок 39В).

Таким образом, на основании полученных результатов, можно сделать вывод о том, что из клеточной линии ГИСО T1-IM-R была получена *KIT*-негативная клеточная линия ГИСО T1-IM-R-2.

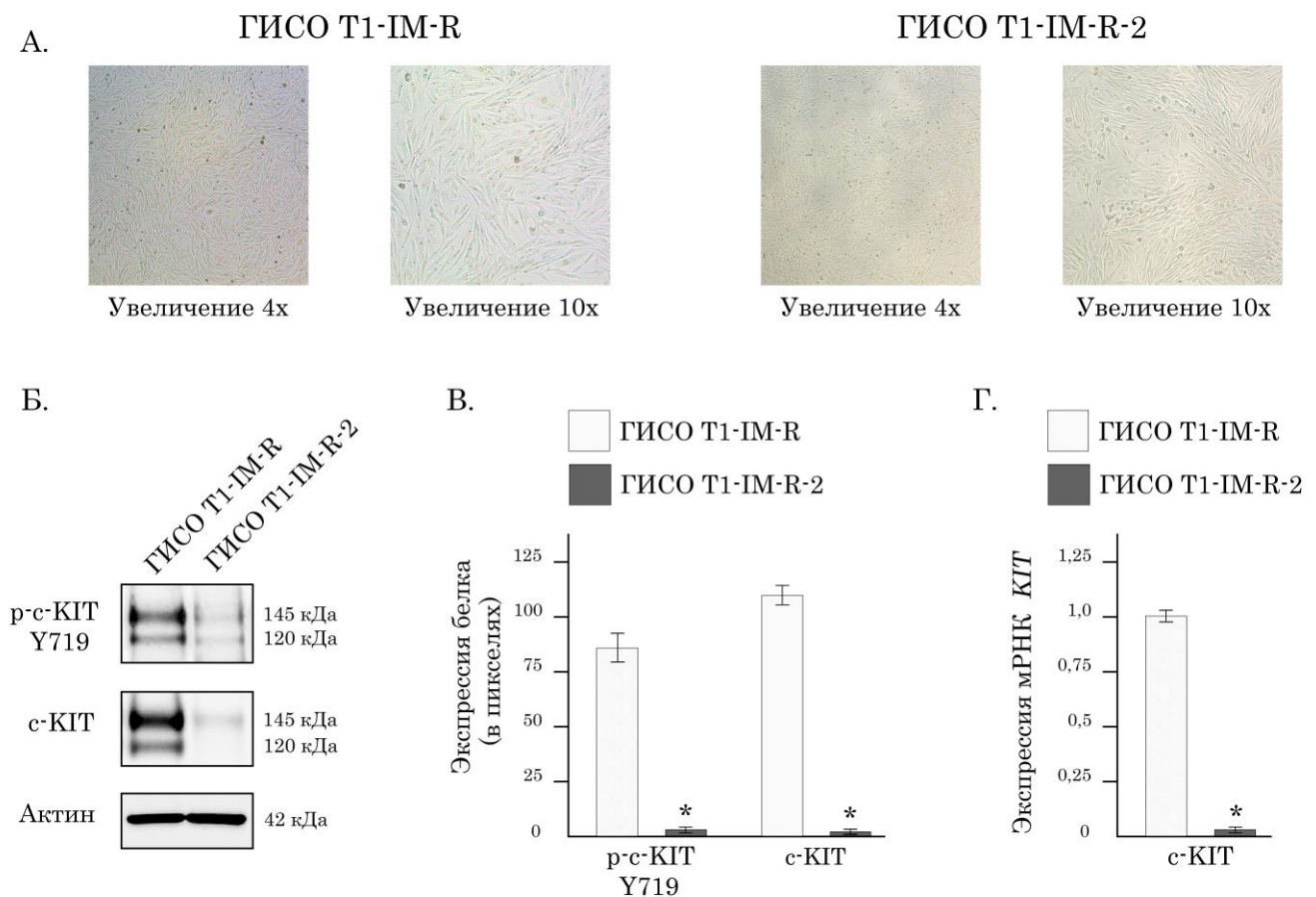


Рисунок 38 – Экспрессия тирозинкиназного рецептора c-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2. Клетки ГИСО культивировались в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контрольные образцы). А – Световая микроскопия клеток ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 при увеличении 4х и 10х; Б – Исследование экспрессии фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора c-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 методом иммуноблотинга; Актин отражает уровень белка в образцах; В – Количественный анализ экспрессии фосфорилированной и общей формы c-KIT в пикселях (денситометрия), * - $p < 0,001$; Г – Оценка экспрессии *KIT* в клетках ГИСО методом ПЦР. Амплификации *GAPDH* использовалась в качестве контроля. * - $p < 0,001$.

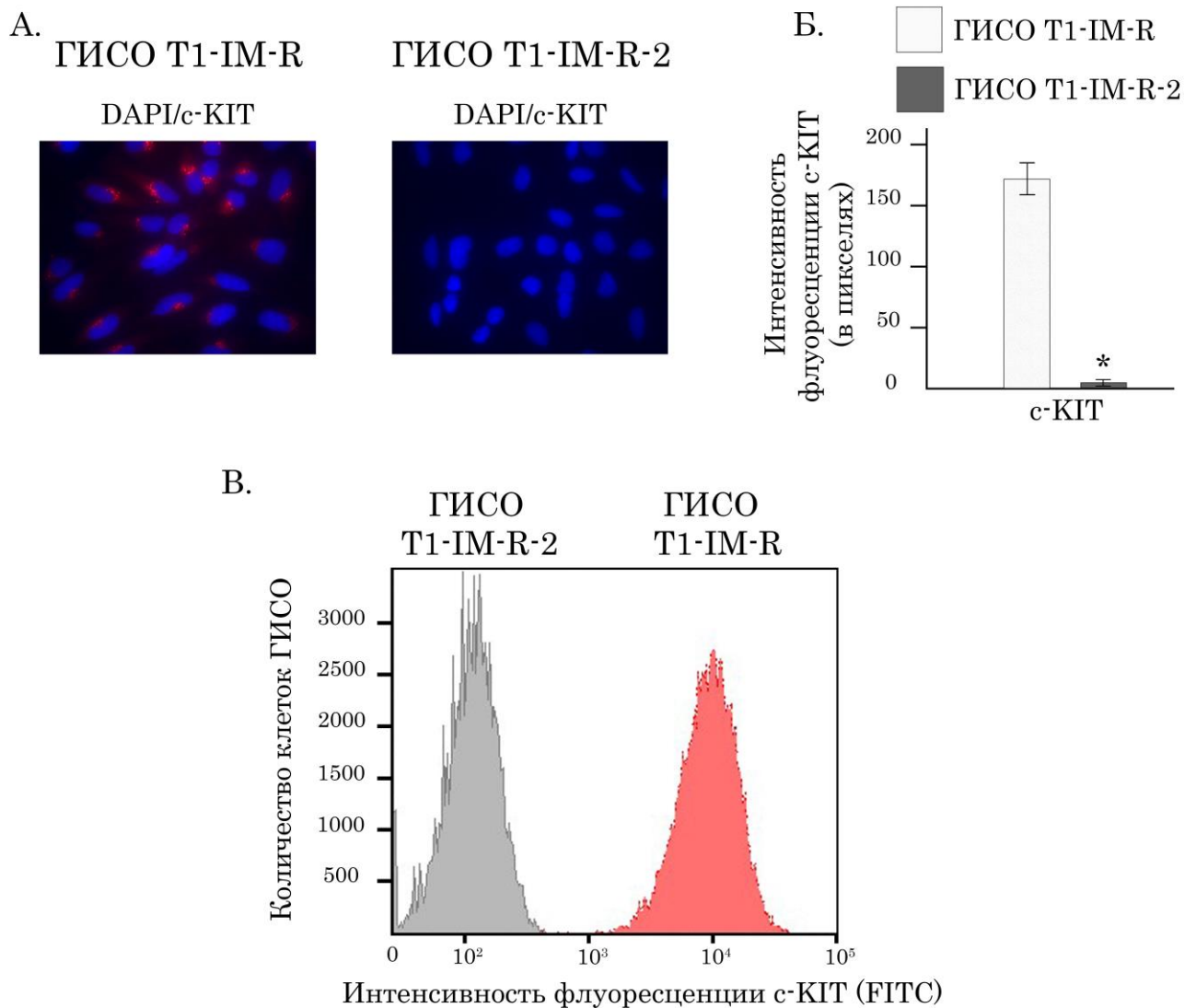


Рисунок 39 – Исследование экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 методом иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Клетки ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 культивировались в течение 72 часов в отсутствии препаратов. А – Иммунофлуоресцентная микроскопия (увеличение 40х) тирозинкиназного рецептора c-KIT (красное свечение). Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI; Б – Интенсивность флуоресценции c-KIT в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,001$; В – Исследование экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT в клетках ГИСО методом проточной цитометрии.

Поскольку клеточная линия ГИСО T1-IM-R обладает вторичной резистентностью к ИМ, то далее исследовалась способность ИМ ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R-2 (Рисунок 40).

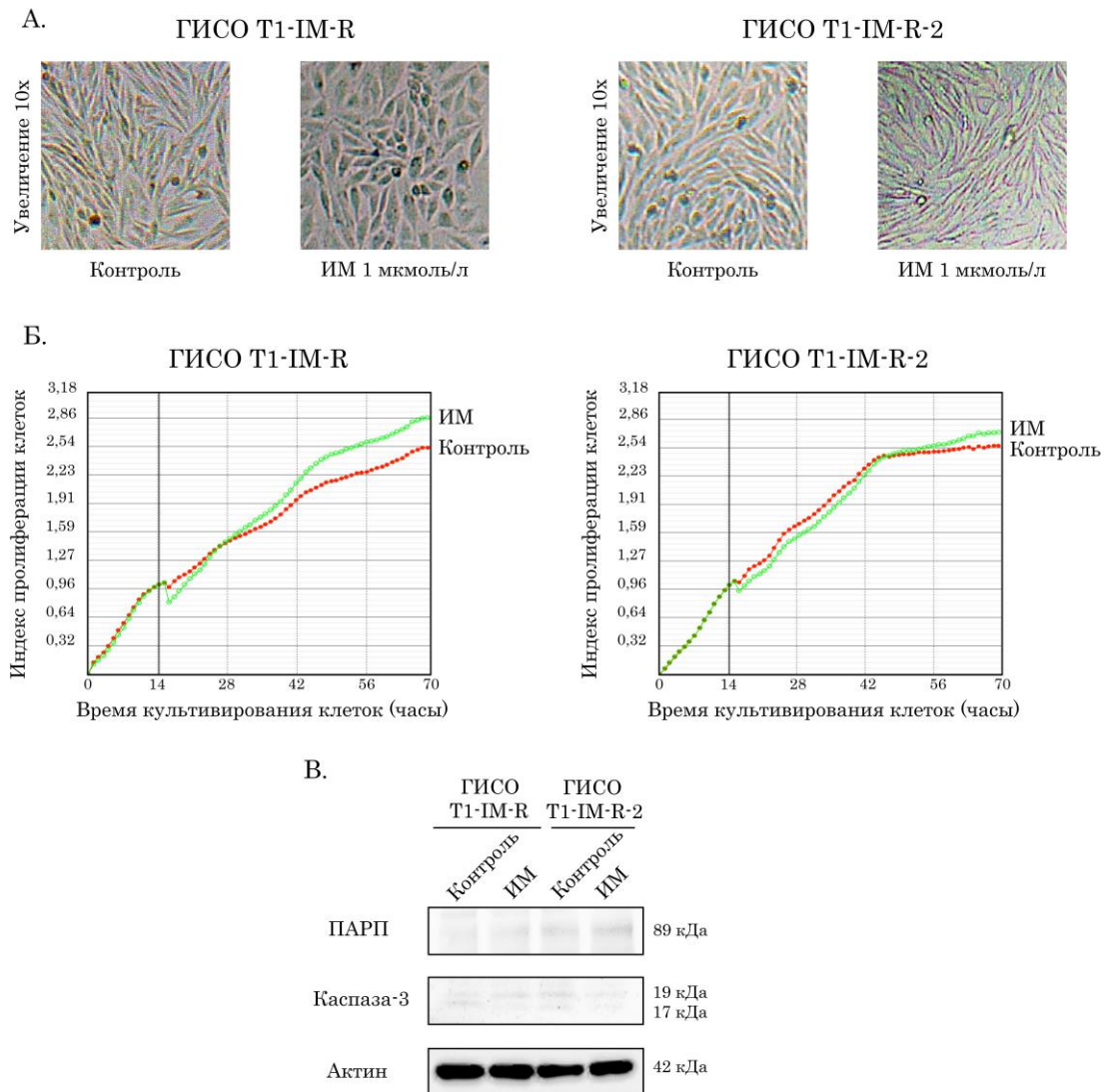


Рисунок 40 – Изучение цитотоксического и антипролиферативного эффекта ИМ в отношении клеток ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2. Клетки ГИСО культивировались 72 часа в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии ИМ (1 мкмоль/л). А – Световая микроскопия клеток ГИСО при увеличении 10х; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО в присутствии ИМ с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); В – Исследование апоптоза клеток ГИСО в присутствии ИМ методом иммуноблотинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах.

В присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л, сохранялась жизнеспособность опухолевых клеток ГИСО Т1-ИМ-R-2, что подтверждается высокой конfluenceностью клеток в присутствии препарата и отсутствием флотирующих (т.е. погибших) клеток (Рисунок 40А). Под влиянием ИМ в концентрации 1 мкмоль/л не нарушалась пролиферативная активность клеток ГИСО Т1-ИМ-R-2, что также является признаком резистентности опухолевых клеток к данному препарату (Рисунок 40Б). В присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л не возникала гибель клеток ГИСО Т1-ИМ-R-2, о чем свидетельствовало отсутствие экспрессии маркеров апоптоза – расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 (Рисунок 40В).

На основании результатов колориметрического МТТ-теста были определена эффективная концентрация ИМ, вызывающая 50% ингибирование выживаемости (IC_{50}) клеток ГИСО Т1-ИМ-R-2 (Таблица 10). Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R-2 составило $17,8 \pm 0,8$ мкмоль/л, что в 445 раз превышает значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО Т1 ($0,04 \pm 0,0003$ мкмоль/л). В тоже время, значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R ($47,1 \pm 1,3$ мкмоль/л) в 2,65 раза превышает значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R-2 (Таблица 10).

Таблица 10 – Показатели IC_{50} ИМ для клеточных линий
ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R, ГИСО Т1-ИМ-R-2

Показатель	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО Т1-ИМ-R-2
IC_{50} иматиниба, мкмоль/л	$0,04 \pm 0,0003$	$47,1 \pm 1,3$	$17,8 \pm 0,8$
Кратность увеличения IC_{50} иматиниба относительно ГИСО Т1		1 177,5	445
Кратность увеличения IC_{50} иматиниба относительно ГИСО Т1-ИМ-R-2		2,65	

Примечание - Клетки ГИСО культивировали в присутствии ИМ в течение 72 часов. Полученные результаты представлены в виде ср. арифм. $\pm$ станд. ош.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о наличии резистентности к ИМ у опухолевых клеток *KIT*-негативной линии ГИСО T1-IM-R-2. Подобно клеткам ГИСО T1-IM-R, имеющим вторичную (приобретенную) резистентность к ИМ, клетки ГИСО T1-IM-R-2 сохраняют жизнеспособность в присутствии ИМ, таргетный препарат не вызывает их апоптоз. Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2 незначительно отличается от значения IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R и более чем в 400 раз превышает значение IC_{50} ИМ для ИМ-чувствительной клеточной линии ГИСО T1.

Поскольку в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалась активация FGFR-сигнального пути, то далее исследовались маркеры указанного сигнального пути в *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-IM-R-2.

3.4.2 Исследование активации FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентной *KIT*-негативной клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2

Продemonстрировано, что в *KIT*-негативной ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2 отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1 и FGFR2 по сравнению с ИМ-резистентной клеточной линией ГИСО T1-IM-R (Рисунок 41А-В). Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R-2 по сравнению с ИМ-резистентными клетками ГИСО T1-IM-R отмечалась повышенная экспрессия фосфорилированной формы белка FRS-2 (pFRS-2) – мембранного адаптерного протеина [55, 91, 95], передающего сигнал от рецепторов фактора роста фибробластов к нижележащим цитоплазматическим белкам (Рисунок 41А-В). Было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2 по сравнению с клетками ГИСО T1-IM-R отмечалась повышенная экспрессия фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF-2) – лиганда рецепторов FGFR1-4 [55, 91, 95]. Следует отметить, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2 по сравнению с клетками ГИСО T1-IM-R отмечалась повышенная экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2* (Рисунок 41Г).

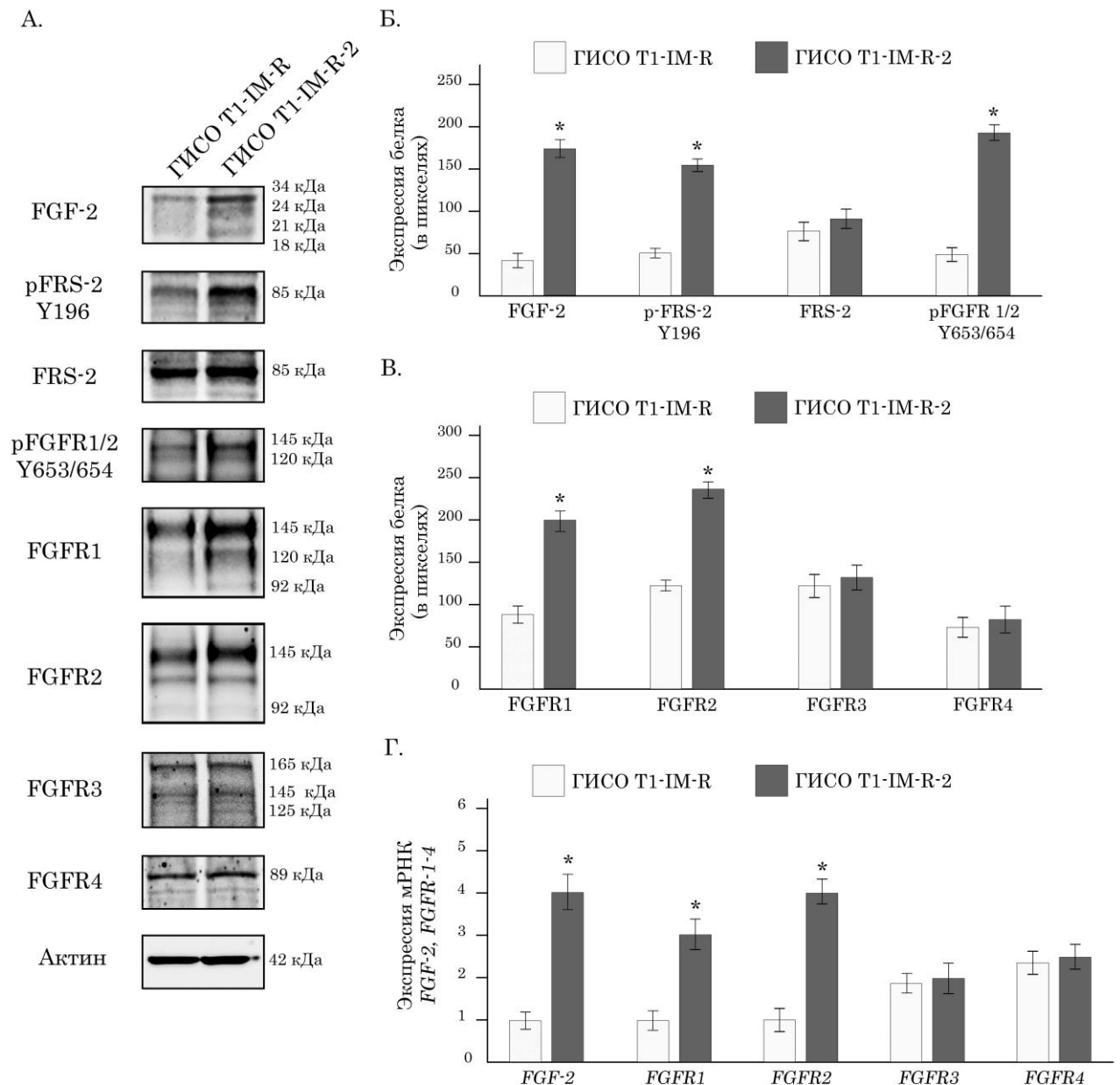


Рисунок 41 – Активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов. А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков FGFR-сигнального пути (FGF-2, FRS-2, FGFR1-4) методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$; Г – Оценка экспрессии *FGF-2*, *FGFR1-4* в клетках ГИСО методом ПЦР. Амплификация *GAPDH* использовалась в качестве контроля; * - $p < 0,05$.

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии было обнаружено, что в ИМ-резистентных *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-IM-R-2, в отличие от клеток ГИСО T1-IM-R отмечается значимое увеличение свечения FGF-2 лиганда и его рецепторов FGFR1 и FGFR2 (Рисунок 42А-Б).

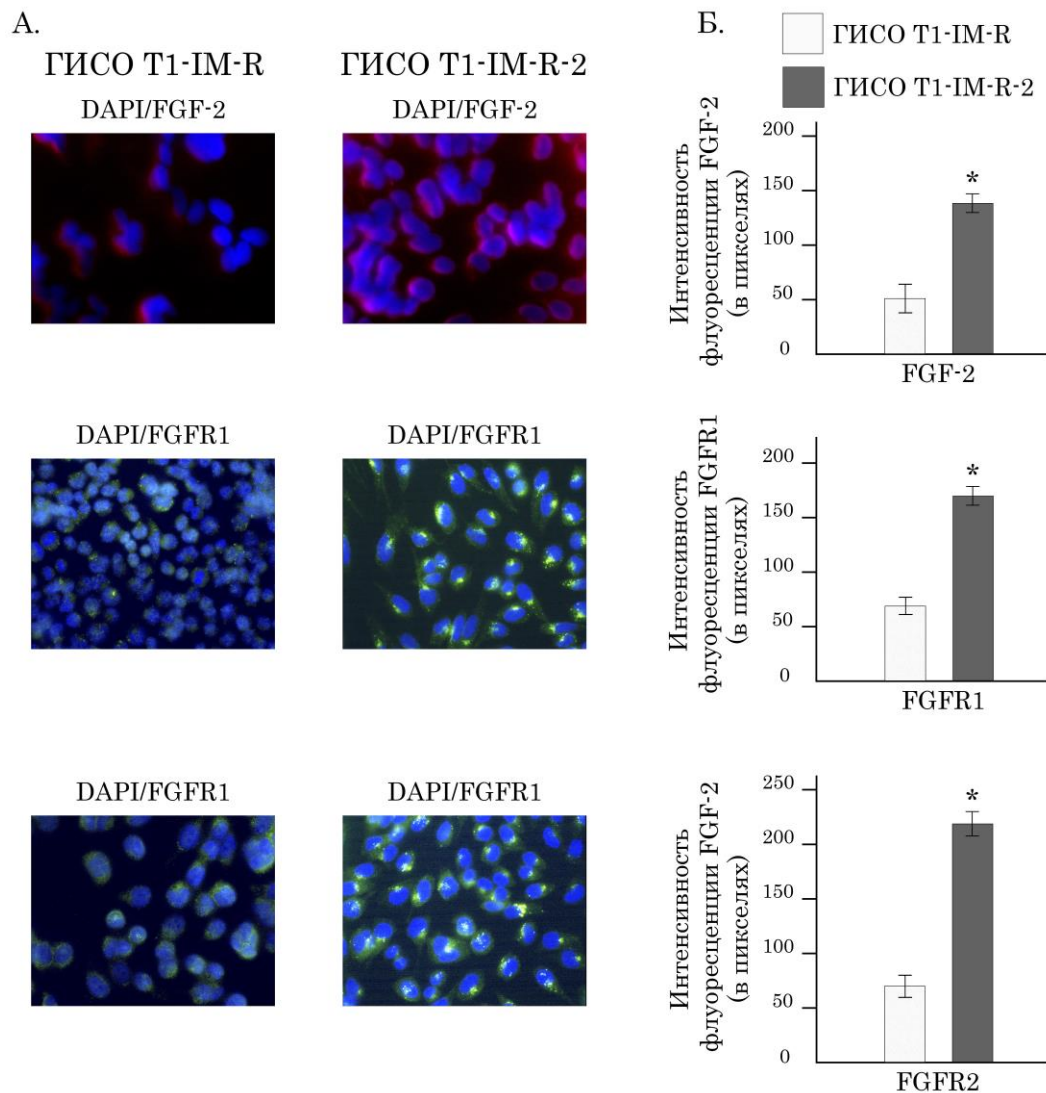


Рисунок 42 – Исследование экспрессии маркеров FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Клетки ГИСО культивировались в течение 72 часов в отсутствии препаратов. А – Иммунофлуоресцентная микроскопия (увеличение 40х) FGF-2 лиганда (красное свечение) и его рецепторов FGFR1 и FGFR2 (зеленое свечение) в клетках ГИСО. Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI; Б – Интенсивность флуоресценции FGF-2, FGFR1, FGFR2 в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$;

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что в ИМ-резистентных *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-IM-R-2 отмечается значимое увеличение активации FGFR-сигнального пути по сравнению ИМ-резистентными клетками ГИСО T1-IM-R, в которых присутствует экспрессия *KIT*.

Поэтому далее исследовалась способность селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) индуцировать цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2.

3.4.3 Изучение способности селективных ингибиторов FGFR-рецепторов (BGJ398, AZD4547, TAS-120) оказывать цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентной *KIT*-негативной клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2.

Как и ожидалось, в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л сохранялась жизнеспособность ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2 (Рисунок 43). Под влиянием ИМ в клетках ГИСО T1-IM-R-2 не отмечалось значимого снижения экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Таргетный препарат ИМ не вызывал апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R, что подтверждается отсутствием экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 (Рисунок 43).

В тоже время, в присутствии препарата BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) в концентрации 1 мкмоль/л отмечалась массовая гибель ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2 (Рисунок 43 А-В). Под влиянием BGJ398 (1 мкмоль/л) в клетках ГИСО T1-IM-R-2 значимо снижалась экспрессия фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности опухолевых клеток.

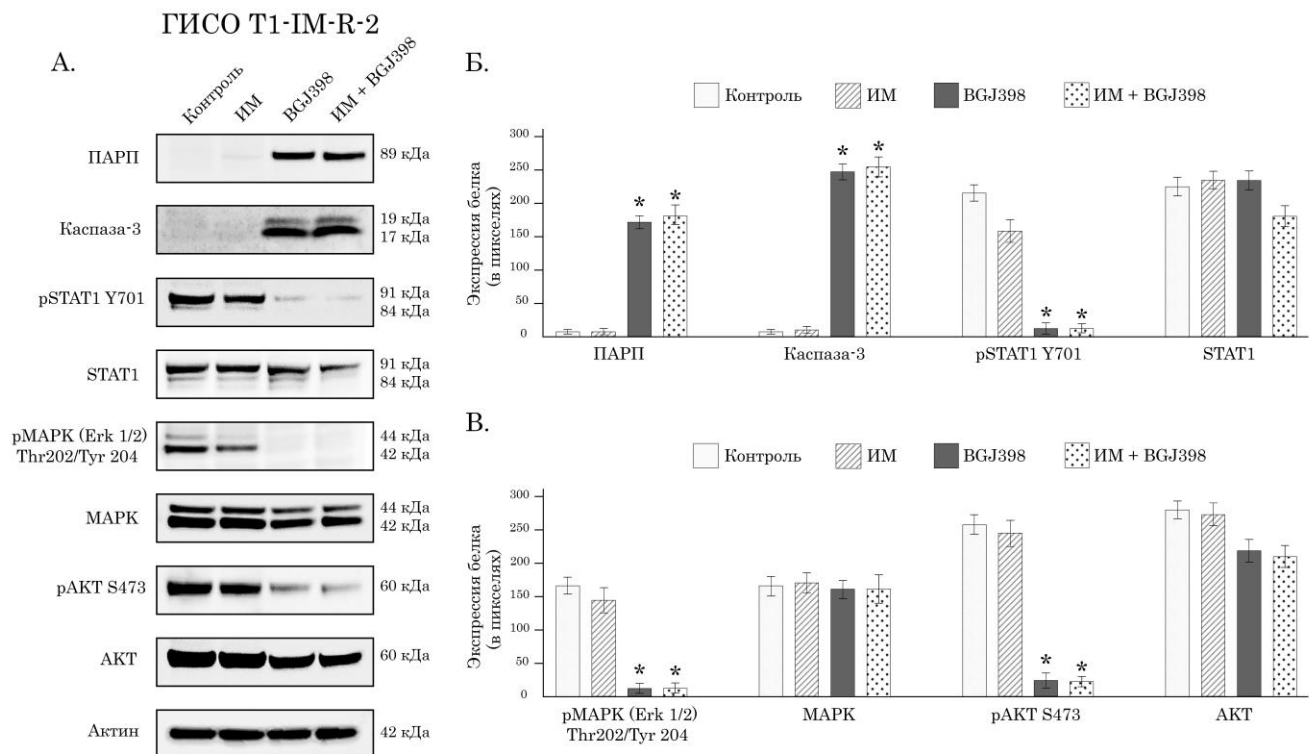


Рисунок 43 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2. Клетки ГИСО T1-IM-R-2 культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование экспрессии маркеров апоптоза и нерецепторных тирозинкиназ STAT1, МАРК, АКТ в клетках ГИСО T1-IM-R-2 методом иммуноблотинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

Таргетный препарат BGJ398 (1 мкмоль/л) индуцировал апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R-2, что подтверждается высокой экспрессией расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 (Рисунок 43А-В). Таким образом, препарат BGJ398

(селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) в концентрации 1 мкмоль/л оказывал цитотоксический эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2.

В присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) ожидаемо отмечалась массовая гибель ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 по механизму апоптоза (Рисунок 43А-В). Тем не менее, в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 в клетках ГИСО T1-ИМ-R-2 не отмечалось значимого увеличения экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3, по сравнению с одиночным использованием BGJ398. Следовательно, гибель по механизму апоптоза ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 в присутствии комбинации препаратов ИМ и BGJ398 была обусловлена только цитотоксическим эффектом BGJ398.

Полученные результаты подтверждаются исследованием пролиферации ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 в присутствии ИМ, BGJ398 и их комбинации (Рисунок 44). В присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с ИМ-резистентными *KIT*-негативными клетками ГИСО T1-ИМ-R-2 интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 85-90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 50А). В присутствии ИМ (1 мкмоль/л) не отмечалось снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-ИМ-R-2, что подтверждает резистентность клеток к данному таргетному препарату (Рисунок 44А).

Напротив, в присутствии препарата BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) отмечалось резкое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО T1-ИМ-R-2, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток (Рисунок 44А). Кроме того, препарат BGJ398 индуцировал резкое снижение пролиферативной активности ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 (Рисунок 44Б).

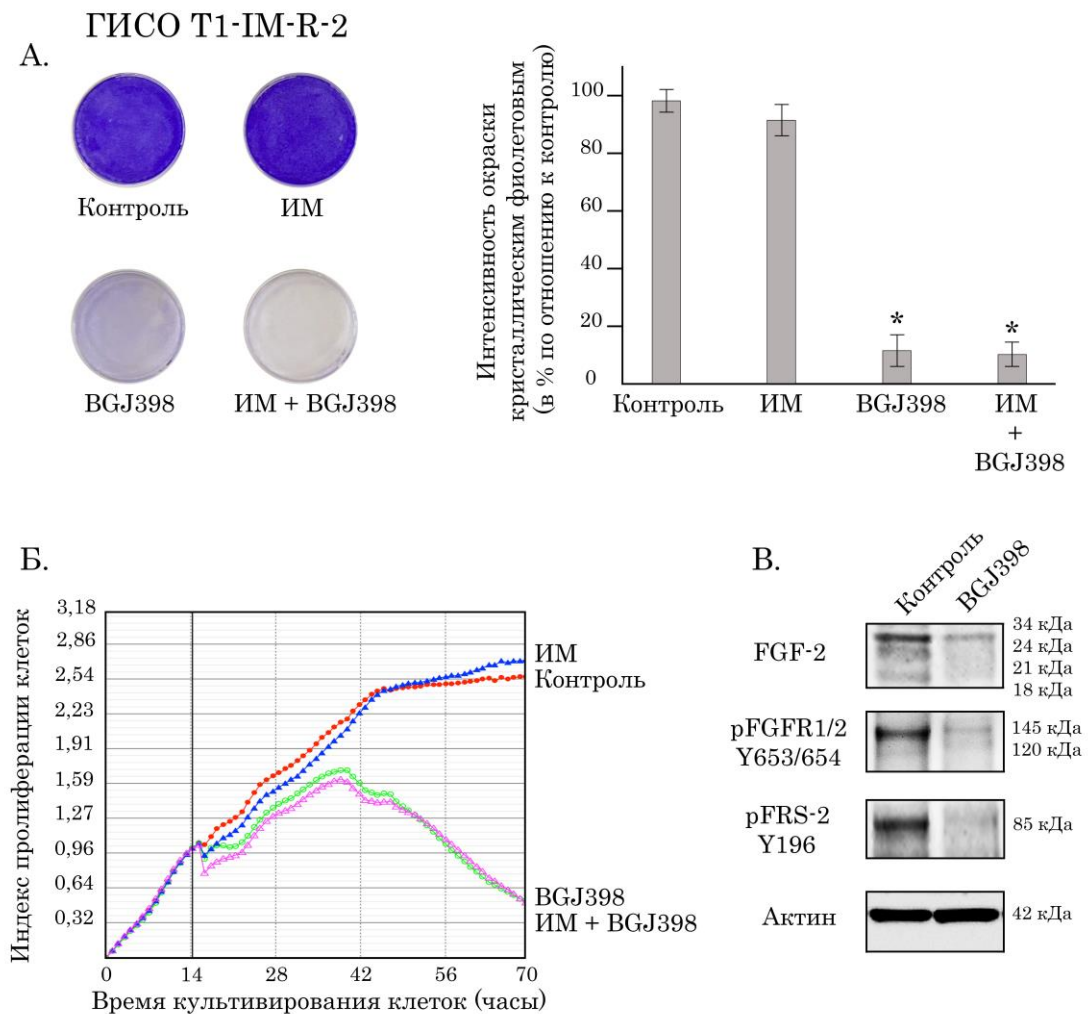


Рисунок 44 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2. Клетки ГИСО T1-IM-R-2 культивировали в течение 70 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R-2 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R-2 с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США); В – Оценка экспрессии белков FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1-IM-R-2 в присутствии BGJ398 методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах.

Таким образом, препарат BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) в концентрации 1 мкмоль/л оказывал антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2.

В присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) ожидаемо отмечалось значимое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R-2, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток (Рисунок 44А). Тем не менее, в присутствии комбинации ИМ и BGJ398 интенсивность окраски чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R-2 раствором кристаллического фиолетового составляла не более 20% от контроля, т.е. не отличалась от одиночного использования BGJ398.

В присутствии комбинации ИМ (1 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) ожидаемо отмечалось значимое снижения пролиферативной активности ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2, что также свидетельствует о гибели опухолевых клеток (Рисунок 44Б).

Тем не менее, наблюдаемый антипролиферативный эффект комбинации препаратов ИМ и BGJ398 в отношении клеток ГИСО T1-IM-R-2 не отличался от антипролиферативного эффекта BGJ398 при его одиночном использовании (Рисунок 44Б). Следовательно, нарушение пролиферации ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2 в присутствии комбинации препаратов ИМ и BGJ398 была обусловлена только эффектом BGJ398. Методом иммуноблоттинга было установлено, что под влиянием BGJ398 в клетках ГИСО T1-IM-R-2 подавлялась активация FGFR-сигнального пути, что подтверждалось отсутствием экспрессии FGF-2 лиганда, фосфорилированных форм его рецепторов FGFR1-2, адаптерного белка FRS-2 (Рисунок 44В).

Таким образом, цитотоксический и антипролиферативный эффект комбинации препаратов ИМ и BGJ398 в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2 был обусловлен только действием таргетного препарата BGJ398.

На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что препарат BGJ398, являясь селективным ингибитором рецепторов FGFR1-4, оказывал цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2. Апоптоз ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 под влиянием препарата BGJ398 был обусловлен ингибированием FGFR-сигнального пути. Следовательно, в клетках ГИСО в отсутствии экспрессии *KIT* ключевое значение для обеспечения выживаемости и пролиферации приобретает FGFR-сигнальный путь.

Далее изучалась способность других селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (препараты AZD4547 и TAS-120) индуцировать цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 (Рисунок 45).

В присутствии препарата AZD4547 (1 мкмоль/л) возникала массовая гибель ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2 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 (см. Рисунок 45А-В).

Аналогичным образом, в присутствии препарата TAS-120 (1 мкмоль/л) отмечался массовый апоптоз ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2, 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 (см. Рисунок 45А-В).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препараты AZD4547 и TAS-120, являясь селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффекты в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2.

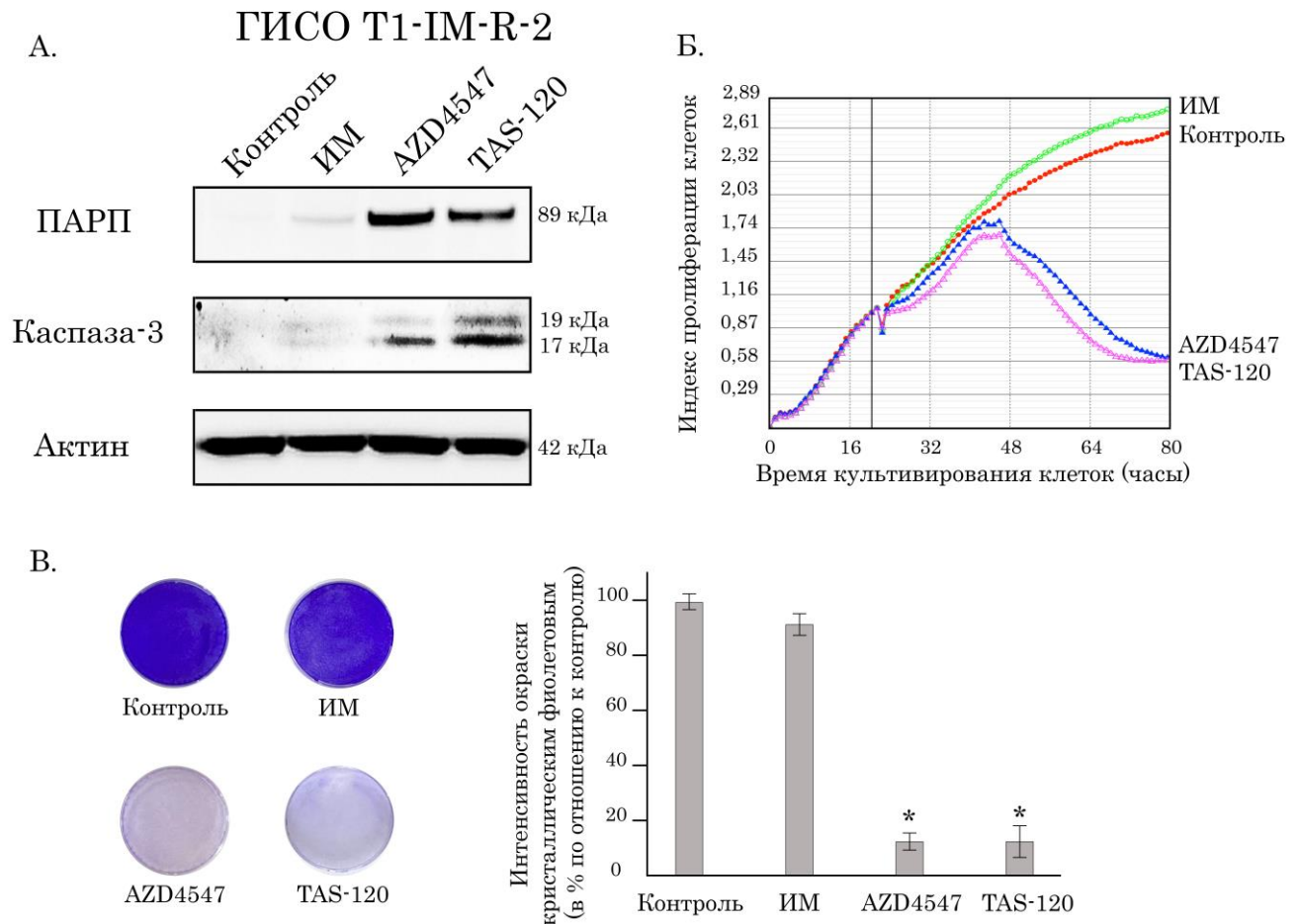


Рисунок 45 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ, AZD4547 и TAS-120 в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2. Клетки ГИСО T1-IM-R-2 культивировались в течение 80 часов отсутствии препаратов (контроль), в присутствии ИМ (1 мкмоль/л), AZD4547 (1 мкмоль/л), TAS-120 (1 мкмоль/л). А – Исследование апоптоза клеток ГИСО T1-IM-R-2 методом иммуноблоттинга. Маркеры апоптоза – расщепленные формы каспазы-3 и ПАРП; Актин отражает уровень белка в образцах; 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 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$.

На основании результатов колориметрического МТТ-теста были определены эффективные концентрации селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120), вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC₅₀) клеток ГИСО T1-IM-R и T1-IM-R-2 (Таблица 11).

Таблица 11 – Показатели IC₅₀ селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) для клеточных линий ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2

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

Примечание – Клетки ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 культивировали в присутствии препаратов (BGJ398, AZD4547, TAS-120) в течение 72 часов. Полученные результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. ош.

Значения IC₅₀ селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) для клеточной линии ГИСО T1-IM-R более чем 9000 раз превышали аналогичные значения IC₅₀ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2 (Таблица 11). Следовательно, ИМ-резистентные *KIT*-негативные клетки ГИСО T1-IM-R-2 обладают крайне высокой чувствительностью к селективным ингибиторам рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) вследствие гиперактивации FGFR-сигнального пути и отсутствия эксперсии с-KIT-сигнального пути.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что ИМ-резистентные клетки ГИСО T1-IM-R с отсутствующими

вторичными мутациями *KIT* представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из клонов опухолевых клеток, имеющих различный уровень экспрессии тирозинкиназного рецептора с-*KIT*. Из ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R была получена ИМ-резистентная *KIT*-негативная клеточная линия ГИСО T1-ИМ-R-2. Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R-2 незначительно отличалось от значения IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R и более чем в 400 раз превышало значение IC_{50} ИМ для ИМ-чувствительной клеточной линии ГИСО T1.

Было обнаружено, что в ИМ-резистентных *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-ИМ-R-2 отмечается значимое увеличение активации FGFR-сигнального пути по сравнению ИМ-резистентными клетками ГИСО T1-ИМ-R, в которых экспрессия *KIT* сохранена. В ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R-2 была обнаружена повышенная экспрессия FGF-2 лиганда, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1 и FGFR2, фосфорилированной формы белка FRS-2, а также повышенная экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2*.

Препараты BGJ398, AZD4547 и TAS-120, являясь селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-R-2. Апоптоз ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-ИМ-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-ИМ-R более чем 9000 раз превышали аналогичные значения IC_{50} для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R-2. Поскольку в клетках ГИСО T1-ИМ-R-2 отсутствует экспрессия *KIT*, то для индукции их апоптоза не требуется использования комбинации ИМ с селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, достаточно применение только самих селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4. На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, в отсутствии экспрессии *KIT* ключевое значение для обеспечения выживаемости и пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО приобретает FGFR-сигнальный путь.

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

3.5.1 Исследование чувствительности клеток ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути (сунитиниб, регорафениб)

Полученные результаты свидетельствуют, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 обнаруживалась активация VEGFR-сигнального пути, что подтверждалось значимым увеличением экспрессии фосфорилированных и общих форм рецепторов 1-го и 2-го типов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1 и VEGFR2) по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (см. Рисунок 8, Рисунок 11А-Б). Кроме того, на Рисунке 11Б продемонстрировано, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась повышенная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) – лиганда рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 [162, 212, 235, 240]. Следовательно, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечались признаки аутокринной активации VEGFR-сигнального пути: высокая экспрессия лиганда VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2.

Для подтверждения данной гипотезы была исследована экспрессия гена *VEGF-A* лиганда и генов его рецепторов *VEGFR1-3* в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 и ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430, а также изучена концентрация VEGF-A лиганда в супернатантах указанных клеточных культур (Рисунок 46). В ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 было обнаружено значимое повышение экспрессии *VEGF-A* лиганда и генов его рецепторов *VEGFR1* и *VEGFR2* по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1 (Рисунок 46А). В ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось увеличение экспрессии *VEGF-A* в 15 раз, *VEGFR1* в 23 раза, *VEGFR2* в 27 раз по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1.

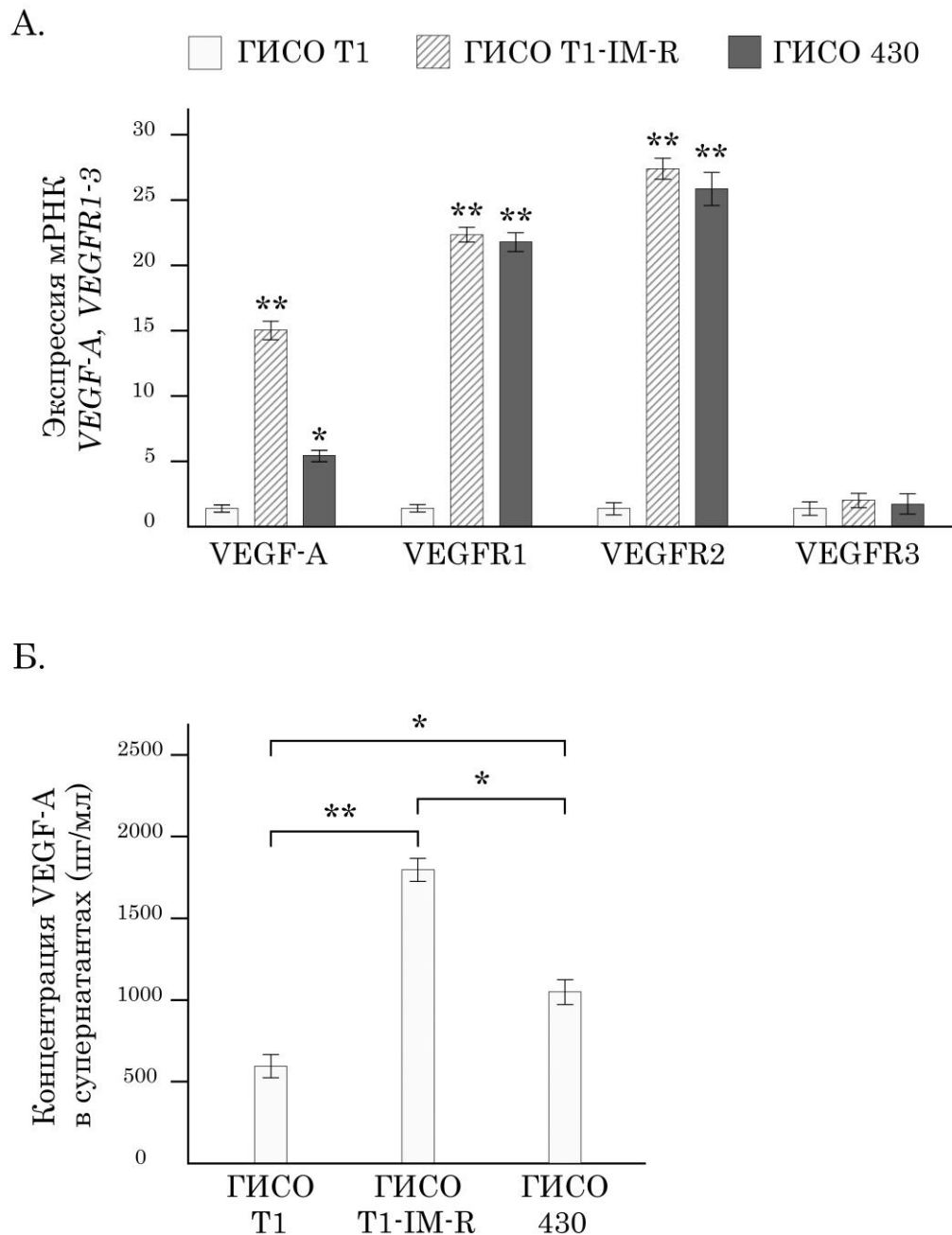


Рисунок 46 – Изучение экспрессии *VEGF-A*, *VEGFR1-3* в клетках ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430, а также концентрация *VEGF-A* лиганда в супернатантах указанных клеточных культур. Клетки ГИСО культивировали в отсутствии препаратов в течение 96 часов. А – Оценка экспрессии *VEGF-A*, *VEGFR1-3* в клетках ГИСО методом ПЦР. Амплификация *GAPDH* использовалась в качестве контроля; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; Б – Концентрация *VEGF-A* (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО, измеренная методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

В ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 отмечалось увеличение экспрессии *VEGF-A* в 6 раз, *VEGFR1* в 22 раза, *VEGFR2* в 25 раз по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1. Следует отметить, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* экспрессия *VEGF-A* была 2,5 раза выше по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентными к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 46А).

В супернатантах контрольных образцов ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 было обнаружено значимое повышение концентрации *VEGF-A* лиганда по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1 (Рисунок 46Б, Таблица 12). В супернатантах контрольных образцов ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R концентрация *VEGF-A* лиганда была увеличена в 3 раза по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1. В супернатантах контрольных образцов ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 концентрация *VEGF-A* лиганда была увеличена в 1,8 раза по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1. Следует отметить, что в супернатантах контрольных образцов клеток ГИСО Т1-ИМ-R, обладающих вторичной резистентностью к ИМ, отмечалась значимо более высокая концентрация *VEGF-A* лиганда (в 1,9 раза), по сравнению с клетками ГИСО 430, имеющими первичную резистентность к ИМ (Рисунок 46Б, Таблица 12).

Таблица 12 – Концентрация *VEGF-A* (пг/мл) в супернатантах клеточных линий ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R, ГИСО 430

Образец	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО 430
Контроль	620 ± 59,7	1863 ± 87,8	1047 ± 48,5

Примечание – Клетки ГИСО культивировали в отсутствии препаратов (контрольные образцы) в течение 96 часов. Результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. откл

Таким образом, активация VEGFR-сигнального пути была обнаружена в обеих ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО (ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430) и проявлялась повышением концентрации VEGF-А лиганда в супернатантах клеточных культур, увеличением экспрессии фосфорилированных и общих форм рецепторов VEGFR1 и VEGFR2, гиперэкспрессией *VEGF-A*, *VEGFR1* и *VEGFR2*.

Поэтому далее исследовалась чувствительность ИМ-резистентных клеточных линий ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – Сунитинибу и Регорафенибу. Сунитиниб (СУ) и Регорафениб (РЕГО) – мультикиназные ингибиторы, мишенью которых являются рецепторы 1-го, 2-го и 3-го типов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1-3). Поэтому таргетные препараты СУ и РЕГО входят в группу ингибиторов VEGFR-сигнального пути. СУ дополнительно блокирует тирозинкиназные рецепторы: с-KIT, β -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), Fms-подобную рецепторную тирозинкиназу-3 (FLT-3), рецептор колониестимулирующего фактора 1-го типа (CSF-1R) и рецептор нейротрофического глиального фактора (RET) [109, 126, 188, 231]. В 2006г. СУ официально зарегистрирован в качестве препарата 2-й линии таргетной терапии ГИСО [22, 126, 144]. РЕГО помимо блокирования VEGFR-сигналинга ингибирует тирозинкиназные рецепторы с-KIT, β -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), рецептор нейротрофического глиального фактора (RET) и внутриклеточную киназа RAF-1 [109, 177, 188, 231]. РЕГО был зарегистрирован в качестве препарата 3-й линии таргетной терапии ГИСО в 2013 году [79].

На основании результатов колориметрического МТТ-теста были определены эффективные концентрации СУ и РЕГО, вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC₅₀) ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 и ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430 (Таблица 13).

Таблица 13 – Показатели IC₅₀ СУ и IC₅₀ РЕГО для клеточных линий ГИСО

Показатель	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО 430
IC ₅₀ СУ, мкмоль/л	0,016 ± 0,0001	5,2 ± 0,5	15,3 ± 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, мкмоль/л	0,029 ± 0,003	2,2 ± 0,3	14,8 ± 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

Примечание – Клетки ГИСО культивировали в присутствии сунитиниба или регорафениба в течение 72 часов. Полученные результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. ош.

Значение IC₅₀ СУ для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R составило 5,2 ± 0,5 мкмоль/л, что в 325 раз превышает значение IC₅₀ СУ для клеточной линии ГИСО Т1 (0,016 ± 0,0001 мкмоль/л). В тоже время, значение IC₅₀ СУ для клеточной линии ГИСО 430 (15,3 ± 2,4 мкмоль/л) в 956,2 раза превышает значение IC₅₀СУ для клеточной линии ГИСО Т1 (Таблица 13). Таким образом, ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 являются резистентными к таргетному препарату СУ.

Значение IC₅₀ РЕГО для клеточной линии ГИСО Т1-ИМ-R составило 2,2 ± 0,3 мкмоль/л, что в 76 раз превышает значение IC₅₀ СУ для клеточной линии ГИСО Т1 (0,029 ± 0,003 мкмоль/л). В тоже время, значение IC₅₀ 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 (Таблица 13). Следовательно, ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430 являются резистентными к таргетному препарату РЕГО.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430 обладают резистентностью к ингибиторам VEGFR-сигнального пути (СУ и РЕГО). Значения IC_{50} СУ и IC_{50} РЕГО для клеточных линий ГИСО Т1-ИМ-Р и ГИСО 430 значимо превышают аналогичные показатели для ИМ-чувствительной линии ГИСО Т1. Следовательно, у клеток ГИСО в процессе развития вторичной (приобретенной) резистентности к таргетному препарату ИМ сформировалась вторичная (приобретенная) резистентность к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО.

Выше было показано, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-Р отмечалась активация FGFR-сигнального пути за счет аутокринной продукции FGF-2 лиганда (см. Рисунок 8, 9, 17, 19). В присутствии FGF-2 лиганда снижалась цитотоксическая активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 (см. Рисунок 22). За счет активности FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1-ИМ-Р сформировалась вторичная (приобретенная) резистентность к таргетному препарату ИМ. Вероятно, за счет аутокринной продукции FGF-2 лиганда в клетках ГИСО происходила активация VEGFR-сигнального пути. Поэтому далее исследовалась способность FGF-2 лиганда индуцировать активацию VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО.

3.5.2 Изучение способности фактора роста фибробластов 2 типа (FGF-2) индуцировать активацию VEGFR-сигналинга в клетках ГИСО

FGF-2 лиганд не оказывал стимулирующего влияния на экспрессию фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы c-KIT в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 (Рисунок 47). В тоже время, FGF-2 в

концентрации 100 нг/мл индуцировал в клетках ГИСО Т1 повышение экспрессии маркеров VEGFR-сигнального пути: VEGF-A лиганда и фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (Рисунок 47 А-В). Вероятно, FGF-2 лиганд индуцирует в клетках ГИСО Т1 аутокринную продукцию VEGF-A лиганда, который в свою очередь способствует гиперэкспрессии рецепторов VEGFR1-2, что приводит к запуску VEGFR-сигнального пути в опухолевых клетках.

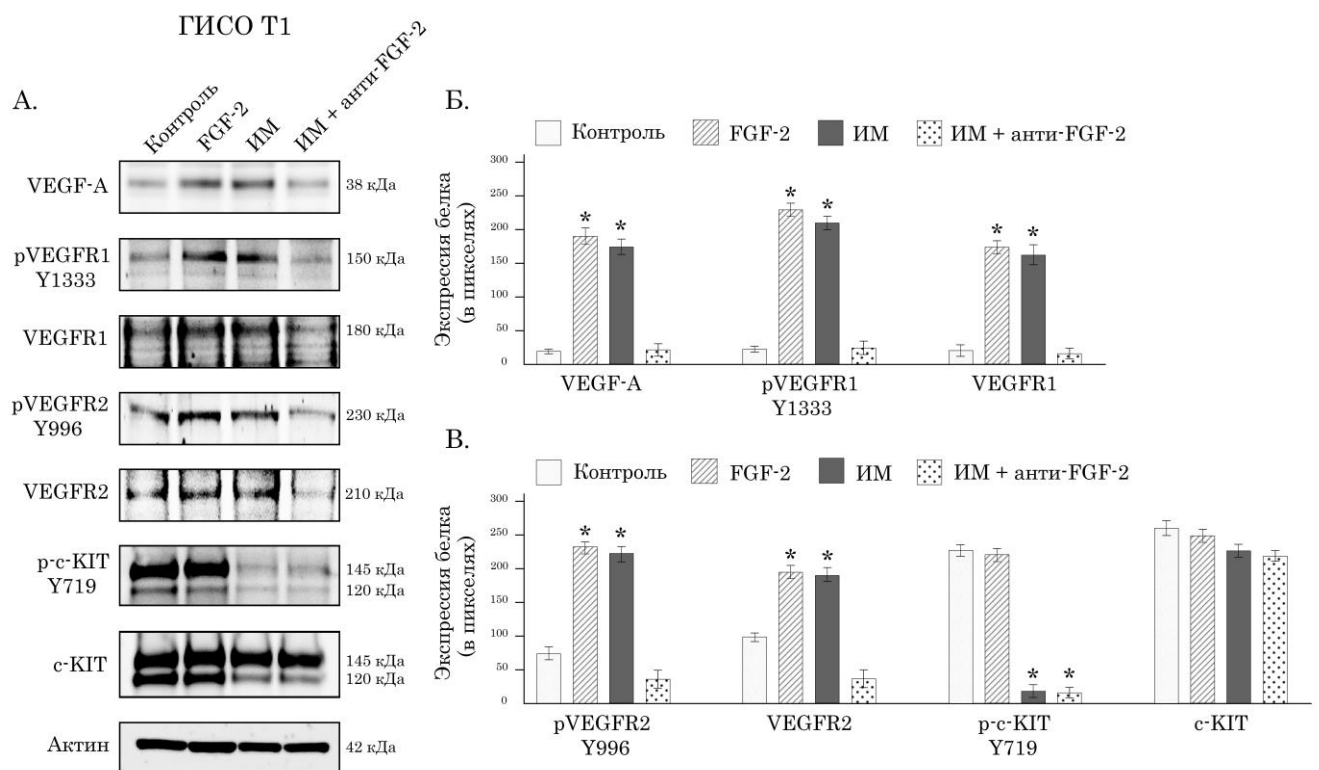


Рисунок 47 – Влияние FGF-2 и ИМ на экспрессию маркеров VEGFR- и c-KIT-сигнальных путей в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировались в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,02 мкмоль/л) и комбинации ИМ с анти-FGF-2 мАТ (20 мкг/мл). А – Оценка экспрессии VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм рецепторов VEGFR1-2, c-KIT методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В)

представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,01$.

Важно отметить, что в присутствии ИМ в субтоксической концентрации 0,02 мкмоль/л в клетках ГИСО Т1 было обнаружено повышение экспрессии VEGF-A лиганда, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2. Напротив, в присутствии комбинации ИМ с анти-FGF-2 мАТ в клетках ГИСО Т1 отмечалось значимое снижение экспрессии VEGF-A лиганда, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (Рисунок 47А-В).

Далее исследовалась способность FGF-2 лиганда индуцировать повышение концентрации VEGF-A лиганда в супернатантах клеток ГИСО Т1. В таблице 14 представлены концентрации VEGF-A лиганда в супернатантах клеток ГИСО Т1.

Таблица 14 – Концентрация VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО Т1

Образец	Контроль	FGF-2	ИМ	ИМ + анти-FGF-2 мАТ
VEGF-A	611 ± 49,2	3239 ± 67,7	1711 ± 54,4	675 ± 57,8

Примечание – Клетки ГИСО Т1 культивировали в течение 96 часов: в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,02 мкмоль/л) и комбинации ИМ с анти-FGF-2 мАТ (20 мкг/мл). Результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. откл.

Под влиянием FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в супернатантах клеток ГИСО Т1 через 96 часов инкубации отмечалось значимое повышение (в 5,3 раза) концентрации VEGF-A (Рисунок 48А). Важно отметить, что в присутствии ИМ в субтоксической концентрации 0,02 мкмоль/л в супернатантах клеток ГИСО Т1 через 96 часов инкубации также отмечалось значимое повышение (в 2,8 раза) концентрации VEGF-A (Рисунок 48А). Напротив, в присутствии комбинации ИМ

с анти-FGF-2 МАТ в супернатантах клеток ГИСО Т1 отмечалось значимое снижение VEGF-A лиганда (Рисунок 48А).

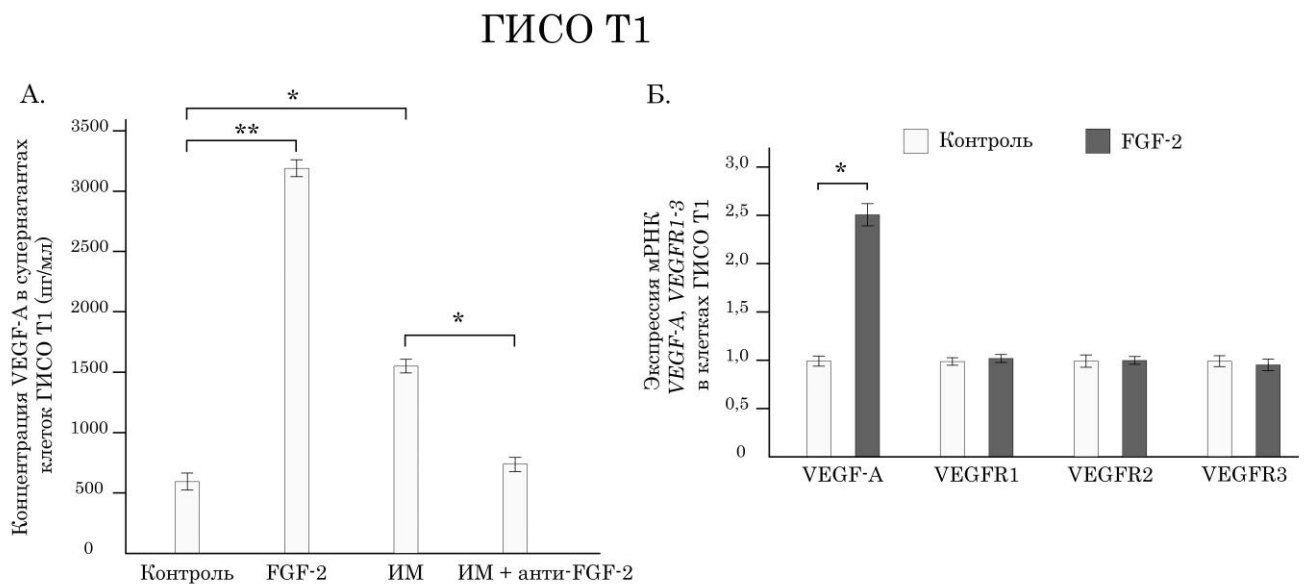


Рисунок 48 – Влияние FGF-2 лиганда на активацию VEGFR-сигнального пути в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1. Клетки ГИСО Т1 культивировались в течение 96 часов: в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии FGF-2 (100 нг/мл), ИМ (0,02 мкмоль/л) и комбинации ИМ с анти-FGF-2 МАТ (20 мкг/мл). А – оценка концентрации VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО Т1 в присутствии FGF-2 методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; Б – Оценка экспрессии VEGF-A, VEGFR1-3 в клетках ГИСО Т1 в присутствии FGF-2 методом ПЦР. Амплификация GAPDH использовалась в качестве контроля; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Далее исследовалась способность FGF-2 лиганда индуцировать повышение экспрессии VEGF-A и VEGFR1-3 в клетках ГИСО Т1 (Рисунок 48Б). Под влиянием FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в клетках значимо повышалась экспрессия VEGF-A (в 2, 5 раза). При этом в присутствии FGF-2 экспрессия VEGFR1-3 в клетках ГИСО Т1 не увеличивалась (Рисунок 48Б).

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что FGF-2 лиганд индуцировал в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 аутокринную продукцию VEGF-A лиганда. В свою очередь, VEGF-A лиганд способствовал гиперэкспрессии рецепторов VEGFR1-2 на мембране клеток ГИСО T1. Связывание VEGF-A лиганда с рецепторами VEGFR1-2 обеспечивало активацию VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1. Показано, что VEGF-A лиганд запускает в клетках сигнальные каскады (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), обеспечивающие их пролиферацию и выживаемость [162, 212]. Следовательно, в присутствии FGF-2 лиганда в клетках ГИСО T1 происходила активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, которые обеспечивали активацию внутриклеточных сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR). В результате возникала пролиферация клеток ГИСО T1.

Полученные результаты свидетельствуют, что таргетный препарат ИМ в субтоксической концентрации 0,02 мкмоль/л также индуцировал в клетках ГИСО T1 аутокринную продукцию VEGF-A лиганда. Выше было показано, что под влиянием субтоксической концентрации ИМ (0,02 мкмоль/л) в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 нарастала аутокринная продукция FGF-2 лиганда и повышалась экспрессия фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1 и FGFR2 (см. Рисунок 14, 15, 17). Следовательно, таргетный препарат ИМ индуцировал активацию VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1 за счет стимуляции аутокринной продукции FGF-2 лиганда опухолевыми клетками. Таким образом, активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1 развивается в процессе развития их вторичной (приобретенной) резистентности к ИМ с целью обеспечения пролиферации и выживаемости опухолевых клеток в присутствии таргетного препарата.

Далее исследовалась способность FGF-2 лиганда индуцировать повышение концентрации VEGF-A лиганда в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 (Рисунок 49А).

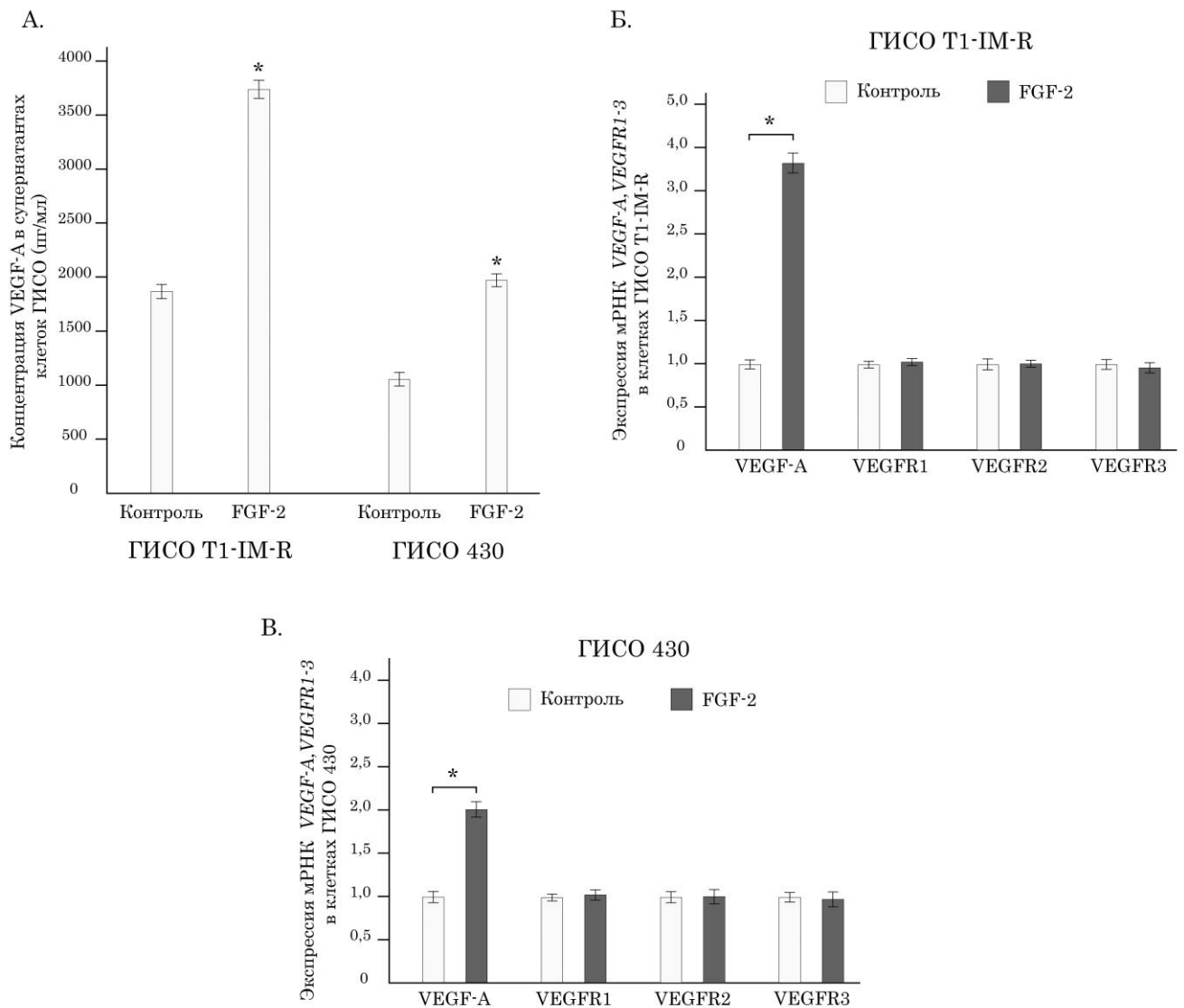


Рисунок 49 – Влияние FGF-2 лиганда на активацию VEGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 96 часов в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии FGF-2 (100 нг/мл). А – оценка концентрации VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в присутствии FGF-2 методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; Экспрессия VEGF-A, VEGFR1-3 в клетках ГИСО T1-IM-R (Б) и ГИСО 430 (В) в присутствии FGF-2 оценивалась методом ПЦР, амплификация GAPDH использовалась в качестве контроля; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

В присутствии FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R через 96 часов инкубации отмечалось значимое повышение (в 2 раза) концентрации VEGF-A (Рисунок 57А). Под влиянием FGF-2 (100 нг/мл) в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО 430 через 96 часов инкубации также отмечалось значимое повышение (в 1,9 раза) концентрации VEGF-A (Рисунок 49А).

Следует отметить, что под влиянием FGF-2 в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-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 49А). В таблице 15 представлены концентрации VEGF-A лиганда в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 при их культивировании в присутствии FGF-2.

Таблица 15 – Концентрация VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 при их культивировании в присутствии FGF-2

Образец	ГИСО T1-ИМ-R	ГИСО 430
Контроль	1850 ± 72,3	1024 ± 49,8
FGF-2	3725 ± 88,4	1973 ± 59,1

Примечание – Клетки ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 культивировали в течение 96 часов в отсутствии препаратов (контроль) и в присутствии FGF-2 (100 нг/мл). Результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. откл.

Далее исследовалась способность FGF-2 лиганда индуцировать повышение экспрессии *VEGF-A* и *VEGFR1-3* в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 (Рисунок 49Б-В).

Под влиянием FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R значимо повышалась экспрессия *VEGF-A* (в 3, 7 раза). При этом в присутствии FGF-2 экспрессия *VEGFR1-3* в клетках ГИСО T1-ИМ-R не увеличивалась (Рисунок 49Б). Под влиянием FGF-2 в концентрации 100 нг/мл в

ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 значительно повышалась экспрессия *VEGF-A* (в 2 раза). При этом в присутствии FGF-2 экспрессия *VEGFR1-3* в клетках ГИСО T1-ИМ-R не увеличивалась (Рисунок 49В). 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 57Б-В).

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что FGF-2 лиганд индуцировал аутокринную продукцию VEGF-A лиганда в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430. При этом FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A была значительно более выражена в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R. Следовательно, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечается аутокринная продукция FGF-2 лиганда и активация FGFR-сигнального пути, а также аутокринная продукция VEGF-A лиганда и активация VEGFR-сигнального пути. За счет FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО T1-ИМ-R отмечалась активация сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), которые поддерживали пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток в условиях ИМ-опосредованного ингибирования с-KIT-сигнального пути.

Поскольку таргентный препарат ИМ блокирует в клетках ГИСО T1 тирозинкиназный рецептор с-KIT, то далее исследовалась активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО в условиях нокдауна *KIT* с помощью киРНК *KIT* (Рисунок 50).

3.5.3 Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО в условиях нокдауна *KIT*

После трансфекции киРНК *KIT* в клетках ГИСО T1 полностью отсутствовала экспрессия фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора с-KIT, что свидетельствует о нокдауне *KIT* (Рисунок 50).

В условиях нокдауна *KIT*, как и в присутствии FGF-2 лиганда, в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 отмечалась активация VEGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии VEGF-A лиганда, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (Рисунок 50А-В).

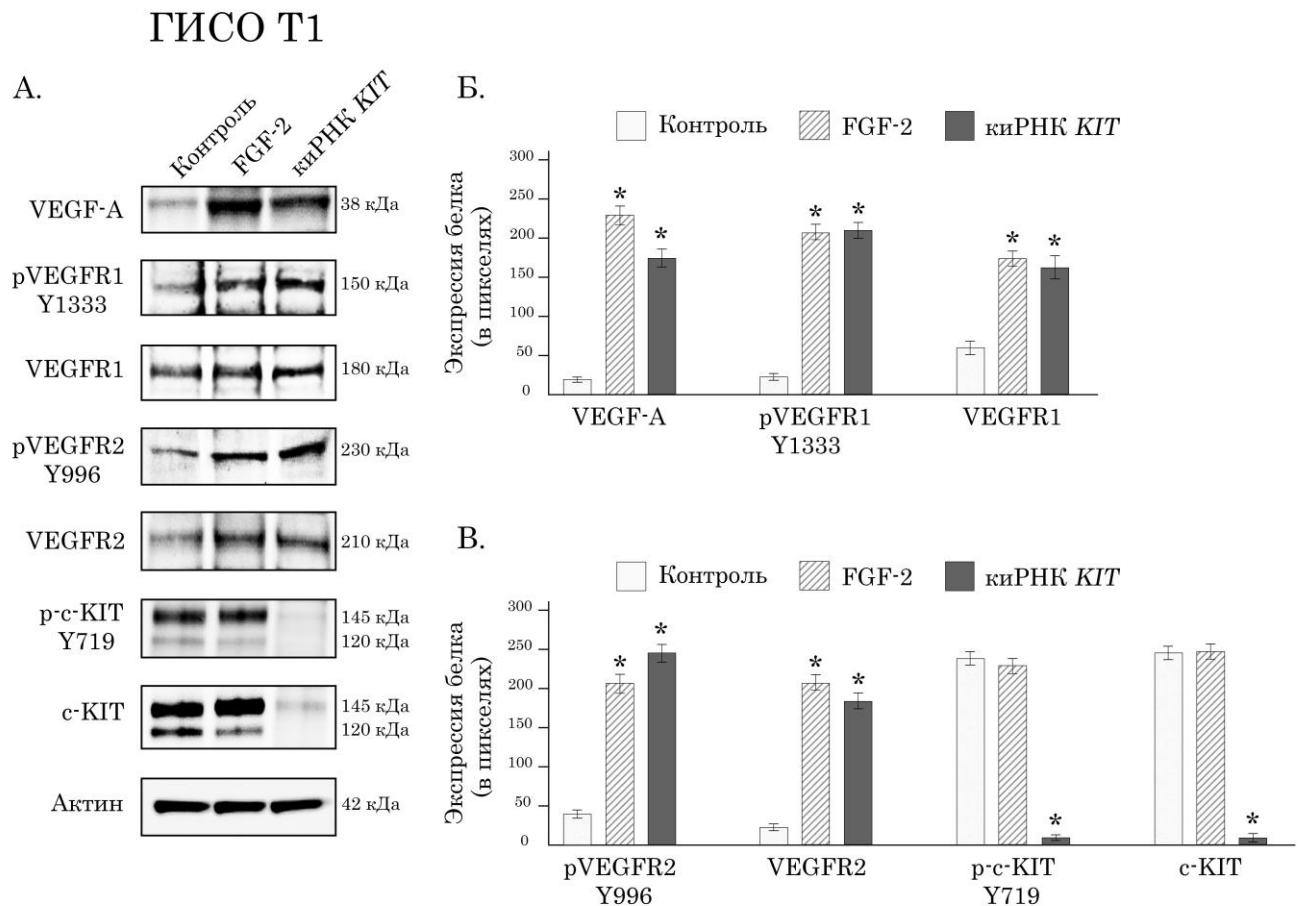


Рисунок 50 – Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях нокдауна *KIT*. Клетки ГИСО Т1 культивировались в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль); в присутствии FGF-2 (100 нг/мл); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. А – Оценка экспрессии VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм рецепторов VEGFR1-2, c-KIT методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,01$.

Следовательно, при ингибировании с-KIT-сигнального пути (под влиянием субтоксической концентрации ИМ или трансфекции киРНК *KIT*) в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 происходит активация VEGFR-сигнального пути.

Далее исследовалась концентрация VEGF-A лиганда в супернатантах ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1 и ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна *KIT* с помощью киРНК *KIT*. В таблице 16 представлены концентрации VEGF-A лиганда в супернатантах клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна *KIT*.

Таблица 16 – Концентрация VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в условиях нокдауна *KIT* с помощью киРНК *KIT*

Образец	ГИСО Т1	ГИСО Т1-ИМ-R	ГИСО 430
Контроль	605 ± 71,1	1804 ± 77,4	1008 ± 56,2
киРНК <i>KIT</i>	1212 ± 81,6	4521 ± 82,8	2017 ± 61,8

Примечание – Клетки ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 культивировали в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. Результаты представлены в виде ср. арифм. ± станд. откл.

После трансфекции киРНК *KIT* в супернатантах клеток ГИСО Т1 через 48 часов отмечалось значимое повышение (в 2 раза) концентрации VEGF-A. Аналогичным образом, после трансфекции киРНК *KIT* в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-R через 48 часов отмечалось значимое повышение (в 2,5 раза) концентрации VEGF-A. В супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО 430 после трансфекции киРНК *KIT* также отмечалось значимое увеличение (в 2 раза) концентрации VEGF-A (Рисунок 51А).

Следует отметить, что после трансфекции киРНК *KIT* в супернатантах клеток ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась значимо более высокая концентрация VEGF-A лиганда (в 2,25 раза), по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 51А).

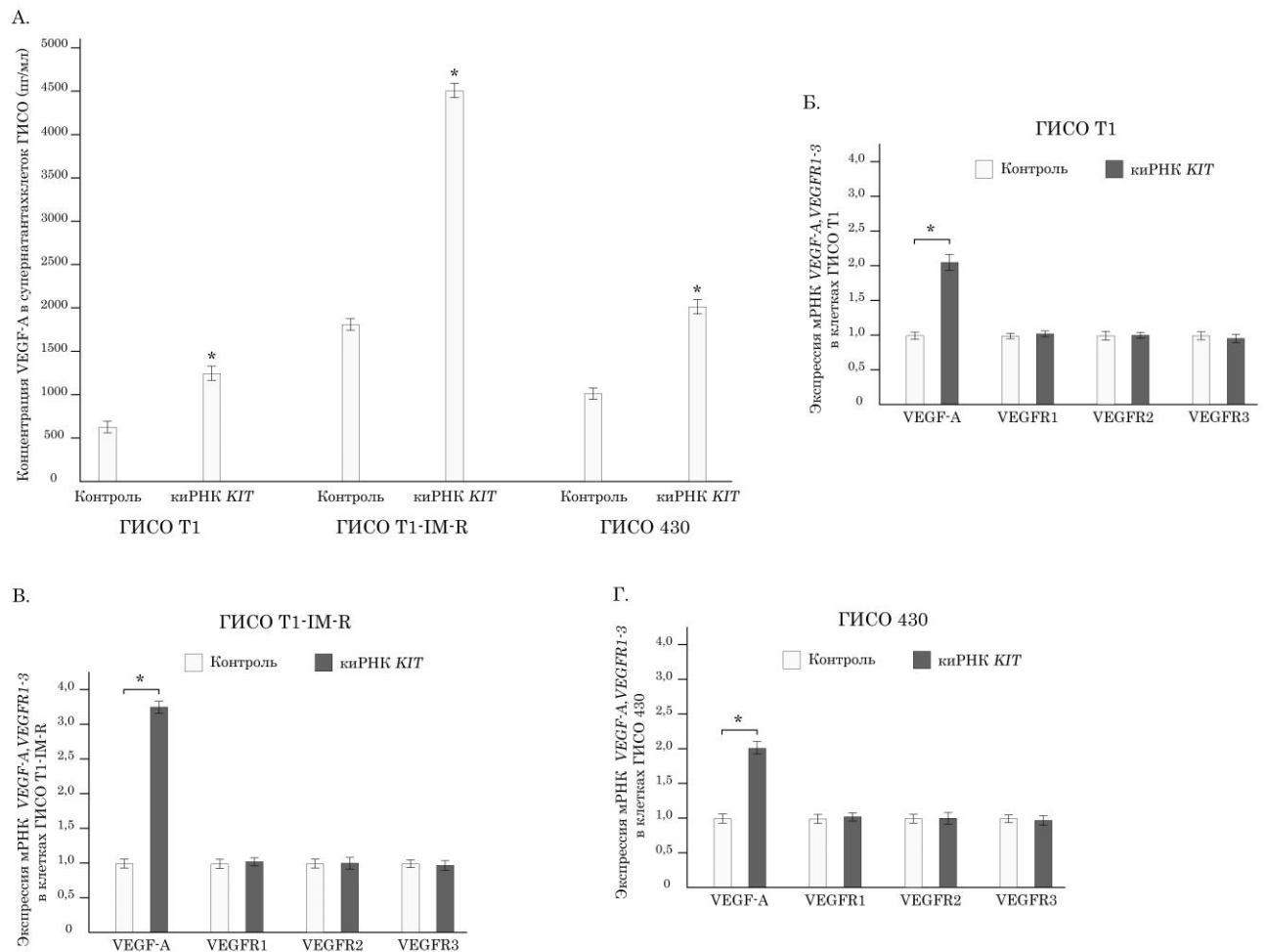


Рисунок 51 – Исследование активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна *KIT*. Клетки ГИСО культивировали в течение 48 часов: в отсутствии препаратов (контроль); трансфицировались с помощью киРНК *KIT*. А – Оценка концентрации VEGF-A (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в присутствии киРНК *KIT* методом ИФА; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; Экспрессия VEGF-A, VEGFR1-3 в клетках ГИСО T1 (Б), ГИСО T1-IM-R (В) и ГИСО 430 (Г) в присутствии киРНК *KIT* оценивалась методом ПЦР; Амплификация GAPDH использовалась в качестве контроля; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Таким образом, в условиях нокдауна *KIT* в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клетках ГИСО отмечалось значимое увеличение аутокринной продукции VEGF-A лиганда. Следует отметить, что в условиях нокдауна *KIT* наиболее значительное повышение концентрации VEGF-A лиганда (в 2,25 раза) отмечалось в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* (см. Рисунок 51А, Таблица 16).

Далее исследовалась экспрессия *VEGF-A* и *VEGFR1-3* в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 и ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна *KIT* с помощью кнРНК *KIT* (Рисунок 51Б-Г).

После трансфекции кнРНК *KIT* в клетках ГИСО T1 через 48 часов отмечалось значимое повышение (в 2,2 раза) экспрессии *VEGF-A*, при этом экспрессия *VEGFR1-3* не увеличивалась. Аналогичным образом, после трансфекции кнРНК *KIT* в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R через 48 часов отмечалось значимое повышение (в 3,5 раза) экспрессии *VEGF-A*, при этом экспрессия *VEGFR1-3* не увеличивалась. В ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 после трансфекции кнРНК *KIT* также отмечалось значимое увеличение (в 2 раза) экспрессии *VEGF-A*, при этом экспрессия *VEGFR1-3* не увеличивалась (Рисунок 51Б-Г).

На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что в условиях нокдауна *KIT* в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клетках ГИСО отмечалось значимое увеличение экспрессии *VEGF-A*. Следует отметить, что в условиях нокдауна *KIT* наиболее значительное повышение экспрессии *VEGF-A* (в 3,5 раза) отмечалось ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в клетках ГИСО под влиянием таргетного препарата ИМ происходило снижение активности с-KIT-сигнального пути. В результате, в опухолевых клетках компенсаторно повышалась экспрессия *FGF-2* лиганда и генов его рецепторов *FGFR1-2*.

Вследствие указанных изменений в клетках ГИСО увеличивалась аутокринная продукция FGF-2, который связываясь со своими рецепторами FGFR1-2 обеспечивал активацию FGFR-сигнального пути. В результате, в клетках ГИСО активизировались сигнальные каскады (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), за счет которых происходила их пролиферация и выживаемость в условиях культивирования в присутствии ИМ. За счет активации FGFR-сигнального пути развивалась вторичная (приобретенная) резистентность клеток ГИСО к ИМ, не связанная с появлением вторичных мутаций *KIT*. Под влиянием FGF-2 лиганда в клетках ГИСО повышалась экспрессия *VEGF-A* и увеличивалась аутокринная продукция VEGF-A лиганда.

Лиганд VEGF-A связывался со своими рецепторами VEGFR1-2 и способствовал активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО. VEGFR-сигнальный путь также способствовал активации сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), которые обеспечивали пролиферацию клеток ГИСО.

Следовательно, в процессе развития вторичной резистентности клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ, не связанной с появлением вторичных мутаций *KIT*, происходит изменение активности рецепторных тирозинкиназ в опухолевых клетках: снижается активность с-KIT-сигнального пути и повышается активность FGFR- и VEGFR-сигнальных путей. За счет активности в ИМ-резистентных клетках ГИСО FGFR- и VEGFR-сигналинга возникает вторичная резистентность указанных клеток к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО.

Для преодоления резистентности клеток ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути (СУ и РЕГО) требуется изучение структурного и функционального взаимодействия между тирозинкиназными рецепторами FGFR и VEGFR.

3.6 Исследование взаимодействия между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО и модуляция их чувствительности к VEGFR-ингибиторам посредством ингибирования FGFR-сигнального пути

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

Выше было показано, что под влиянием FGF-2 лиганда в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 повышалась экспрессия VEGF-A и увеличивалась аутокринная продукция VEGF-A лиганда (См. Рисунок 47, 48).

Кроме того, FGF-2 лиганд индуцировал аутокринную продукцию VEGF-A лиганда в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. При этом FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A была значимо более выражена в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (См. Рисунок 49). Было обнаружено, что под влиянием FGF-2 лиганда в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 значимо повышалась экспрессия VEGF-A (См. Рисунок 49B). При этом под влиянием FGF-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, отмечалась значимо более высокая экспрессия VEGF-A, по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентными к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 49B-B). Таким образом, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечается аутокринная продукция FGF-2 лиганда и активация FGFR-сигнального пути, а также аутокринная продукция VEGF-A лиганда и активация VEGFR-сигнального пути.

Для подтверждения ключевой роли FGFR-сигнального пути в механизмах активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО было предпринято исследование способности таргетных препаратов BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) и РЕГО (ингибитор рецепторов VEGFR1-3)

ингибировать FGFR- и VEGFR-сигнальные пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (Рисунок 52).

Под влиянием препарата BGJ398 (2 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось время-зависимое снижение экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2, что свидетельствует об угнетении FGFR-сигнального пути. Через 24 часа культивирования в присутствии BGJ398 (2 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R полностью отсутствовала экспрессия фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2. В тоже время, под влиянием препарата BGJ398 (2 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось время-зависимое снижение экспрессии фосфорилированных форм рецепторов VEGFR1-2, что свидетельствует об угнетении VEGFR-сигнального пути. Через 24 часа культивирования в присутствии BGJ398 (2 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R полностью отсутствовала экспрессия фосфорилированных форм рецепторов VEGFR1-2. Таким образом, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R препарат BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) блокировал активацию FGFR- и VEGFR-сигнальных путей (Рисунок 52).

Под влиянием препарата РЕГО (1 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось время-зависимое снижение экспрессии фосфорилированных форм рецепторов VEGFR1-2, что свидетельствует об угнетении VEGFR-сигнального пути. Через 24 часа культивирования в присутствии РЕГО (2 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось максимальное снижение экспрессии фосфорилированных форм рецепторов VEGFR1-2 (Рисунок 52).

В тоже время, под влиянием препарата РЕГО (1 мкмоль/л) в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R не происходило снижения экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2, что свидетельствует об отсутствии влияния РЕГО на активность FGFR-сигнального пути. Следовательно, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R препарат РЕГО

(ингибитор рецепторов VEGFR1-3) блокировал активацию только VEGFR-сигнального пути, не влияя на FGFR-сигнальный путь (Рисунок 52).

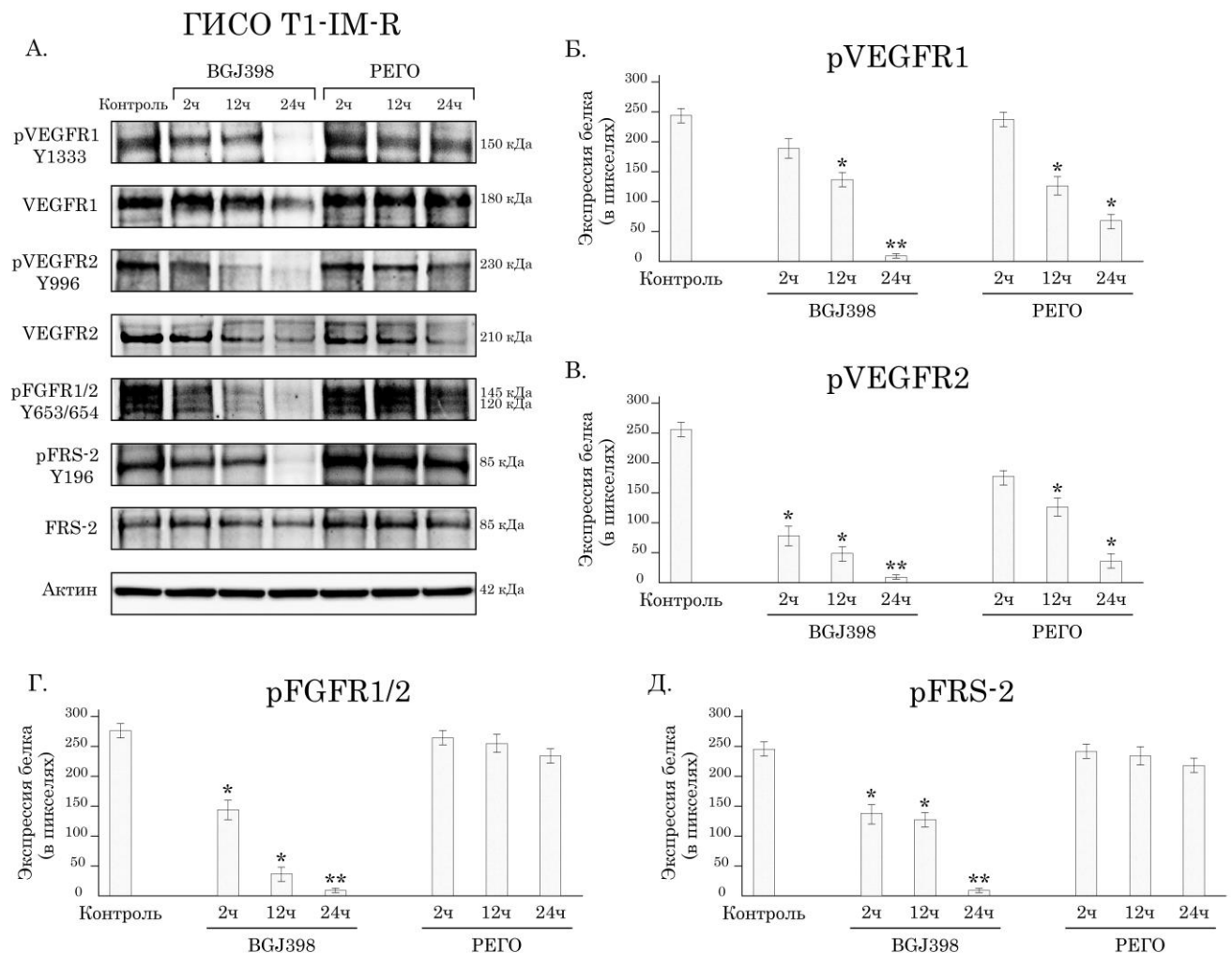


Рисунок 52 – Исследование способности таргетных препаратов BGJ398 и РЕГО ингибировать активацию FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО культивировали в течение 24 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии BGJ398 (2 мкмоль/л) и РЕГО (1 мкмоль/л). А – Оценка экспрессии фосфорилированных и общих форм белков VEGFR-сигнального пути (VEGFR1, VEGFR2) и FGFR-сигнального пути (FGFR1/2, FRS-2) в клетках ГИСО T1-IM-R методом иммуноблоттинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В, Г, Д) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в клетках ГИСО Т1 в процессе развития вторичной резистентности к ИМ, не связанной с появлением вторичных мутаций *KIT*, первично развивалась активация FGFR-сигнального пути. В опухолевых клетках ГИСО Т1 возникала аутокринная продукция FGF-2 лиганда. Под влиянием FGF-2 в опухолевых клетках ГИСО Т1 повышалась экспрессия *VEGF-A* и увеличивалась аутокринная продукция VEGF-A лиганда. Лиганд VEGF-A связывался со своими рецепторами VEGFR1-2 и способствовал активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1. В результате активности FGFR- и VEGFR-сигнальных путей из ИМ-чувствительной линии ГИСО Т1 сформировалась ИМ-резистентная линия ГИСО Т1-ИМ-R. Клетки ГИСО Т1-ИМ-R помимо вторичной резистентности к ИМ обладают также вторичной резистентностью к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО.

Поскольку в клетках ГИСО Т1 активация VEGFR-сигнального пути возникала за счет FGFR-сигнального пути, то, вероятно, в указанных опухолевых клетках существует структурная и функциональная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2. На функциональную взаимосвязь рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 указывает способность FGF-2 лиганда индуцировать время-зависимое повышение экспрессии фосфорилированных форм указанных рецепторов в клетках ГИСО Т1 (см. Рисунок 20А-Г, Рисунок 47 А-В). В ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 отмечается гиперэкспрессия *FGFR1-2* и *VEGFR1-2*, а также фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 (см. Рисунок 8, 11, 19, 46). В связи с этим, было предпринято исследование структурной взаимосвязи между указанными рецепторами в ИМ-резистентных клетках ГИСО методом коиммунопреципитации (Рисунок 53).

В ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась коиммунопреципитация тирозинкиназного рецептора VEGFR1 с тирозинкиназными рецепторами FGFR1 и FGFR2, что подтверждается наличием одновременной экспрессией указанных

рецепторов. Напротив, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, коиммунопреципитация тирозинкиназного рецептора VEGFR1 с тирозинкиназными рецепторами FGFR1 и FGFR2 не обнаруживалась, что подтверждается отсутствием одновременной экспрессии указанных рецепторов (Рисунок 53).

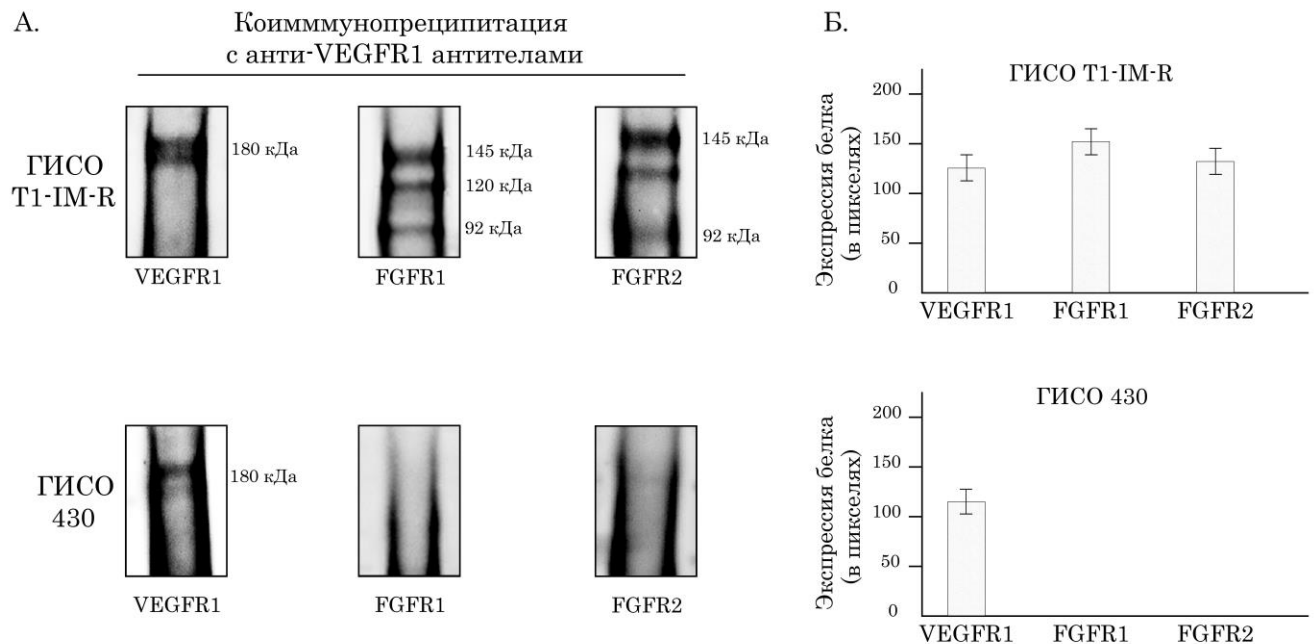


Рисунок 53 – Коиммунопреципитация тирозинкиназных рецепторов VEGFR1, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов. После этого готовились клеточные лизаты, к которым добавлялись преципитирующие анти-VEGFR1 антитела и выполнялась методика коиммуноперципитации VEGFR1/FGFR1, VEGFR1/FGFR2. А – Оценка экспрессии общих форм белков VEGFR1, FGFR1 и FGFR2 методом иммуноблоттинга; Б – Количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия).

Далее взаимосвязь тирозинкиназных рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО исследовалась методом иммунофлуоресцентной микроскопии (Рисунок 54).

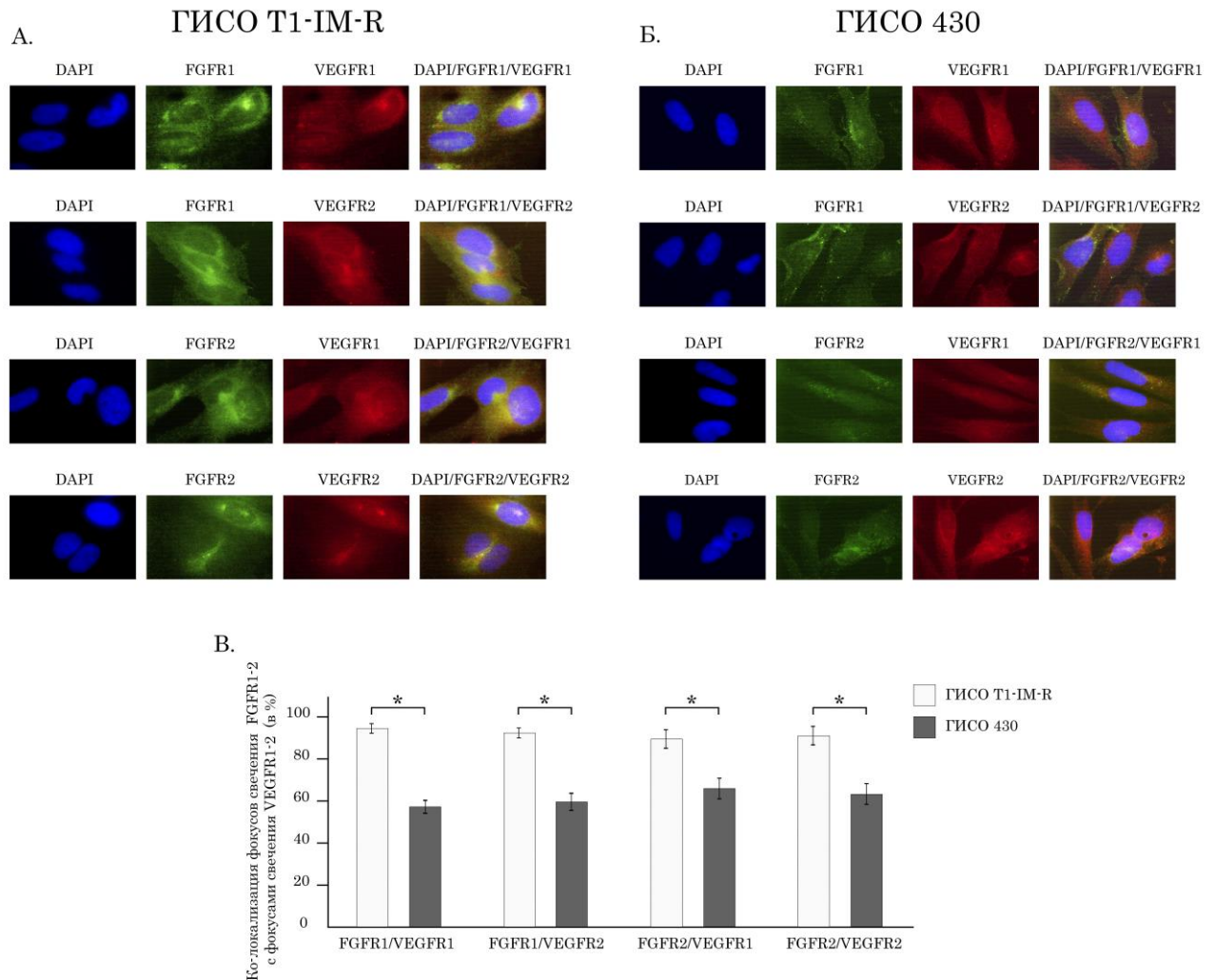


Рисунок 54 – Иммунофлуоресцентная микроскопия рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО Т1-IM-R и ГИСО 430. Клетки ГИСО культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов. После этого выполнялась иммунофлуоресцентная микроскопия (увеличение 100х) рецепторов FGFR1-2 (зеленое свечение) и VEGFR1-2 (красное свечение) в клетках ГИСО Т1-IM-R (А) и ГИСО 430 (Б). Ядра клеток визуализированы с помощью красителя DAPI. На ко-локализацию рецепторов FGFR1/VEGFR1, FGFR1/VEGFR2, FGFR2/VEGFR1, FGFR2/VEGFR2 указывает желтое свечение. В – Количественный анализ ко-локализации рецепторов FGFR1/VEGFR1, FGFR1/VEGFR2, FGFR2/VEGFR1, FGFR2/VEGFR2 в клетках ГИСО.

Было обнаружено, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* ко-локализация тирозинкиназных рецепторов FGFR1/VEGFR1, FGFR1/VEGFR2, FGFR2/VEGFR1, FGFR2/VEGFR2 составляла более 90%. Напротив, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, ко-локализация тирозинкиназных рецепторов FGFR1/VEGFR1, FGFR1/VEGFR2, FGFR2/VEGFR1, FGFR2/VEGFR2 составляла не более 65%.

Полученные результаты указывают на наличие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*. Указанная взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 подтверждается коиммунопреципитацией рецепторов и высокой степенью их ко-локализации. 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 коиммунопреципитации рецепторов и низкой степенью их ко-локализации.

Выше было продемонстрировано, что в клетках ГИСО T1-IM-R по сравнению с клетками ГИСО 430 активизирована ауторинная продукция FGF-2 лиганда и VEGF-A лиганда (см. Рисунок 9, 11, 17, 46). Следствием аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A является развитие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2, участвующих в активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО T1-IM-R. Наличие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО T1-IM-R способствует развитию их вторичной резистентности к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО.

Поэтому далее исследовалась способность селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) модулировать чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО.

3.6.2 Модуляция чувствительности иматиниб-резистентных клеток ГИСО к VEGFR-ингибиторам (сунитиниб и регорафениб) посредством ингибирования FGFR-сигналинга

Как и ожидалось, в присутствии СУ (ингибитор рецепторов VEGFR1-3) в концентрации 0,5 мкмоль/л сохранялась жизнеспособность ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R (Рисунок 55А-В). Под влиянием СУ в клетках ГИСО T1-IM-R не отмечалось значимого снижения экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Таргетный препарат СУ не вызывал апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R, что подтверждается отсутствием экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3. В присутствии препарата BGJ398 в концентрации 1 мкмоль/л также сохранялась жизнеспособность клеток ГИСО T1-IM-R, о чем свидетельствовала сравнимая с контрольным образцом экспрессия фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, а также отсутствие экспрессии маркеров апоптоза.

Напротив, в присутствии комбинации СУ (0,5 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R (Рисунок 55А-В). Под влиянием комбинации СУ и BGJ398 в клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось резкое снижение экспрессии фосфорилированных и общих форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности опухолевых клеток. Кроме того, при комбинированном использовании препаратов (СУ + BGJ398) в клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось резкое увеличение экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3, что свидетельствует о гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что гибель по механизму апоптоза ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R отмечалась только при использовании комбинации препаратов (СУ + BGJ398). По отдельности препараты СУ и BGJ398 не вызывали апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R.

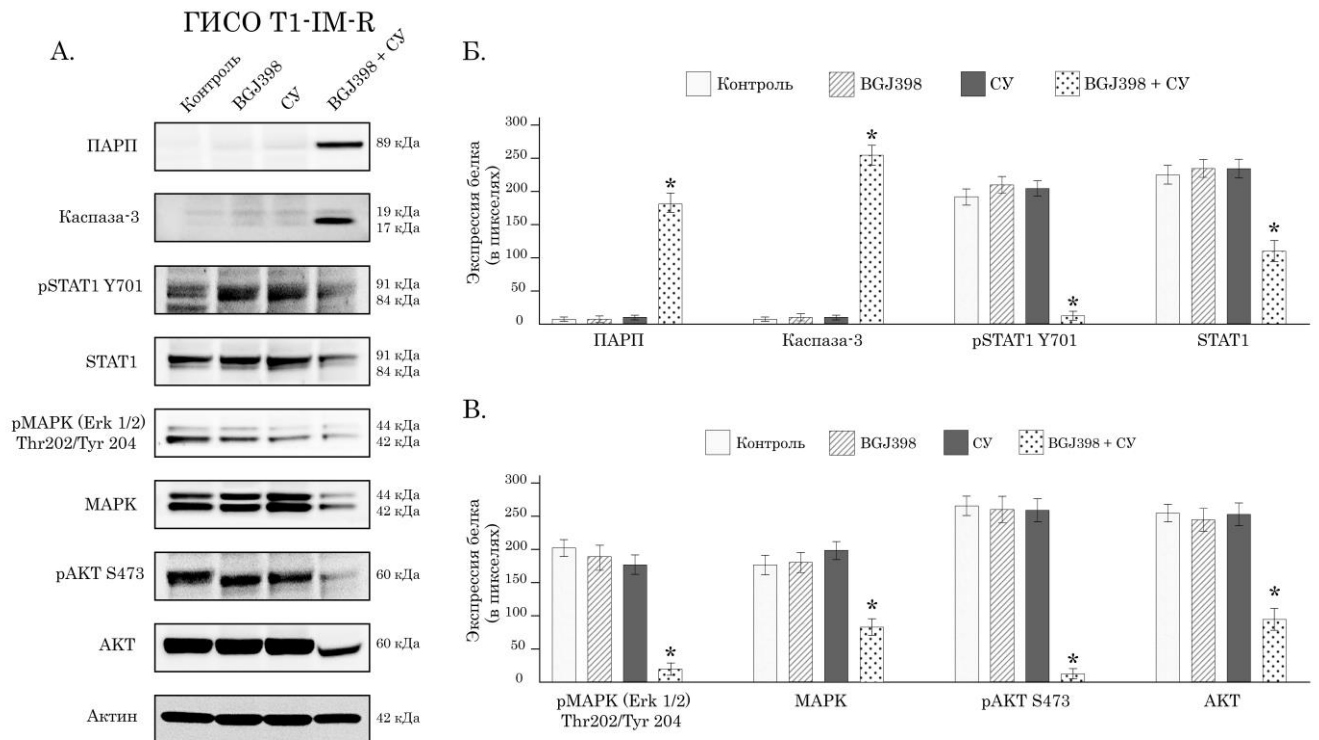


Рисунок 55 – Цитотоксическая активность СУ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R. Клетки ГИСО T1-ИМ-R культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии СУ (0,5 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспазы-3) и нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MARK, АКТ в клетках ГИСО T1-ИМ-R методом иммуноблотинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

Полученные результаты подтверждаются исследованием пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R в присутствии СУ, BGJ398 и их комбинации (Рисунок 56).

В присутствии СУ в концентрации 0,5 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО T1-IM-R интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 85-90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 56А). Под влиянием СУ не отмечалось снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-IM-R, что подтверждает резистентность клеток к данному таргетному препарату (Рисунок 56Б).

В присутствии препарата BGJ398 в концентрации 1 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО T1-IM-R также наблюдалась высокая интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым (85-90% от контроля), что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 56А). Кроме того, препарат BGJ398 не вызывал снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-IM-R (Рисунок 56Б).

Напротив, под действием комбинации СУ (0,5 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) отмечалось резкое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток (Рисунок 56А). В присутствии комбинации ИМ и BGJ398 интенсивность окраски чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R раствором кристаллического фиолетового составляла не более 20% от контроля. В присутствии комбинации СУ (0,5 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) отмечалось резкое снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-IM-R, что также свидетельствует о гибели опухолевых клеток (Рисунок 56Б).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что нарушение пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R отмечалась только при использовании комбинации препаратов (СУ + BGJ398). По отдельности препараты СУ и BGJ398 не оказывали антипролиферативный эффект в отношении клеток ГИСО T1-IM-R.

Таким образом, таргетные препараты СУ и BGJ398 оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R только при комбинированном использовании.

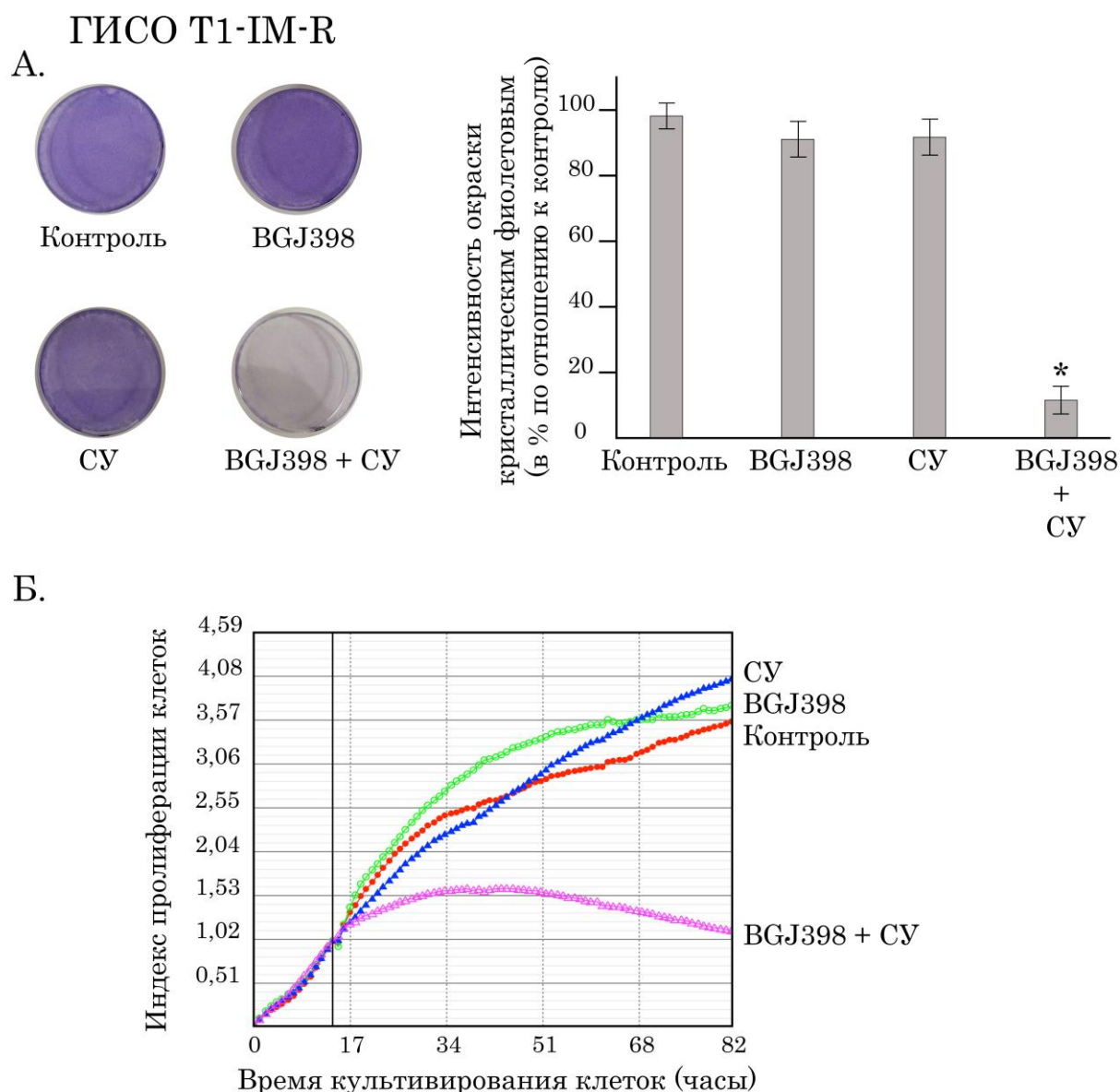


Рисунок 56 – Антипролиферативная активность СУ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 82 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии СУ (0,5 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$; В – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США).

Далее исследовалась способность BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) модулировать чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетному препарату РЕГО (Рисунок 57А-В).

В присутствии РЕГО (ингибитор рецепторов VEGFR1-3) в концентрации 0,5 мкмоль/л сохранялась жизнеспособность ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Под влиянием РЕГО в клетках ГИСО T1-IM-R не отмечалось значимого снижения экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Таргетный препарат РЕГО не вызывал апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R, что подтверждается отсутствием экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 (Рисунок 57А-В).

В присутствии комбинации РЕГО (0,5 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) возникала массовая гибель ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R (Рисунок 57А-В). Под влиянием комбинации РЕГО и BGJ398 в клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось значимое снижение экспрессии фосфорилированных форм нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности опухолевых клеток. Кроме того, при комбинированном использовании препаратов (РЕГО + BGJ398) в клетках ГИСО T1-IM-R отмечалось резкое увеличение экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3, что свидетельствует о гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза (Рисунок 57А-В).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что гибель по механизму апоптоза ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R отмечалась только при использовании комбинации препаратов (РЕГО + BGJ398). По отдельности препараты РЕГО и BGJ398 не вызывали апоптоз клеток ГИСО T1-IM-R.

Полученные результаты подтверждаются исследованием пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R в присутствии РЕГО, BGJ398 и их комбинации (Рисунок 58).

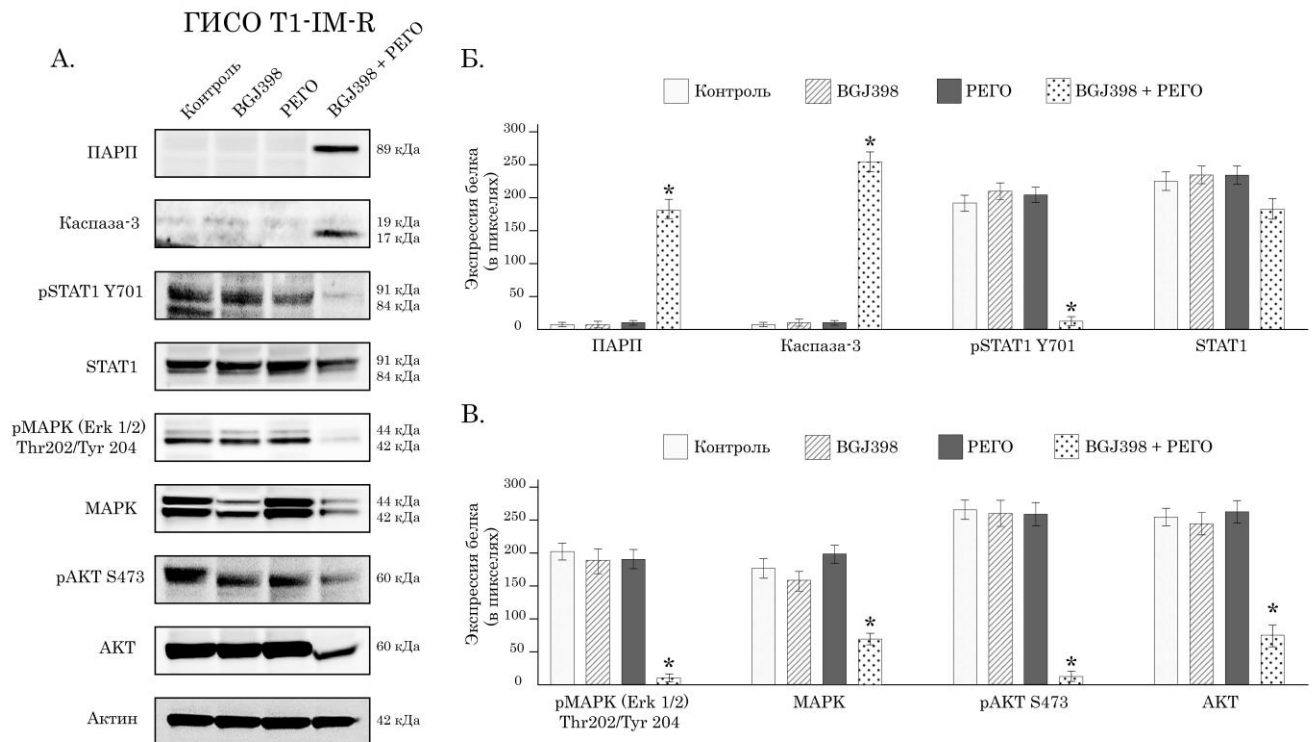


Рисунок 57 – Цитотоксическая активность РЕГО, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 72 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии РЕГО (0,5 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Исследование экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспазы-3) и нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK, АКТ в клетках ГИСО T1-IM-R методом иммуноблотинга. Актин отражает уровень белка в образцах; На графиках (Б, В) представлен количественный анализ экспрессии белков в пикселях (денситометрия); * - $p < 0,05$.

В присутствии РЕГО в концентрации 0,5 мкмоль/л в чашках Петри с клетками ГИСО T1-IM-R интенсивность окраски кристаллическим фиолетовым составляла 85-90% от контроля, что свидетельствует о жизнеспособности опухолевых клеток (Рисунок 58А). Под влиянием РЕГО не отмечалось снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-IM-R, что подтверждает резистентность клеток к данному таргетному препарату (Рисунок 58Б).

При использовании комбинации РЕГО (0,5 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) отмечалось резкое снижение интенсивности окраски кристаллическим фиолетовым чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R, что свидетельствует о массовой гибели опухолевых клеток (Рисунок 58А). В присутствии комбинации ИМ и BGJ398 интенсивность окраски чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R раствором кристаллического фиолетового составляла не более 20% от контроля. В присутствии комбинации РЕГО (0,5 мкмоль/л) и BGJ398 (1 мкмоль/л) отмечалось резкое снижения пролиферативной активности клеток ГИСО T1-IM-R, что также свидетельствует о гибели опухолевых клеток (Рисунок 58Б).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что нарушение пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R отмечалась только при использовании комбинации препаратов (РЕГО + BGJ398). По отдельности препараты РЕГО и BGJ398 не оказывали антипролиферативный эффект в отношении клеток ГИСО T1-IM-R.

Таким образом, таргетные препараты РЕГО и BGJ398 оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R только при комбинированном использовании.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препарат BGJ398, являясь селективным ингибитором рецепторов FGFR1-4, способствовал восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* к таргетным препаратам СУ и РЕГО (ингибиторам рецепторов VEGFR1-3).

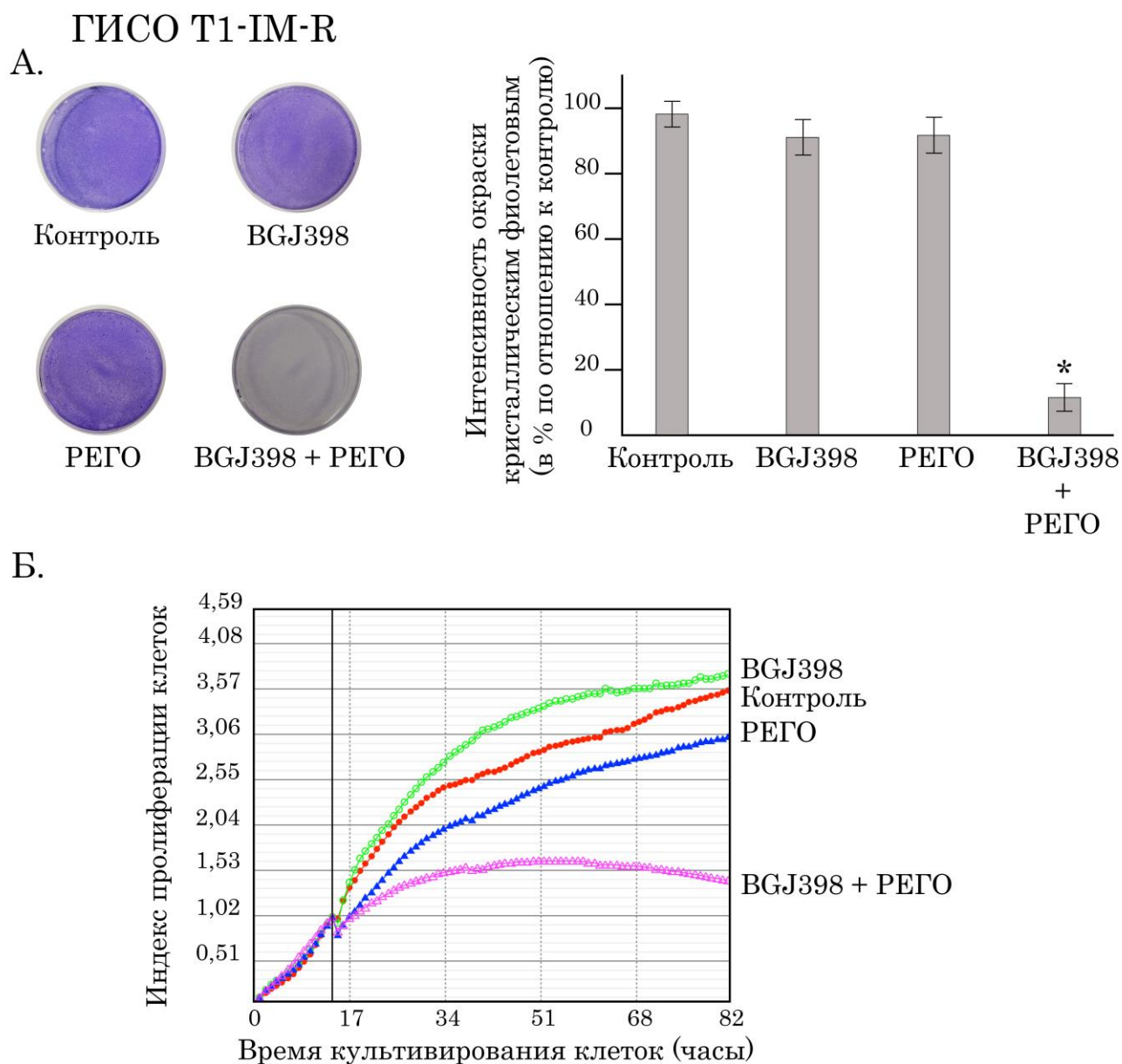


Рисунок 58 – Антипролиферативная активность РЕГО, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R. Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в течение 82 часов в отсутствии препаратов (контроль), в присутствии РЕГО (0,5 мкмоль/л), BGJ398 (1 мкмоль/л) и их комбинации. А – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1-IM-R фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора; * - $p < 0,01$; Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО T1-IM-R с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США).

Далее исследовался вариант взаимодействия ингибиторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) и селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) при их совместном применении в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R (аддитивное, синергитическое или антагонистическое взаимодействие). В таблице 17 продемонстрирован показатель синергизма комбинации препаратов (СУ + BGJ398, РЕГО + BGJ398) в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-IM-R, который был определен с помощью компьютерной программы Synergy Finder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html> , дата обращения 12.05.2025).

Таблица 17 – Показатель синергизма комбинации ингибиторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) и селективного ингибитора 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 - Клетки ГИСО T1-IM-R культивировали в присутствии комбинаций препаратов СУ + BGJ398, РЕГО + BGJ398 в течение 72 часов. Концентрации препаратов: СУ, РЕГО (0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л; 4 мкмоль/л), BGJ398 (0,125 мкмоль/л; 0,25 мкмоль/л; 0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л). Жизнеспособность клеток в присутствии препаратов оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста. На основании значений жизнеспособности клеток были вычислены показатели синергизма (ZIP, Bliss, Loewe, HSA), представленные в таблице. Интерпретация показателей синергизма: > 10 (синергитическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < - 10 (антагонистическое взаимодействие).

Полученные результаты свидетельствуют, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма СУ + BGJ398 и РЕГО + BGJ398 был более 10 единиц (Таблица 17). Следовательно, между ингибиторами рецепторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) при их комбинированном использовании с селективным ингибитором рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) развивался синергетический вариант взаимодействия в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R.

Далее исследовалась способность BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) модулировать чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО 430 к таргетным препаратам СУ и РЕГО (Рисунок 59А-В).

В присутствии препаратов BGJ398 (1мкмоль/л), СУ (0,5 мкмоль/л) и РЕГО (0,5 мкмоль/л) взятых по отдельности сохранялась жизнеспособность и пролиферация ИМ-резистентных клеток ГИСО 430, о чем свидетельствует высокая интенсивность окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового и сравнимый с контрольным образом индекс пролиферации опухолевых клеток и (Рисунок 59 А-В).

В присутствии комбинации препаратов (BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО) также сохранялась жизнеспособность и пролиферация ИМ-резистентных клеток ГИСО 430, что подтверждалось высокой интенсивностью окраски чашек Петри раствором кристаллического фиолетового, сравнимым с контрольным образом индексом пролиферации опухолевых клеток и отсутствием экспрессии маркеров апоптоза – расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 (Рисунок 59 А-В).

Таким образом, комбинации препаратов BGJ398 + СУ и BGJ398 + РЕГО не оказывали цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении клеток ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*.

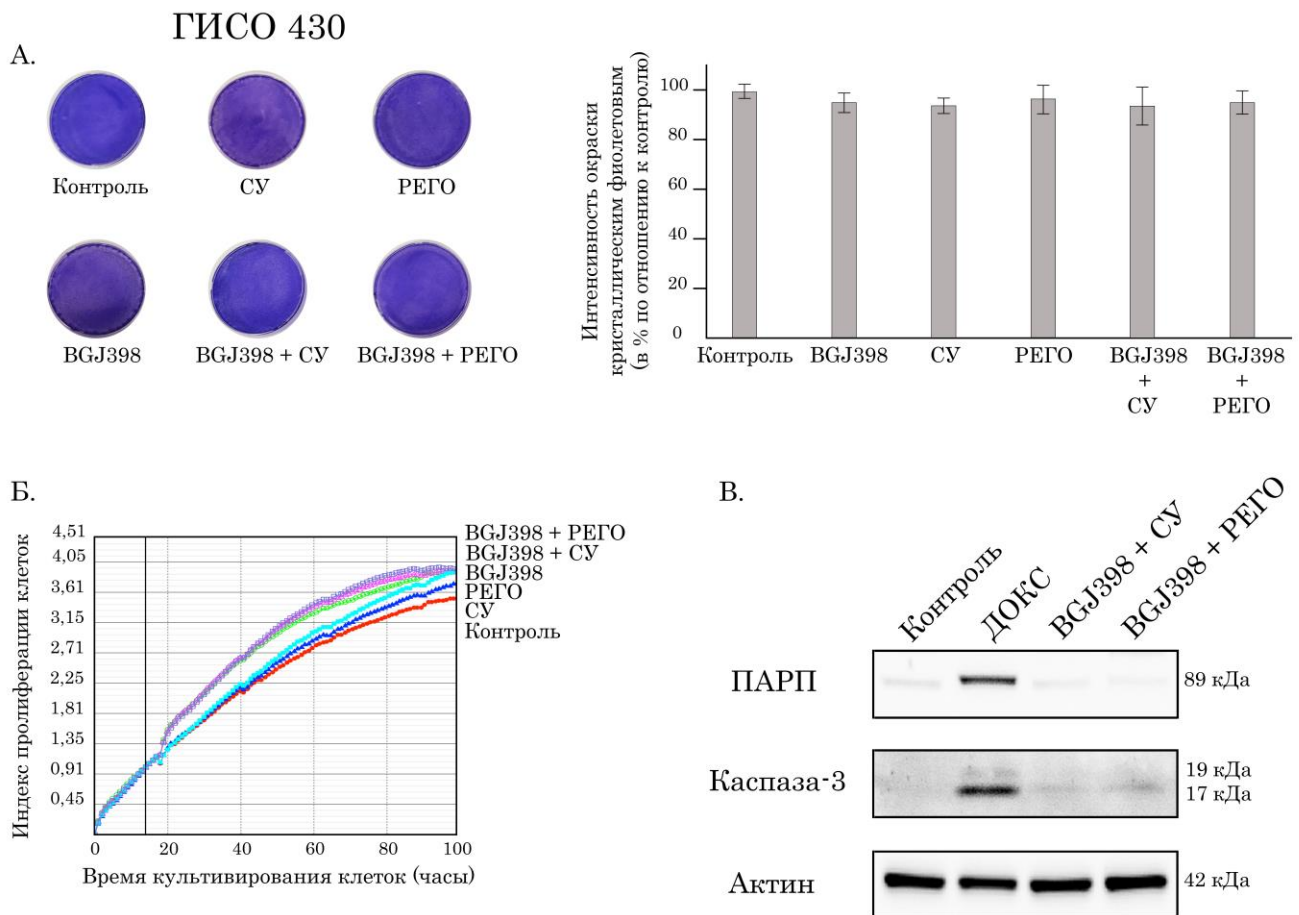


Рисунок 59 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность СУ, РЕГО и их комбинаций с BGJ398 в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430. Клетки ГИСО 430 культивировались в течение 100 часов отсутствия препаратов (контроль), в присутствии BGJ398 (1 мкмоль/л), СУ (0,5 мкмоль/л), РЕГО (0,5 мкмоль/л) и комбинаций препаратов (BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО). А – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО 430 фиксирующим раствором кристаллического фиолетового. Слева – фотографии чашек Петри; Справа – график интенсивности окраски чашек Петри кристаллическим фиолетовым на основании анализа оптической плотности раствора. Б – Оценка пролиферации клеток ГИСО 430 с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (США). В – Исследование маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспазы-3) клеток ГИСО 430 методом иммуноблоттинга. Доксорубицин (ДОКС) в концентрации 2 мкмоль/л использовался в качестве положительного контроля апоптоза. Актин отражает уровень белка в образцах.

Далее исследовался вариант взаимодействия ингибиторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) и селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) при их совместном применении в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430 (аддитивное, синергитическое или антагонистическое взаимодействие). В таблице 18 продемонстрирован показатель синергизма комбинации препаратов (СУ + BGJ398, РЕГО + BGJ398) в отношении ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО 430, который был определен с помощью компьютерной программы Synergy Finder (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/synergyfinder.html> , дата обращения 12.05.2025)

Таблица 18 – Показатель синергизма комбинации ингибиторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) и селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) для клеточной линии ГИСО 430

Клеточная линия	Комбинация препаратов	Показатель синергизма			
		ZIP	Bliss	Loewe	HSA
ГИСО 430	СУ + BGJ398	-38,21	-39,24	-12,11	-34,82
	РЕГО + BGJ398	-29,77	-30,59	-11,64	-21,14

Примечание - Клетки ГИСО 430 культивировали в присутствии комбинаций препаратов СУ + BGJ398, РЕГО + BGJ398 в течение 72 часов. Концентрации препаратов: СУ, РЕГО (0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л; 4 мкмоль/л), BGJ398 (0,125 мкмоль/л; 0,25 мкмоль/л; 0,5 мкмоль/л; 1 мкмоль/л; 2 мкмоль/л). Жизнеспособность клеток в присутствии препаратов оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста. На основании значений жизнеспособности клеток были вычислены показатели синергизма (ZIP, Bliss, Loewe, HSA), представленные в таблице. Интерпретация показателей синергизма: > 10 (синергетическое взаимодействие); 10 до -10 (аддитивное взаимодействие); < - 10 (антагонистическое взаимодействие).

Полученные результаты свидетельствуют, что во всех моделях взаимодействия препаратов (ZIP, Bliss, Loewe, HSA) показатель синергизма СУ + BGJ398 и РЕГО + BGJ398 был менее -10 единиц (Таблица 18). Следовательно, между ингибиторами рецепторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) при их

комбинированном использовании с селективным ингибитором рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) развивался антагонистический вариант взаимодействия в отношении клеточной линии ГИСО 430, резистентной к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что одновременное ингибирование FGFR-сигнального пути и VEGFR-сигнального пути за счет использования комбинации селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) и ингибиторов рецепторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) оказывало цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*. Развитие указанных эффектов было обусловлено синергетическим взаимодействием указанных препаратов, которое было следствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО T1-IM-R.

Следовательно, селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) способствовал восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетным препаратам СУ и РЕГО (ингибиторам VEGFR-сигналинга).

Полученные результаты свидетельствуют, что комбинации препаратов СУ + BGJ398 и РЕГО + BGJ398 не оказывали цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении клеток ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*. Между ингибитором рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) и ингибиторами рецепторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) не наблюдалось синергетического взаимодействия, что было обусловлено отсутствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО 430 (отсутствие коиммунопреципитации рецепторов и низкая степень их ко-локализации).

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании была поставлена цель изучить механизмы активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в гастроинтестинальных стромальных опухолях и их роль в формировании вторичной резистентности к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов.

Для достижения указанной цели в первую очередь было необходимо получить клеточную линию ГИСО с признаками вторичной (приобретенной) резистентности к ИМ. В результате культивирования ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1 в условиях постепенного увеличения концентрации ИМ была получена клеточная линия ГИСО T1-ИМ-R, обладающая признаками вторичной (приобретенной) резистентности к ИМ. Клетки ГИСО T1-ИМ-R сохраняли жизнеспособность в присутствии ИМ в концентрации 1 мкмоль/л. Препарат ИМ не вызывал апоптоз клеток ГИСО T1-ИМ-R и не нарушал их пролиферацию (см. Рисунок 3-8, Таблица 1). Для подтверждения развившейся вторичной резистентности к ИМ клеточную линию ГИСО T1-ИМ-R сравнивали с клеточной линией ГИСО 430. Клетки ГИСО 430 обладают вторичной резистентностью к ИМ, поскольку имеют вторичную гетерозиготную миссенс-мутацию в 13 экзоне *KIT* (V654A). За счет указанной мутации препарат ИМ не может ингибировать активность тирозинкиназного рецептора с-KIT и поэтому не влияет на жизнеспособность и пролиферацию клеток ГИСО 430.

Значение IC_{50} ИМ ($47,1 \pm 1,3$ мкмоль/л) для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R незначительно отличается от значения IC_{50} ИМ ($54,3 \pm 7,9$ мкмоль/л) для клеточной линии ГИСО 430. В тоже время, показатели IC_{50} ИМ для клеточных линий ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 более чем в 1000 раз превышают значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1, которое составило $0,04 \pm 0,0003$ мкмоль/л. Таким образом, клеточная линия ГИСО T1-ИМ-R, подобно клеточной линии ГИСО 430, обладает признаками резистентности к ИМ. Но в отличие от

клеточной линии ГИСО 430, у клеточной линии ГИСО T1-IM-R резистентность к ИМ не связана с возникновением вторичных мутаций *KIT*.

Вторичная (приобретенная) резистентность клеток ГИСО к ИМ может быть обусловлена развитием вторичных мутаций *KIT*, возникших в ходе длительного культивирования опухолевых клеток в присутствии таргетного препарата [134, 129, 149, 191]. Результаты секвенирования *KIT* свидетельствуют о наличии идентичной мутации в 11-м экзоне в клетках ГИСО T1 и ГИСО T1-IM-R. Вторичные мутации *KIT* в клетках ГИСО T1-IM-R отсутствуют (см. Таблица 2). Таким образом, развитие вторичной (приобретенной) резистентности к ИМ в клетках ГИСО T1-IM-R не связано с возникновением вторичных мутаций *KIT*.

Развитие вторичной резистентности клеток ГИСО к ИМ может быть обусловлено возникновением гиперактивации рецепторных тирозинкиназ (РТК), которые будут обеспечивать запуск пролиферативных каскадов в опухолевых клетках [19, 124, 175, 218]. В связи с этим был проведен скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм РТК (49 наименований) в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430. Резистентность клеток ГИСО к ИМ может быть вызвана активацией нерецепторных (внутриклеточных) тирозинкиназ (НТК), которые обеспечивают передачу пролиферативного сигнала в ядро клетки и, тем самым, активируют вступление клетки в цикл деления [37, 100, 137, 193]. В связи с этим был проведен скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм НТК (43 наименования) в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО T1, отмечаются: 1) повышенная экспрессия FGF-2, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1-2, фосфорилированной формы белка FRS-2 (см. Рисунок 8, 9); 2) повышенная экспрессия VEGF-A, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (см. Рисунок 11); 3) сниженная экспрессия фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы c-KIT (см. Рисунок 10); 4) повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм

нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1 (см. Рисунок 13А-Б).

Вероятно, вследствие аутокринной продукции факторов роста (FGF-2, VEGF-A) в клетках ГИСО Т1-ИМ-R отмечается гиперактивация JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR-сигнальных путей.

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 Т1-ИМ-R (см. Рисунок 8, 9). Кроме того, в клетках ГИСО 430, по сравнению с клетками ГИСО Т1-ИМ-R, значимо ниже экспрессия pVEGFR1-2 и лиганда VEGF-A (см. Рисунок 11). Важно отметить, что в клетках ГИСО 430, как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1, отмечалась гиперэкспрессия фосфорилированной и общей формы рецепторной тирозинкиназы c-KIT (см. Рисунок 10). Кроме того, в клетках ГИСО 430 была обнаружена повышенная экспрессия фосфорилированных и общих форм НТК – STAT1, MAPK и AKT по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО Т1 (см. Рисунок 13А-Б). Важно отметить, что экспрессия фосфорилированных форм НТК – STAT1, MAPK и AKT и была существенно выше в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, по сравнению с клетками ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT* (Рисунок 13В). Вероятно, вследствие отсутствия аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A в клетках ГИСО 430 активация сигнальных путей (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) была значимо ниже, чем в клетках ГИСО Т1-ИМ-R.

Таким образом, как показано в Таблице 3, ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 отличаются от ИМ-чувствительной линии ГИСО Т1 наличием признаков активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, что проявляется повышенной экспрессией рецепторных тирозинкиназ (FGFR1-2, VEGFR1-2) и нерецепторных тирозинкиназ (STAT1, MAPK и AKT).

Важно отметить, что в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей сопровождалась гиперэкспрессией лигандов FGF-2 и VEGF-A.

Следовательно, в клетках ГИСО T1-IM-R отмечается аутокринный механизм активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей. Гиперэкспрессия лигандов FGF-2 и VEGF-A в клетках ГИСО T1-IM-R сопровождалась снижением экспрессии фосфорилированной и общей формы тирозинкиназного рецептора c-KIT.

Продemonстрировано, что фактор роста фибробластов 2 типа (FGF-2) является лигандом рецепторов FGFR1-4 которые экспрессируются на различных клетках организма человека – эпителий, клетки соединительной ткани (фибробласты, эндотелий сосудов, гладкомышечные клетки), костная, нервная ткань и др. [91, 95]. От рецепторов FGFR1-4 сигнал поступает внутрь клетки на адаптерный белок FRS-2. Далее от адаптерного белка FRS-2 сигнал передается на внутриклеточные белки, участвующие в активации сигнальных путей JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, за счет которых обеспечивается пролиферация и дифференцировка клеток [55, 91, 95]. FGF-2 выполняет в организме множество функций. За счет FGF-2 происходит формирование органов в эмбриональном периоде, заживление ран и регенерация тканей при их повреждении, ангиогенез, формирование нервной ткани и костной системы [119, 181]. Активация FGFR-сигнального пути отмечается также при развитии злокачественных новообразований. Например, при немелкоклеточном и мелкоклеточном раке легких, раке мочевого пузыря, раке молочной железы, раке желудка, раке толстой кишки, раке печени и желчевыводящих путей, остеосаркоме [143, 159, 223]. В опухолевых клетках отмечались активирующие мутации *FGFR1-4*, что обуславливало гиперэкспрессию рецепторов FGFR1-4. Кроме того, гиперэксперссия указанных рецепторов развивалась за счет амплификации *FGFR1-4*. В результате, в опухолевых клетках возникала активация нижележащих внутриклеточных сигнальных белков (AKT, STAT, ERK1/2), что способствовало их неконтрольной пролиферации [16, 18, 226].

Кроме того, активация FGFR-сигнального пути в опухолевых клетках может быть обусловлена ауторинной продукцией FGF-лигандов или их паракринной продукцией клетками микроокружения опухоли (фибробластами, макрофагами,

эндотелиальными клетками и др.) [16, 18, 136]. Например, гиперпродукция FGF-2 лиганда отмечается при лейкозах, раке легких и молочной железы. Гиперпродукция FGF-8 лиганда отмечается при раке молочной железы и простаты. Гиперпродукция FGF-10 лиганда отмечается при раке легких. Гиперпродукция FGF-19 лиганда отмечается при гепатоцеллюлярной карциноме и трижды негативном раке молочной железы [98, 136, 151].

Продemonстрировано, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A) является лигандом рецепторов VEGFR1-2 которые экспрессируются на различных клетках организма человека – эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов, гемопоэтических стволовых клетках, моноцитах и макрофагах, нейронах [235, 240]. От рецепторов VEGFR1-2 сигнал передается на внутриклеточные белки, участвующие в активации сигнальных путей RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR, за счет которых возникает пролиферация и дифференцировка клеток [162, 212]. VEGF-A выполняет в организме множество функций. За счет VEGF-A происходит формирование сосудистой системы в эмбриональном периоде. VEGF-A усиливая пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток обеспечивает рост новых сосудов (ангиогенез) в процессе регенерации тканей после травматического повреждения и при гипертрофии скелетных мышц, вызванной физическими упражнениями. Концентрация VEGF-A в плазме крови увеличивается при развитии генерализованной гипоксии (бронхиальная астма, хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет) [162, 212, 236]. Активация VEGFR-сигнального пути отмечается при развитии большинства злокачественных новообразований человека. Опухолевые клетки способны продуцировать VEGF-A, кроме того указанный лиганд вырабатывается клетками микроокружения опухоли, например, макрофагами M2 и фибробластами [14, 20, 83, 136]. За счет активации VEGFR-сигнального пути обеспечивается рост кровеносных сосудов для питания опухоли. Кроме того, возможна экспрессия рецепторов VEGFR1-3 на мембранах опухолевых клеток. В этом случае аутокринная продукция VEGF-A лиганда будет обеспечивать активацию VEGFR-сигнального пути непосредственно в самих опухолевых

клетках, что будет обеспечивать их пролиферацию, миграцию и развитие метастазов [34, 161, 189]. Повышение в сыворотки больного уровня VEGF-A является неблагоприятным признаком, указывающим на прогрессирование роста опухоли [42, 161, 230]. Продemonстрировано, что VEGF-A способен оказывать иммуносупрессивное действие в отношении дендритных клеток и цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов подавляя развитие противоопухолевого иммунного ответа [83, 230].

В представленной работе была обнаружена активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R на фоне снижения активности с-KIT-сигнального пути в указанных опухолевых клетках. Поэтому далее исследовалась возможность активации FGFR-сигнального пути в ИМ-чувствительных клетках ГИСО в условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что 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 (см. Рисунок 14). ИМ в субтоксической концентрации 0,02 мкмоль/л индуцировал в клетках ГИСО T1 время-зависимое повышение экспрессии указанных маркеров FGFR-сигнального пути (см. Рисунок 15). 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* (см. Рисунок 14Д). В условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы с-KIT (под влиянием субтоксической концентрации ИМ 0,02 мкмоль/л или кнРНК *KIT*) в супернатантах клеток ГИСО T1 отмечалось значимое увеличение концентрации лиганда FGF-2 (см. Рисунок 17Б, 18А).

В условиях ингибирования рецепторной тирозинкиназы 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 супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430 отмечалось время-зависимое увеличение концентрации FGF-2 (см. Рисунок 17В-Г, 18Б-В). 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* (см. Рисунок 19).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, о том, что активация FGFR-сигнального пути является характерным признаком клеток ГИСО, имеющих вторичную резистентность к таргетному препарату ИМ. Тем не менее, активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО происходит различными механизмами в зависимости от мутационного статуса *KIT*.

В клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, отмечалась низкая экспрессия FGF-2 (см. Рисунок 9) и, соответственно, его низкая концентрация в супернатантах контрольных образцов (см. Рисунок 17А). Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430 отмечалась высокая экспрессия фосфорилированной и общей формы с-KIT, как и в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1, что свидетельствует о высокой активности с-KIT-сигнального пути в указанных опухолевых клетках (см. Рисунок 10). Следовательно, аутокринная продукция FGF-2 не является ключевым механизмом, обеспечивающим активацию FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*.

Напротив, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечалась гиперэкспрессия FGF-2 (см. Рисунок 9) и его высокая концентрация в супернатантах контрольных образцов (см. Рисунок 17А), что указывает на активацию аутокринной продукции FGF-2 в опухолевых клетках. Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R отмечалось снижение экспрессии фосфорилированной и общей формы с-KIT, что свидетельствует о уменьшении активности с-KIT-сигнального пути (см. Рисунок 10).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что при развитии вторичной резистентности клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ не связанной с возникновением вторичных мутаций КИТ, в опухолевых клетках возникает изменение профиля активности рецепторных тирозинкиназ: снижается активность с-КИТ-сигнального пути и повышается активность FGFR-сигнального пути вследствие усиления аутокринной продукции FGF-2. Обнаруженный «феномен переключения активности сигнальных путей» обусловлен ингибирующим эффектом таргетного препарата ИМ в отношении с-КИТ-сигнального пути в клетках ГИСО T1.

Далее проводились эксперименты, подтверждающие способность FGF-2 лиганда индуцировать активацию FGFR-сигнального пути в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1. Было обнаружено, что FGF-2 индуцировал в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 активацию FGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии фосфорилированной формы адаптерного белка FRS-2, фосфорилированных и общих форм рецепторов FGFR1-2. В результате в опухолевых клетках активизировались сигнальные каскады (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), обеспечивающие их пролиферацию и выживаемость (см. Рисунок 20, 21). В присутствии FGF-2 цитотоксическая активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1 снижалась, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспазы-3), а также активная пролиферация опухолевых клеток (см. Рисунок 22). В присутствии FGF-2 значительно снижалась чувствительность клеток ГИСО T1 к таргетному препарату. В случае прерывания клеток ГИСО с FGF-2 (в концентрации 100 нг/мл) в течение 48 часов значение IC_{50} иматиниба увеличивалось в 1,6 раза. В случае предварительного культивирования клеток ГИСО T1 в присутствии FGF-2 (в концентрации 100 нг/мл) в течение 14 дней значение IC_{50} иматиниба увеличивалось в 4,75 раза (Таблица 6).

Полученные в настоящей работе результаты согласуются с литературными данными. Продемонстрирована активация FGFR-сигнального пути в клетках

ГИСО при развитии их вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ. В частности, в ИМ-резистентных клетках ГИСО была обнаружена аутокринная продукция FGF-2 лиганда и гиперэкспрессия рецептора FGFR1 [94]. Кроме того, в ИМ-резистентных клетках ГИСО продемонстрирована аутокринная продукция FGF-2 лиганда и гиперэкспрессия рецептора FGFR3. В этом случае комбинация ИМ с селективными ингибиторами рецептора FGFR3 обеспечивала апоптоз ИМ-резистентных клеток ГИСО [65]. В отличие от предыдущих исследований, полученные в настоящей работе результаты указывают на активацию FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО за счет изменения профиля активности рецепторных тирозинкиназ в опухолевых клетках. Вследствие ингибирующего эффекта таргетного препарата ИМ в отношении с-KIT-сигнального пути, в клетках ГИСО T1 компенсаторно возникает активация FGFR-сигнального пути за счет усиления аутокринной продукции FGF-2.

Поскольку аутокринная продукция FGF-2 лиганда увеличивалась в клетках ГИСО в присутствии ИМ, то далее исследовалась способность ИМ индуцировать активацию FGFR-сигналинга в указанных опухолевых клетках. Полученные результаты свидетельствуют, что таргетный препарат ИМ активировал FGFR-сигнальный путь в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R, в которых отсутствуют вторичных мутаций *KIT* (см. Рисунок 23). За счет активации FGFR-сигналинга в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R повышалась экспрессия нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT, играющих важную роль в процессах выживаемости, пролиферации и миграции опухолевых клеток. Данная точка зрения подтверждается тем фактом, что в присутствии комбинации ИМ и ингибиторов FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 МАТ и таргетного препарата BGJ398 – в клетках ГИСО T1-IM-R полностью подавлялось фосфорилирование рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2, что способствовало тотальному ингибированию фосфорилирования нерецепторных тирозинкиназ STAT1, MAPK и AKT и свидетельствует о нарушении жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток (см. Рисунок 23). Следовательно, ИМ за счет активации FGFR-сигналинга способствует прогрессированию роста данной опухоли и

развитию ее резистентности к таргетным препаратам, т.е. формированию агрессивного фенотипа клеток ГИСО с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*.

В отличие от клеток ГИСО T1-IM-R, таргетный препарат ИМ не вызвал значимого увеличения экспрессии фосфорилированных форм рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2 в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичных мутаций *KIT* (см. Рисунок 24). Тем не менее, в присутствии комбинации ИМ с ингибиторами FGFR-сигнального пути – анти-FGF-2 мАТ и BGJ398 – в клетках ГИСО 430 значимо снижалось фосфорилирование рецепторов FGFR1-2 и адаптерного белка FRS-2, что способствовало ингибированию фосфорилирования нерецепторных тирозинкиназ STAT1 и АКТ, участвующих в поддержании жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток. Следовательно, FGFR-сигнальный путь также имеет значение для поддержания жизнеспособности ИМ-резистентных клеток ГИСО, имеющих вторичные мутации *KIT*.

Полученные результаты о важной роли FGFR-сигнального пути в механизмах резистентности ГИСО к таргетным препаратам согласуются с литературными данными. Продемонстрировано, что за счет активации FGFR-сигнального пути развивалась вторичная резистентность клеток немелкоклеточного рака легких к gefitinibu – ингибитору рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) [97, 160]. В клетках немелкоклеточного рака легких под воздействием gefitiniba активизировалась аутокринная продукция FGF-2 лиганда. За счет активации FGFR-сигнального пути резко снижался цитотоксический и антипролиферативный эффект gefitiniba в отношении клеток немелкоклеточного рака легких [160]. За счет активации FGFR-сигнального пути развивается резистентность опухолевых клеток не только к таргетным препаратам, но и к химиопрепаратам. Продемонстрировано, что присутствие FGF-2 в культуральной среде опухолевых клеток простаты снижало их чувствительность к химиопрепаратам – паклитакселу, доксорубину, 5-фторурацилу. При добавлении в культуру анти-FGF-2 мАТ

чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам восстанавливалась [97]. Аналогичным образом, высокая экспрессия FGF-2 в клетках хронического лимфолейкоза сопровождалась их резистентностью к химиопрепаратам и являлась неблагоприятным прогностическим признаком [81]. Повышенный уровень FGF-2 в плазме больных различными злокачественными новообразованиями (лейкозы, лимфомы, рак молочной железы, рак легких, колоректальный рак и др.) является признаком прогрессирования заболевания и высоко риска развития метастазов [125, 213]. Продemonстрировано, что высокий уровень FGF-2 в плазме больных почечноклеточной карциномой указывает на позднюю стадию заболевания, наличие метастазов и является крайне неблагоприятным прогностическим признаком [139]. Следовательно, компоненты FGFR-сигнальный путь является потенциальной мишенью для разработки стратегий таргетной терапии большого количества разнообразных злокачественных новообразований.

Активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО могла быть обусловлена структурной и функциональной взаимосвязью тирозинкиназных рецепторов c-KIT, FGFR1 и FGFR2. В связи с этим, было предпринято исследование взаимосвязи указанных рецепторов в ИМ-резистентных клетках ГИСО методом коиммунопреципитации и иммунофлуоресцентной микроскопии.

Полученные результаты указывают на наличие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами c-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*. Структурная взаимосвязь тирозинкиназных рецепторов c-KIT, FGFR1 и FGFR2 подтверждается коиммунопреципитацией рецепторов и высокой степенью их ко-локализации (см. Рисунок 25, 26). На функциональную взаимосвязь между тирозинкиназными рецепторами c-KIT, FGFR1 и FGFR2 указывает значимое увеличение интенсивности флуоресценции рецепторов и повышение степени их ко-локализации в присутствии таргетного препарата ИМ. Кроме того, на функциональную взаимосвязь тирозинкиназных

рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 указывает значимое снижение интенсивности флуоресценции рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в присутствии комбинации ИМ с BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4), свидетельствующее об ингибировании с-KIT- и FGFR-сигнальных путей (см. Рисунок 27). В тоже время, в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаружилось структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2, что подтверждается отсутствием коиммунопреципитации рецепторов и низкой степенью их ко-локализации (см. Рисунок 25, 26).

Поскольку в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*, была обнаружена структурная и функциональная взаимосвязь тирозинкиназных рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2, то далее исследовалась способность ингибиторов FGFR-рецепторов модулировать чувствительность указанных клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ. При отдельном ингибировании с-KIT-сигнального пути или FGFR-сигнального пути отсутствовала гибель опухолевых клеток ГИСО T1-IM-R. Напротив, одновременное ингибирование с-KIT-сигнального пути и FGFR-сигнального пути за счет использования комбинации таргетного препарата ИМ (ингибитор с-KIT) с селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) оказывало цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R (см. Рисунок 30, 31, 33, 34). Развитие указанных эффектов было обусловлено синергетическим взаимодействием указанных препаратов, которое было следствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в клетках ГИСО T1-IM-R (см. Таблица 7, 8). 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. Кроме того, было обнаружено, что препарат U0126, являясь селективным ингибитором MAPK-киназы, также способствовал восстановлению

чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R к таргетному препарату ИМ. Следовательно, активация МАРК-киназы является ключевым механизмом, обеспечивающим пролиферацию ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R (см. Рисунок 32).

Полученные результаты свидетельствуют, что в клетках ГИСО 430, резистентных к ИМ за счет вторичной мутации *KIT*, не обнаружилось структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 (отсутствие коиммунопреципитации рецепторов и низкая степень их ко-локализации). Поэтому комбинация препаратов ИМ и BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) не оказывала цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении клеток ГИСО 430 (см. Рисунок 35, 36). Между препаратами ИМ и BGJ398 не наблюдалось синергетического взаимодействия, что было обусловлено отсутствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в клетках ГИСО 430 (см. Таблица 9).

Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии свидетельствуют, что в популяции ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R присутствуют клетки с различным уровнем экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT: 1) Клетки с высокой экспрессией с-KIT составляли 65% популяции; 2) Клетки со сниженной экспрессией с-KIT составляли 25% популяции; 3) Клетки, у которых экспрессии с-KIT отсутствовала (т.е. с-KIT-негативные клетки) составляли 15% популяции (см. Рисунок 37).

Таким образом, ИМ-резистентные клетки ГИСО T1-ИМ-R являются гетерогенной популяцией, состоящей из клонов опухолевых клеток, имеющих различную выраженность экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT. На основании полученных результатов было принято решение провести клонирование ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R с целью получения *KIT*-негативной клеточной линии ГИСО. Через 6 месяцев экспериментов с клонами ИМ-резистентной клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R

была получена *KIT*-негативная клеточная линия ГИСО, которая получила обозначение ГИСО T1-IM-R-2 [233]. 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 *c-KIT* (см. Рисунок 38Б-В). Кроме того, методом ПЦР было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2 отсутствует экспрессия *KIT* (см. Рисунок 38Г). С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии было обнаружено, что в клетках ГИСО T1-IM-R-2, в отличие от клеток ГИСО T1-IM-R, отсутствует свечение тирозинкиназного рецептора *c-KIT* (см. Рисунок 39А-Б). Методом проточной цитометрии было обнаружено отсутствие экспрессии тирозинкиназного рецептора *c-KIT* в клетках ГИСО T1-IM-R-2 (см. Рисунок 39В). Подобно ИМ-резистентным клеткам ГИСО T1-IM-R, клетки ГИСО T1-IM-R-2 сохраняли жизнеспособность в присутствии ИМ (таргетный препарат не вызывал их апоптоз). Значение IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R-2 незначительно отличается от значения IC_{50} ИМ для клеточной линии ГИСО T1-IM-R и более чем в 400 раз превышает значение IC_{50} ИМ для ИМ-чувствительной клеточной линии ГИСО T1 (см. Таблица 10). Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о наличии резистентности к ИМ у опухолевых клеток *KIT*-негативной линии ГИСО T1-IM-R-2.

Полученные результаты свидетельствуют, что в ИМ-резистентных *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-IM-R-2 отмечается значимое увеличение активации FGFR-сигнального пути по сравнению ИМ-резистентными клетками ГИСО T1-IM-R, в которых экспрессия *KIT* сохранена. В ИМ-резистентных *KIT*-негативных клетках ГИСО T1-IM-R-2 была обнаружена повышенная экспрессия FGF-2 лиганда, фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1 и FGFR2, фосфорилированной формы белка FRS-2, а также повышенная экспрессия *FGF-2*, *FGFR1*, *FGFR2* (см. Рисунок 41, 42). Препараты BGJ398, AZD4547 и TAS-120, являясь селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, оказывали цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных *KIT*-негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2 (см. Рисунок 44, 45). Апоптоз ИМ-

резистентных *KIT*-негативных 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 (см. Таблица 11). Поскольку в клетках ГИСО T1-IM-R-2 отсутствует экспрессия *KIT*, то для индукции их апоптоза не требуется использования комбинации ИМ с селективными ингибиторами рецепторов FGFR1-4, достаточно применение только самих селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4. На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, в отсутствии экспрессии *KIT* ключевое значение для обеспечения выживаемости и пролиферации ИМ-резистентных клеток ГИСО приобретает FGFR-сигнальный путь.

Полученные результаты согласуются с литературными данными. В настоящее время гетерогенность опухолевой ткани, т.е. присутствие в ее составе генотипически и фенотипически различных клонов опухолевых клеток, является признанным фактом. За счет клонов опухолевых клеток с разными генотипическими и фенотипическими свойствами обеспечивается резистентность опухоли к таргетным и химиопрепаратам. Гетерогенность опухолевой ткани обнаружена при меланоме, лейкозах, колоректальном раке, глиобластоме и др. злокачественных новообразованиях [60]. Продемонстрировано формирование клонов с различными вторичными мутациями *KIT* у пациентов с диссеминированными ГИСО в процессе терапии ИМ [123, 191]. В настоящей работе показано формирование клонов ГИСО с различным уровнем экспрессии тирозинкиназного рецептора с-*KIT* на фоне длительного культивирования клеток с таргетным препаратом ИМ. В результате в составе ГИСО появились клоны с аутокринной продукцией FGF-2 и активацией FGFR-сигнального пути, что в итоге обеспечило развитие вторичной резистентности ГИСО к ИМ. Полученные результаты указывают на возможность применения селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) для таргетной терапии ИМ-резистентных ГИСО, имеющих низкую экспрессию или полное отсутствие

экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT и гиперэкспрессию маркеров FGFR-сигнального пути. Показано что на фоне терапии ИМ формируется клональная гетерогенность не только ГИСО. В частности, у пациентов с хроническим миелолейкозом, получающих ИМ, также отмечены случаи клональной гетерогенности опухоли, что сопровождалось развитием резистентностью к таргетному препарату [67].

Полученные результаты свидетельствуют о наличии активации VEGFR-сигнального в ИМ-резистентных клеточных линиях ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430, что проявлялось повышением концентрации VEGF-A лиганда в супернатантах клеточных культур, увеличением экспрессии фосфорилированных и общих форм рецепторов VEGFR1-2, гиперэкспрессией VEGF-A, VEGFR1 и VEGFR2 в опухолевых клетках (см. Рисунок 8, 11, 46). ИМ-резистентные клеточные линии ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 обладают резистентностью к ингибиторам VEGFR-сигнального пути (СУ и РЕГО). Значения IC_{50} СУ и IC_{50} РЕГО для клеточных линий ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 значительно превышают аналогичные показатели для ИМ-чувствительной линии ГИСО T1 (см. Таблица 13). Следовательно, у клеток ГИСО в процессе развития вторичной резистентности к таргетному препарату ИМ сформировалась вторичная резистентность к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО.

FGF-2 лиганд индуцировал в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 аутокринную продукцию VEGF-A лиганда (см. Рисунок 47, 48). В свою очередь, VEGF-A лиганд способствовал гиперэкспрессии рецепторов VEGFR1-2 в клетках ГИСО T1. Связывание VEGF-A лиганда с рецепторами VEGFR1-2 обеспечивало активацию VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1. Показано, что VEGF-A лиганд запускает в клетках сигнальные каскады (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR), обеспечивающие их пролиферацию и выживаемость [162, 212]. Следовательно, в присутствии FGF-2 лиганда в клетках ГИСО T1 происходила активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, которые обеспечивали активацию внутриклеточных сигнальных каскадов (JAK-STAT,

RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR) и развитие пролиферации опухолевых клеток.

Полученные результаты свидетельствуют, что таргетный препарат ИМ в субтоксической концентрации 0,02 мкмоль/л индуцировал в клетках ГИСО Т1 аутокринную продукцию VEGF-A лиганда (см. Рисунок 47, 48). Под влиянием субтоксической концентрации ИМ (0,02 мкмоль/л) в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 нарастала аутокринная продукция FGF-2 лиганда и повышалась экспрессия фосфорилированных и общих форм его рецепторов FGFR1 и FGFR2 (см. Рисунок 14, 15, 17). Следовательно, таргетный препарат ИМ индуцировал активацию VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 за счет стимуляции аутокринной продукции FGF-2 лиганда опухолевыми клетками. Таким образом, активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 развивается в процессе развития их вторичной резистентности к ИМ с целью обеспечения пролиферации и выживаемости опухолевых клеток в присутствии таргетного препарата.

Было обнаружено, что FGF-2 лиганд индуцировал аутокринную продукцию VEGF-A лиганда в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 (см. Рисунок 49). При этом FGF-2-опосредованная продукция VEGF-A была значимо более выражена в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R. Следовательно, в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* отмечается аутокринная продукция FGF-2 лиганда и активация FGFR-сигнального пути, а также аутокринная продукция VEGF-A лиганда и активация VEGFR-сигнального пути. За счет FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО Т1-ИМ-R отмечалась активация сигнальных каскадов (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR), которые поддерживали пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток в условиях ИМ-опосредованного ингибирования с-KIT-сигнального пути.

В условиях нокдауна *KIT*, как и в присутствии FGF-2 лиганда, в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1 отмечалась активация VEGFR-сигнального пути, что подтверждалось увеличением экспрессии VEGF-A лиганда, а также фосфорилированных и общих форм его рецепторов VEGFR1-2 (см. Рисунок 50А-

В). Следовательно, при ингибировании с-KIT-сигнального пути (под влиянием субтоксической концентрации ИМ 0,02 мкмоль/л или трансфекции киРНК *KIT*) в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1 происходит активация VEGFR-сигнального пути. В условиях нокдауна *KIT* в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клетках ГИСО отмечалось значимое увеличение аутокринной продукции VEGF-A лиганда. Следует отметить, что в условиях нокдауна *KIT* наиболее значительное повышение концентрации VEGF-A лиганда (в 2,25 раза) отмечалось в супернатантах ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* (см. Рисунок 51А, Таблица 16). В условиях нокдауна *KIT* в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клетках ГИСО отмечалось значимое увеличение экспрессии VEGF-A. Следует отметить, что в условиях нокдауна *KIT* наиболее значительное повышение экспрессии VEGF-A (в 3,5 раза) отмечалось в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* (см. Рисунок 51).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в клетках ГИСО под влиянием таргетного препарата ИМ происходило снижение активности с-KIT-сигнального пути. В результате, в опухолевых клетках компенсаторно повышалась экспрессия FGF-2 лиганда и генов его рецепторов FGFR1-2. В следствие указанных изменений в клетках ГИСО увеличивалась аутокринная продукция FGF-2, который связываясь со своими рецепторами FGFR1-2 обеспечивал активацию FGFR-сигнального пути. В результате, в клетках ГИСО активизировались сигнальные каскады (JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT-mTOR), за счет которых происходила их пролиферация и выживаемость в условиях культивирования в присутствии ИМ. За счет активации FGFR-сигнального пути развивалась вторичная (приобретенная) резистентность клеток ГИСО к ИМ. В последствии, под влиянием FGF-2 лиганда в клетках ГИСО повышалась экспрессия VEGF-A и увеличивалась аутокринная продукция VEGF-A лиганда. Лиганд VEGF-A связывался со своими рецепторами VEGFR1-2 и способствовал активации VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО. VEGFR-сигнальный путь также способствовал активации сигнальных каскадов (RAS-

RAF-МАРК, PI3K-AKT-mTOR), которые обеспечивали пролиферацию клеток ГИСО.

Следовательно, развитие вторичной (приобретенной) резистентности клеток ГИСО к таргетному препарату ИМ в отсутствии вторичных мутаций *KIT* обусловлено изменением киназного профиля опухолевых клеток: снижением активности с-KIT-сигнального пути и повышением активности FGFR- и VEGFR-сигнальных путей. Важно отметить, что активация FGFR-сигнального пути является первичным событием, за счет которого происходит активация VEGFR-сигналинга в опухолевых клетках ГИСО (см. Рисунок 52).

Полученные результаты указывают на наличие структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R с отсутствующими вторичными мутациями *KIT*. Структурная взаимосвязь тирозинкиназных рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 подтверждается коиммунопреципитацией рецепторов и их высокой степенью ко-локализации. 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 коиммунопреципитации рецепторов и их низкой степенью ко-локализации (см. Рисунок 53, 54).

При отдельном ингибировании FGFR-сигнального пути или VEGFR-сигнального пути отсутствовала гибель опухолевых клеток ГИСО T1-IM-R. Напротив, одновременное ингибирование FGFR-сигнального пути и VEGFR-сигнального пути за счет использования комбинации селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) с ингибиторами рецепторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) оказывало цитотоксический и антипролиферативный эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R (см. Рисунок 55-58). Развитие указанных эффектов обусловлено синергетическим взаимодействием препаратов (СУ + BGJ398 и РЕГО + BGJ398), которое было следствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и

VEGFR1-2 в клетках ГИСО T1-IM-R (см. Рисунок 53, 54, Таблица 17). Следовательно, селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) способствовал восстановлению чувствительности (т.е. ресенсилизации) ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R к таргетным препаратам СУ и РЕГО.

Полученные результаты свидетельствуют, что 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 (отсутствие коиммунопреципитации рецепторов и низкая степень их ко-локализации) (см. Рисунок 53, 54). При отдельном ингибировании FGFR-сигнального пути или VEGFR-сигнального пути отсутствовала гибель опухолевых клеток ГИСО 430. Комбинации препаратов СУ + BGJ398 и РЕГО + BGJ398 также не оказывали цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении клеток ГИСО 430 (см. Рисунок 59).

Между ингибитором рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) и ингибиторами рецепторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) не наблюдалось синергетического взаимодействия, что было обусловлено отсутствием структурной и функциональной взаимосвязи между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО 430 (см. Рисунок 53, 54, Таблица 18).

Полученные результаты об активации FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО согласуются с литературными данными. Активация FGFR- и VEGFR-сигналинга наблюдается при развитии большого количества злокачественных новообразований и, как правило, указывает на прогрессирование заболевания [136]. В частности, повышенный уровень VEGF-A в плазме больных ГИСО указывает на неэффективность терапии ИМ [43, 197]. Показана взаимосвязь FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в опухолевых клетках. Например, в клетках рака молочной железы FGF-2 лиганд связываясь с рецептором FGFR1 усиливал продукцию VEGF-A и гиперэкспрессию рецептора VEGFR1 [217]. Кроме того, показано, что FGF-2 связываясь с внутриклеточной MAPK (ERK1/2)-киназой усиливал экспрессию рецептора VEGFR2 на мембране эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и клетках меланомы [90]. Показано, что за счет

аутокринной продукции опухолевыми клетками FGF-2 лиганда и VEGF-A в опухолевой ткани усиливался рост новых сосудов (ангиогенез). Добавление к к опухолевой ткани анти-VEGF антител подавляло развитие ангиогенеза [241]. Продemonстрировано, что FGF-2 секретируемый эндотелиальными клетками сосудов и перицитами играет важную роль в поддержании ангиогенеза в сосудистой сети опухоли и обуславливает резистентность опухолевых клеток к ингибиторам рецепторов VEGFR [36]. За счет аутокринной продукции FGF-2 и VEGF-A опухолевыми клетками в ткани создается специфическое микроокружение, которое припятствует нормальному противоопухолевому иммунному ответу. В частности, происходит формирование макрофагов M2 и опухоль-ассоциированных фибробластов, которые выделяя цитокины (интерлейкин 10, трансформирующий фактор роста-бета и др.) подавляют активность дендритных клеток, CD8⁺T-лимфоцитов, макрофагов M1 и NK-клеток [74, 118, 243]. При ингибировании FGFR- и VEGFR-сигнальных путей резко усиливается противоопухолевый иммунный ответ в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы [73, 225]. Продemonстрирована внутриклеточная взаимосвязь между FGFR- и VEGFR-сигнальными путями. В частности, адаптерный белок FGFR-сигнального пути FRS-2 способен активировать в эндотелиальных клетках кровеносных и лимфатических сосудов продукцию факторов роста эндотелия сосудов (VEGF-A и VEGF-C). Белок FRS-2 способен стимулировать активацию внутриклеточного белка GRB-2, который является компонентом различных сигнальных путей, в том числе, VEGFR-сигнального пути. При нокдауне *FRS-2* продукция VEGF-A резко снижалась и нарушалось формирование кровеносных и лимфатических сосудов в эмбриональном периоде [225].

На основании полученных результатов можно предложить следующую схему активации FGFR- и VEGFR- сигналинга в клетках ГИСО (Рисунок 60). В отсутствии вторичных мутаций *KIT* резистентность ГИСО к таргетным препаратам сформировалась за счет изменения киназного профиля опухолевых

клеток: снижения активности с-KIT-сигнального пути и повышения активности FGFR- и VEGFR-сигнальных путей.

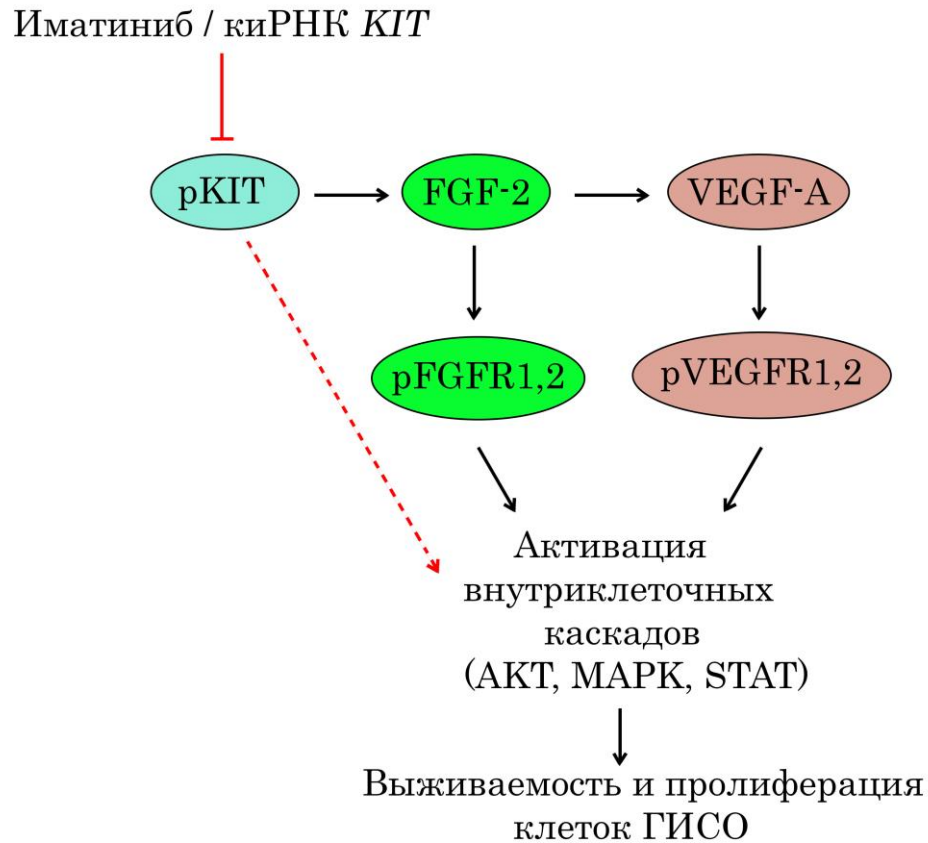


Рисунок 60 – Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО происходит вследствие ингибирования с-KIT-сигналинга за счет действия ИМ или нокдауна *KIT* с помощью киРНК *KIT*.

Активация FGFR- и VEGFR- сигналинга в клетках ГИСО возникала за счет аутокринной продукции опухолевыми клетками FGF-2 и VEGF-A лигандов. Важно отметить, что первично в клетках ГИСО отмечалась активация FGFR-сигнального пути. Далее под влиянием FGF-2 лиганда в клетках ГИСО повышалась экспрессия VEGF-A и увеличивалась аутокринная продукция VEGF-A лиганда. За счет активности FGFR- и VEGFR-сигнальных путей поддерживалась жизнеспособность и пролиферация клеток ГИСО в присутствии таргетного препарата ИМ. Поэтому комбинация ингибиторов с-KIT- и FGFR-

сигнальных путей (ИМ + BGJ398, ИМ + AZD4547, ИМ + TAS-120) может быть предложена в качестве таргетной терапии ИМ-резистентных ГИСО, в которых доказана активация FGFR- сигнального пути и отсутствуют вторичные мутации *KIT*.

В ИМ-резистентных клетках ГИСО с отсутствующими вторичными мутациями *KIT* за счет активности FGFR- и VEGFR-сигнальных путей сформировалась вторичная резистентность к ингибиторам VEGFR-сигнального пути – СУ и РЕГО. Поэтому комбинация ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигналинга (BGJ398 + СУ, BGJ398 + РЕГО) может быть предложена в качестве таргетной терапии ИМ-резистентных ГИСО, в которых доказана активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей и отсутствуют вторичные мутации *KIT*.

В настоящее время проводятся клинические испытания по изучению комбинированного использования ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в качестве второй и третьей линии терапии ИМ-резистентных ГИСО. Например, препарат анлотиниб (AL3818), являющийся ингибитором FGFR- и VEGFR-сигнальных путей, был одобрен в качестве препарата третьей линии терапии ИМ-резистентных ГИСО [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе изучена роль рецепторных и нерцепторных 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 нерцепторных (STAT1, MAPK- и AKT) 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 c-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 КИТ 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-КИТ, 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-КИТ-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-КИТ 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-КИТ. В иматиниб-резистентных КИТ-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 колониеобразование 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 СОКРАЩЕНИЙ

анти-FGF-2 мАТ – моноклональные антитела, нейтрализующие фактор роста фибробластов 2 типа (FGF-2)

АТ – антитело

ГИСО – гастроинтестинальная стромальная опухоль

ДОКС – доксорубин

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИМ – иматиниба мезилат

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

кДа – килодальтоны

киРНК – короткая интерферирующая рибонуклеиновая кислота

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

мАТ – моноклональные антитела

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

мл – миллилитр

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

л - литр

нм – нанометры

НТК – нерецепторные тирозинкиназы

ПАРП – поли-АДФ(рибоза)-полимераза

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЕГО – регорафениб

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТК – рецепторные тирозинкиназы

ср. арифм. – среднее арифметическое значение

станд. откл. – стандартное отклонение

станд. ош. – стандартная ошибка средней

СУ – сунитиниб

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ХМЛ – хронический миелолейкоз

AZD4547 – селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4

c-KIT – рецептор факторов роста тучных и стволовых клеток

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

BGJ398 – селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4

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

FRS-2 – мембранный адаптерный белок, передающий сигнал от рецептора фактора роста фибробластов к нижележащим цитоплазматическим белкам

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

MK2206 – селективный ингибитор нерецепторной АКТ-киназы

«р» приставка – указывает на фосфорилированную форма белка

PDGFR α – α -рецептор тромбоцитарного фактора роста

PDGFR β – β -рецептор тромбоцитарного фактора роста

t° - температура

TAS-120 – селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4

U0126 – селективный ингибитор нерецепторной MAPK-киназы

VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов, лиганд рецепторов VEGF1-2

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахметзянов, Ф. Ш. Молекулярно-генетические особенности гастроинтестинальных стромальных опухолей / Ф. Ш. Ахметзянов, С. В. Петров, Д. Д. Халиков // Вопросы онкологии. – 2019. – Т. 65, № 1. – С. 69-76.
2. Бойчук, С. В. Гастроинтестинальные стромальные опухоли: современные проблемы патогенеза и терапии: монография / С. В. Бойчук. – Казань: МеДДок, 2017. – 96 с.
3. Галембикова, А. Р. Механизмы резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к иматинибу / А. Р. Галембикова, С. В. Бойчук // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99, № 6. – С. 959-965.
4. Гастроинтестинальные стромальные опухоли / Е. А. Дубова, А. И. Щеголев, О. Д. Мишнев, Г. Г. Кармазановский // Медицинская визуализация. – 2007. – № 1. – С. 25.
5. Гастроинтестинальные стромальные опухоли / М. П. Никулин, П. П. Архири, А. А. Мещеряков [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13, № 3s2-1. – С. 580-588.
6. Генетические нарушения в стромальных опухолях ЖКТ / Е. М. Бардина, И. С. Беляков, И. В. Цыганова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55. – С. 5-6.
7. Значение мутаций гена С-KIT в диагностике и прогнозе течения злокачественных опухолей / Т. Г. Рукша, Е. Ю. Сергеева, Ю. А. Фефелова, В. А. Хоржевский // Архив патологии. – 2021. – Т. 83, № 4. – С. 61-68.
8. Клинико-морфологические характеристики пациентов гастроинтестинальной стромальной опухолью с дефицитом сукцинатдегидрогеназы / В. В. Югай, М. П. Никулин, Н. А. Козлов [и др.] // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № 5. – С. 614-621.
9. Копп, М. В. Мультидисциплинарный подход в диагностике и лечении гастроинтестинальных стромальных опухолей / А. М. Королева, М. В. Копп // Злокачественные опухоли. – 2013. – № 1. – С. 15-27.

10. Королева, А. М. Вторая линия терапии гастроинтестинальных стромальных опухолей: ожидает ли нас выбор? / А. М. Королева, Л. М. Когония // Медицинский совет. – 2019. – № 10. – С. 28-36.
11. Мазуренко, Н. Н. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей / Н. Н. Мазуренко, И. В. Цыганова // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 1, № 2. – С. 29-40.
12. Никулин, М. П. Гастроинтестинальные стромальные опухоли: обзор материалов ASCO 2010 / М. П. Никулин, И. С. Стилиди // Современная онкология. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 8-11.
13. Никулин, М. П. Стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта / М. П. Никулин // Эффективная фармакотерапия. – 2012. – Т. 10, № 36-2. – С. 12-21.
14. Оценка предсказательной значимости рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста VEGFR-2 у больных тройным негативным раком молочной железы / Н. Н. Бабышкина, М. В. Завьялова, О. Д. Брагина [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т. 15, № 5. – С. 9-17.
15. 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.
16. Перспективы терапевтического воздействия на сигнальный путь FGFR / М. Ю. Федянин, Д. Н. Хмелькова, Т. С. Серебрянская [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – № 1. – С. 27-38.
17. Прогностическое значение мутаций KIT и PDGFRA в гастроинтестинальных стромальных опухолях / И. В. Цыганова, И. С. Беляков, О. А. Анурова, Н. Н. Мазуренко // Молекулярная медицина. – 2015. – Т. 2. – С. 64-70.
18. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях / М. Ю. Федянин, Д. Н. Хмелькова, Т. С. Серебрянская [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2014. – № 4. – С. 19-34.

19. Родионов, Е. О. Клиническое наблюдение применения МЕТ-ингибитора капматиниба у пациента с немелкоклеточным раком легкого / Е. О. Родионов, С. В. Миллер // Онкология. Журнал им. П. А. Герцена. – 2023. – Т. 12, № 3. – С. 76-80.
20. Роль рецепторов VEGFR в неопластическом ангиогенезе и перспективы терапии опухолей мозга / А. А. Корчагина, С. А. Шеин, О. И. Гурина, В. П. Чехонин // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 11. – С. 104-114.
21. Современные представления о молекулярных механизмах в онкогенезе гастроинтестинальных стромальных опухолей / Д. Ю. Гвалдин, Е. П. Омельчук, Н. Н. Тимошкина [и др.] // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66, № 1. – С. 13-22
22. Спектр нежелательных явлений при терапии диссеминированных гастроинтестинальных стромальных опухолей сунитинибом / А. М. Королева, Л. М. Когония, И. А. Королева, М. В. Копп // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – № 11. – С. 6-10.
23. Триада Карнея: литературные данные и опыт наблюдения / Т. Р. Алексеева, А. И. Карселадзе, Б. И. Долгушин [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 22, № 3. – С. 103-109.
24. Халиков, Д. Д. Клинико-морфологическая характеристика гастроинтестинальных стромальных опухолей / Д. Д. Халиков, Ф. Ш. Ахметзянов, С. В. Петров // Архив патологии. – 2017. – № 4. – С. 48-55.
25. Цыганова, И. В. Морфологические особенности и критерии прогноза стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта / И. В. Цыганова, О. А. Анурова, Н. Н. Мазуренко // Архив патологии. – 2011. – Т. 73, № 6. – С. 37-42.
26. Чуров, А. В. Нейрофиброматоз I типа (болезнь Реклингхаузена) / А. В. Чуров // ГЕНОКАРТА. Генетическая энциклопедия : сайт. – URL: https://www.genokarta.ru/disease/Nejrofibromatoz_I_tipa_bolezn_Reklinghauzena (дата обращения: 12.05.2025).

27. A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient / E. Tamborini, L. Bonadiman, A. Greco [et al.] // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 127, № 1. – P. 294-299.
28. 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.
29. A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors / L. L. Chen, J. C. Trent, E. F. Wu [et al.] // *Cancer Res*. – 2004. – Vol. 64, № 17. – P. 5913-5919.
30. A phase 1 study of regorafenib and sildenafil in adults with advanced solid tumors / A. S. Poklepovic, S. W. Gordon, S. Kothadia [et al.] // *Anticancer Drugs*. – 2024. – Vol. 35, № 5. – P. 450-458.
31. A phase II trial of regorafenib in patients with metastatic and/or a unresectable gastrointestinal stromal tumor harboring secondary mutations of exon 17 / C. N. Yeh, M. H. Chen, Y. Y. Chen [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 27. – P. 44121-44130.
32. A smooth muscle-derived, Braf-driven mouse model of gastrointestinal stromal tumor (GIST) : evidence for an alternative GIST cell-of-origin / J. Kondo, W. J. Huh, J. L. Franklin [et al.] // *The Journal of pathology*. – 2020. – Vol. 252, № 4. – P. 441-450.
33. A subset of gastrointestinal stromal tumors previously regarded as wild-type tumors carries somatic activating mutations in KIT exon 8 (p.D419del) / S. Huss, H. Künstlinger, E. Wardelmann [et al.] // *Mod Pathol*. – 2013. – Vol. 26, № 7. – P. 1004-1012.
34. An HIF-1 α /VEGF-A axis in cytotoxic T cells regulates tumor progression / A. Palazon, P. A. Tyrakis, D. Macias [et al.] // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 32. – P. 669-683.
35. An over view on molecular biology of KIT/PDGFRA wild type (WT) gastrointestinal stromal tumours (GIST) / M. Nannini, G. Biasco, A. Astolfi [et al.] // *J Med Genet*. – 2013. – Vol. 50, № 10. – P. 653-661.

36. Activated FGF2 signaling pathway in tumor vasculature is essential for acquired resistance to anti-VEGF therapy / K. Ichikawa, S. Watanabe Miyano, Y. Minoshima [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – P. 2939.
37. Activated tyrosine kinases in gastrointestinal stromal tumor with loss of KIT oncoprotein expression / Y. Tu, R. Zuo, N. Ni [et al.] // *Cell Cycle.* – 2018. – Vol. 17, № 23. – P. 2577-2592.
38. Advances in immunology and immunotherapy for mesenchymal gastrointestinal cancers / B. Li, H. Chen, S. Yang [et al.] // *Mol Cancer.* – 2023. – Vol. 22, № 1. – P. 71.
39. AKT as a Therapeutic Target for Cancer / M. Song, A. M. Bode, Z. Dong, M. H. Lee // *Cancer Res.* – 2019. – Vol. 79, № 6. – P. 1019-1031.
40. Altered chromosomal topology drives oncogenic programs in SDH-deficient GISTs / W. A. Flavahan, Y. Drier, S. E. Johnstone [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 575, № 7781. – P. 229-233.
41. Anlotinib: A novel multi-targeting tyrosinekinase inhibitor in clinical development / G. Shen, F. Zheng, D. Ren [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2018. – Vol. 11. – P. 120.
42. Apte, R. S. VEGF in Signaling and Disease : Beyond Discovery and Development / R. S. Apte, D. S. Chen, N. Ferrara // *Cell.* – 2019. – Vol. 176, № 6. – P. 1248-1264.
43. Association of intratumoral vascular endothelial growth factor expression and clinical outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate / J. C. McAuliffe, A. J. Lazar, D. Yang [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13. – P. 6727-6734.
44. Basic Knowledge in Soft Tissue Sarcoma / K. Bourcier, A. Le Cesne, L. Tselikas [et al.] // *Cardiovasc Intervent Radiol.* – 2019. – Vol. 42, № 9. – P. 1255-1261.
45. Berenbaum, M.C. What is synergy? / M.C. Berenbaum // *Pharmacol. Rev.* – 1989. – Vol. 41. – P. 93–141.
46. Bliss, C.I. The toxicity of poisons applied jointly / C.I. Bliss // *Ann. Appl. Biol.* – 1939. – Vol. 26. – P. 585–615.

47. Boichuk, S. New developments in management of gastrointestinal stromal tumors : regorafenib, the new player in the team / S. Boichuk, J. Rausch, A. Duensing // *Gastrointestinal Cancer : Targets and Therapy*. – 2014. – Vol. 4. – P. 1-10.
48. Boikos, S. A. The genetic landscape of gastrointestinal stromal tumor lacking KIT and PDGFRA mutations / S. A. Boikos, C. A. Stratakis // *Endocrine*. – 2014. – Vol. 47, № 2. – P. 401-408.
49. Brčić, I. Update on Molecular Genetics of Gastrointestinal Stromal Tumors / I. Brčić, A. Argyropoulos, B. Liegl-Atzwanger // *Diagnostics (Basel)*. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 194.
50. CD117 : a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34 / M. Sarlomo-Rikala, A. J. Kovatich, A. Barusevicius, M. Miettinen // *Mod. Pathol.* – 1998. – Vol. 11, № 8. – P. 728-734.
51. Characterization and assessment of the sensitivity and resistance of a newly established human gastrointestinal stromal tumour xenograft model to treatment with tyrosinkellye kinase inhibitors / T. Van Looy, Y. K. Gebreyohannes, A. Wozniak [et al.] // *Clin Sarcoma Res*. – 2014. – Vol. 4, № 10. – P. 1-9.
52. Chromosomal aberrations in primary PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors / I. M. Schaefer, C. Delfs, S. Cameron [et al.] // *Hum Pathol*. – 2014. – Vol. 45, № 1. – P. 85-97.
53. Chua, W. J. Gastrointestinal : Carney's triad complicated by a metastasized and bleeding gastrointestinal stromal tumor / W. J. Chua, K. Karasinghe, D. Tan // *J Gastroenterol Hepatol*. – 2021. – Vol. 36, № 3. – P. 587.
54. C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors / S. Sakurai, T. Fukasawa, J. Chong [et al.] // *Jpn. J. Cancer Res*. – 1999. – Vol. 90. – P. 1321-1328.
55. Clark, J. F. FRS2-independent GRB2 interaction with FGFR2 is not required for embryonic development / J. F. Clark, P. Soriano // *Biol Open*. – 2023. – Vol. 12, № 7. – P. 1-5.
56. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase

subunits SDHB, SDHC, and SDHD / B. Pasini, S. R. Mc Whinney, T. Bei [et al.] // European Journal of Human Genetics. – 2008. – Vol. 16, № 1. – P. 79-88.

57. Clinicopathological and therapeutic analysis of PDGFRA mutated gastrointestinal stromal tumor / W. Huang, W. Yuan, L. Ren [et al.] // Pathol Res Pract. – 2022. – Vol. 239. – P. 154138.

58. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations : a multicenter study on 54 cases / J. Lasota, C. L. Corless, M. C. Heinrich [et al.] // Mod. Pathol. – 2008. – Vol. 21, № 4. – P. 476-484.

59. Clinical-radiomics-based treatment decision support for KIT Exon 11 deletion in gastrointestinal stromal tumors : a multi-institutional retrospective study / Y. Zhang, X. Yue, P. Zhang [et al.] // Front Oncol. – 2023. – Vol. 13. – P. 1193010.

60. McGranahan, N. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution : Past, Present, and the Future / N. McGranahan, C. Swanton // Cell. – 2017. – Vol. 168, № 4. – P. 613-628.

61. Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor / T. Taguchi, H. Sonobe, S. Toyonaga [et al.] // Laboratory investigation. – 2002. – Vol. 82, № 5. – P. 663-665.

62. Copy-neutral loss of heterozygosity and chromosome gains and losses are frequent in gastrointestinal stromal tumors / N. Lourenço, Z. Hélias-Rodzewicz, J. B. Bachet [et al.] // Mol Cancer. – 2014. – Vol. 13. – P. 246.

63. Corless, C. L. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas / C. L. Corless, M. C. Heinrich // Annu Rev Pathol. – 2008. – Vol. 3. – P. 557-586.

64. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor : CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group / M. C. Heinrich, K. Owzar, C. L. Corless [et al.] // J Clin Oncol. – 2008. – Vol. 26, № 33. – P. 5360-5367.

65. Crosstalk between KIT and FGFR3 Promotes Gastrointestinal Stromal Tumor Cell Growth and Drug Resistance / N. Javidi-Sharifi, E. Traer, J. Martinez [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 75. – P. 880-891.
66. Current clinical management of gastrointestinal stromal tumor / K. Akahoshi, M. Oya, T. Koga, Y. Shiratsuchi // *World J Gastroenterol.* – 2018. – Vol. 24, № 26. – P. 2806-2817.
67. Cytogenetic characterization and proteomic profiling of the imatinib-resistant cell line KCL22-R / J. Rosenhahn, A. Weise, S. Michel [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2007. – Vol. 31. – P. 121-128.
68. Cytoreductive surgery in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated with sunitinib malate / C. P. Raut, Q. Wang, J. Manola [et al.] // *Ann Surg Oncol.* – 2010. – Vol. 17, № 2. – P. 407-415.
69. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations / K. A. Janeway, S. Y. Kim, M. Lodish [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108, № 1. – P. 314-318.
70. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour : a retrospective analysis / J. S. Gold, M. Gönen, A. Gutiérrez [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2009. – Vol. 10, № 11. – P. 1045-1052.
71. Diagnosis, prognosis and treatment of patients with gastrointestinal stromal tumour (GIST) and germline mutation of KIT exon 13 / J. B. Bachet, B. Landi, P. Laurent-Puig [et al.] // *Eur J Cancer.* – 2013. – Vol. 49, № 11. – P. 2531-2541.
72. Driver gene alterations and activated signaling pathways toward malignant progression of gastrointestinal stromal tumors / K. Ohshima, K. Fujiya, T. Nagashima [et al.] // *Cancer Sci.* – 2019. – Vol. 110, № 12. – P. 3821-3833.
73. Dual FGFR and VEGFR inhibition synergistically restrain hexokinase 2-dependent lymphangiogenesis and immune escape in intrahepatic cholangiocarcinoma / M. Peng, H. Li, H. Cao [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2023. – Vol. 58. – P. 908-924.
74. Dual Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibition Elicits Antitumor Immunity and Enhances Programmed Cell

Death-1 Checkpoint Blockade in Hepatocellular Carcinoma / H. Deng, A. Kan, N. Lyu [et al.] // *Liver Cancer*. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. 338-357.

75. Duan, Y. Therapeutic Potential of PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastrointestinal Stromal Tumors : Rationale and Progress / Y. Duan, J. Haybaeck, Z. Yang // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 2972.

76. Duensing, S. Targeted therapies of gastrointestinal stromal tumors (GIST)--the next frontiers / S. Duensing, A. Duensing // *Biochem Pharmacol*. – 2010. – Vol. 80, № 5. – P. 575-583.

77. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor / H. Joensuu, P. J. Roberts, M. Sarlomo-Rikala [et al.] // *N Engl J Med*. – 2001. – Vol. 344, № 14. – P. 1052-1056.

78. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID) : an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / G. D. Demetri, P. Reichardt, Y. K. Kang [et al.] // *Lancet*. – 2013. – Vol. 381, № 9863. – P. 295-302.

79. Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib : a multicenter phase II trial / S. George, Q. Wang, M. C. Heinrich [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2012. – Vol. 30, № 19. – P. 2401-2407.

80. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib : a randomised controlled trial / G. D. Demetri, A. T. van Oosterom, C. R. Garrett [et al.] // *Lancet*. – 2006. – Vol. 368, № 9544. – P. 1329-1338.

81. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine / T. Menzel, Z. Rahman, E. Calleja [et al.] // *Blood*. – 1996. – Vol. 87. – P. 1056-1063.

82. El-Menyar, A. Diagnosis and management of gastrointestinal stromal tumors : An up-to-date literature review / A. El-Menyar, A. Mekkodathil, H. Al-Thani // *J Cancer Res Ther*. – 2017. – Vol. 13, № 6. – P. 889-900.

83. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics : opportunities and challenges / D. Fukumura, J. Kloepper, Z. Amoozgar [et al.] // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 15. – P. 325-340.

84. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, the Italian Sarcoma Group ; Australasian Gastrointestinal Trials Group. Outcome of patients with advanced gastrointestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg / J. R. Zalcberg, J. Verweij, P. G. Casali [et al.] // *Eur J Cancer.* – 2005. – Vol. 41, № 12. – P. 1751-1757.

85. ETV6:NTRK3 Fusion-Positive Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) with Abundant Lymphoid Infiltration (TILs and Tertiary Lymphoid Structures) : A Report on a New Case with Therapeutic Implications and a Literature Review / I. Machado, R. Claramunt-Alonso, J. Lavernia [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 7. – P. 3707.

86. Evolving role of regorafenib for the treatment of advanced cancers / A. Grothey, J. Y. Blay, N. Pavlakakis [et al.] // *Cancer Treat Rev.* – 2020. – Vol. 86. – P. 101993.

87. Exon 11 homozygous mutations and intron 10/exon 11 junction deletions in the KIT gene are associated with poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors / Y. Y. Shen, X. L. Ma, M. Wang [et al.] // *Cancer Med.* – 2020. – Vol. 9, № 18. – P. 6485-6496.

88. Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation : association with a germline mutation of the c-kit gene / H. Maeyama, E. Hidaka, H. Ota [et al.] // *Gastroenterology.* – 2001. – Vol. 120, № 1. – P. 210-215.

89. Familial PDGFRA-mutation syndrome : somatic and gastrointestinal phenotype / P. N. Manley, S. Abu-Abed, R. Kirsch [et al.] // *Human Pathology.* – 2018. – Vol. 76. – P. 52-57.

90. FGF-dependent egulation of VEGF receptor 2 expression in mice / M. Murakami, L. T. Nguyen, K. Hatanaka [et al.] // *J. Clin. Investig.* – 2011. – Vol. 121. – P. 2668-2678.

91. FGF/FGFR signaling in health and disease / Y. Xie, N. Su, J. Yang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 181.
92. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in «Wild-Type» gastrointestinal stromal tumors / E. Shi, J. Chmielecki, C. M. Tang [et al.] // *J Transl Med.* – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 339.
93. FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer / K. Wang, W. Ji, Y. Yu [et al.] // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37. – P. 5340-5354.
94. FGFR-Mediated Reactivation of MAPK Signaling Attenuates Antitumor Effects of Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumors / F. Li, H. Huynh, X. Li [et al.] // *Cancer Discov.* – 2015. – Vol. 5. – P. 438-451.
95. FGF-2 is a driving force for chromosomal instability and a stromal factor associated with adverse clinico-pathological features in prostate cancer / C. Pecqueux, A. Arslan, M. Heller [et al.] // *Urol Oncol.* – 2018. – Vol. 36, № 8. – P. 365.
96. 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. Galembicova [et al.] // *Cancers.* – 2024. – Vol. 16, № 17. – P. 3103.
97. Fibroblast growth factors : An epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs / S. Song, M. G. Wientjes, Y. Gan, J. L. Au // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8658-8663.
98. Fibroblast growth factors, old kids on the new block / X. Li, C. Wang, J. Xiao [et al.] // *Semin Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol. 53. – P. 155-167.
99. Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contact-dependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin $\alpha\beta 5$ -mediated adhesion / S. Knuchel, P. Anderle, P. Werfelli [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6. – P. 14300-14317.
100. Focal adhesion kinase-YAP signaling axis drives drug-tolerant persister cells and residual disease in lung cancer / F. Haderk, Y. T. Chou, L. Cech [et al.] // *Nat Commun.* – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 3741.

101. Frequencies of KIT and PDGFRA mutations in the MolecGIST prospective population-based study differ from those of advanced GISTs / J. F. Emile, S. Brahimi, J. M. Coindre [et al.] // *Med Oncol.* – 2012. – Vol. 29, № 3. – P. 1765-1772.
102. Frequent KIT mutations in human gastrointestinal stromal tumors / Z. Xu, X. Huo, C. Tang [et al.] // *Sci Rep.* – 2014. – Vol. 4. – P. 5907.
103. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors / S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 279, № 5350. – P. 577-580.
104. Gastric and Small Intestine Gist : Results of 156 Cases in 20 Years / S. Lopez Gordo, C. Bettonica, M. Miró [et al.] // *J Gastrointest Cancer.* – 2022. – Vol. 53, № 2. – P. 451-459.
105. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors : findings in 104 cases / L. Zhang, T. C. Smyrk, W. F. Young Jr [et al.] // *The American journal of surgical pathology.* – 2010. – Vol. 34, № 1. – P. 53.
106. Gastrointestinal stromal tumors : a comprehensive review / T. M. Parab, M. J. DeRogatis, A. M. Boaz [et al.] // *J Gastrointest Oncol.* – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 144-154.
107. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I / T. Nishida, M. Tsujimoto, T. Takahashi [et al.] // *Journal of Gastroenterology.* – 2016. – Vol. 51. – P. 571-578.
108. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1 : a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases / M. Miettinen, J. F. Fetsch, L. H. Sobin, J. Lasota // *The American journal of surgical pathology.* – 2006. – Vol. 30, № 1. – P. 90-96.
109. Gastrointestinal stromal tumours / J. Y. Blay, Y. K. Kang, T. Nishida, M. von Mehren // *Nat Rev Dis Primers.* – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 22.
110. Gastrointestinal stromal tumors : molecular markers and genetic subtypes / C. M. Barnett, C. L. Corless, M. C. Heinrich [et al.] // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2013. – Vol. 27, № 5. – P. 871-888.

111. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum : a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up / M. Miettinen, H. Makhoul, L. H. Sobin, J. Lasota // *Am J Surg Pathol.* – 2006. – Vol. 30, № 4. – P. 477-489.
112. Gastrointestinal Stromal Tumours / O. Sunamak, M. O. Gul, I. E. Subasi [et al.] // *J Coll Physicians Surg Pak.* – 2021. – Vol. 31, № 9. – P. 1089-1093.
113. Gastrointestinal Stromal Tumors : The GIST of Precision Medicine / L. Mei, S. C. Smith, A. C. Faber [et al.] // *Trends Cancer.* – 2018. – Vol. 4, № 1. – P. 74-91.
114. Gastrointestinal stromal tumors with BRAF gene fusions. A report of two cases showing low or absent KIT expression resulting in diagnostic pitfalls / D. Torrence, Z. Xie, L. Zhang [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2021. – Vol. 60, № 12. – P. 789-795.
115. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis / J. Andersson, P. Bümming, J. M. Meis-Kindblom [et al.] // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 130, № 6. – P. 1573-1581.
116. Genetic aberrations of gastrointestinal stromal tumors / J. Yang, X. Du, A. J. Lazar [et al.] // *Cancer.* – 2008. – Vol. 113, № 7. – P. 1532-1543.
117. Genetic progression in gastrointestinal stromal tumors : mechanisms and molecular interventions / K. Li, H. Cheng, Z. Li [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 36. – P. 60589-60604.
118. Glabman, R. A. Cancer-Associated Fibroblasts : Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy / R. A. Glabman, P. L. Choyke, N. Sato // *Cancers (Basel).* – 2022. – Vol. 14, № 16 – P. 3906.
119. Glycosylation of FGF/FGFR : An underrated sweet code regulating cellular signaling programs / A. Gędaj, P. Gregorczyk, D. Żukowska // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2024. – Vol. 77. – P. 39-55.
120. GPER mediates a feedforward FGF2/FGFR1 paracrine activation coupling CAFs to cancer cells toward breast tumor progression / M. F. Santolla, A. Vivacqua, R. Lappano [et al.] // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – P. 223.

121. Gramza, A. W. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors / A. W. Gramza, L. C. Christopher, C. H. Michael // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15, № 24. – P. 7510-7518.

122. Hereditary gastrointestinal stromal tumors sharing the KIT Exon 17 germline mutation p.Asp820Tyr develop through different cytogenetic progression pathways / I. Veiga, M. Silva, J. Vieira [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2010. – Vol. 49, № 2. – P. 91-98.

123. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST / B. Liegl, I. Kepten, C. Le [et al.] // *J Pathol*. – 2008. – Vol. 216, № 1. – P. 64-74.

124. HGF/c-MET pathway in cancer : from molecular characterization to clinical evidence / J. Fu, X. Su, Z. Li [et al.] // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40, № 28. – P. 4625-4651.

125. High pretreatment serum concentration of basic fibroblast growth factor is a predictor of poor prognosis in small cell lung cancer / T. Ruotsalainen, H. Joensuu, K. Mattson, P. Salven // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. – 2002. – Vol. 11. – P. 1492-1495.

126. Hopkins, T. G. Sunitinib in the management of gastrointestinal stromal tumours (GISTs) / T. G. Hopkins, M. Marples, D. Stark // *Eur J Surg Oncol*. – 2008. – Vol. 34, № 8. – P. 844-850.

127. Ibrahim, A. Gastrointestinal Stromal Tumors : Variants and Some Pitfalls That They Create / A. Ibrahim, E. A. Montgomery // *Adv Anat Pathol*. – 2024. – Vol. 31, № 6. – P. 354-363.

128. Ibrahim, A. Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors / A. Ibrahim, S. Chopra // *Arch Pathol Lab Med*. – 2020. – Vol. 144, № 5. – P. 655-660.

129. Identification of Novel Imatinib-Resistant Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors / L. Cao, K. Zheng, Y. Liu [et al.] // *Front Genet*. – 2022. – Vol. 13. – P. 878145.

130. INSIGHT : A Phase III Trial of Ripretinib Versus Sunitinib in Patients with Advanced GIST with KIT Exon 11 and Exon 17/18 Mutations Who Were Previously

Treated with Imatinib / C. Larrain, T. Pu, P. Cox [et al.] // *Ann Surg Oncol.* – 2025. – Vol. 32, № 5. – P. 3065-3067.

131. Imaging surveillance of gastrointestinal stromal tumour : current recommendation by National Comprehensive Cancer Network and European Society of Medical Oncology-European Reference Network for rare adult solid cancers / F. Alessandrino, S. H. Tirumani, J. P. Jagannathan, N. H. Ramaiya // *Clinical Radiology.* – 2019. – Vol. 74, № 10. – P. 746-755.

132. Imatinib has the potential to exert its antileukemia effects by down-regulating hERG1 K⁺ channels in chronic myelogenous leukemia / F. Zheng, H. Li, K. Liang [et al.] // *Med Oncol.* – 2012. – Vol. 29, № 3. – P. 2127-2135.

133. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido / V. P. Balachandran, M. J. Cavnar, S. Zeng [et al.] // *Nat Med.* – 2011. – Vol. 17, № 9. – P. 1094-1100.

134. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors : Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship / D. B. Mendel, A. D. Laird, X. Xin [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 327-337.

135. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor / M. C. Heinrich, D. J. Griffith, B. J. Druker [et al.] // *Blood.* – 2000. – Vol. 96, № 3. – P. 925-932.

136. Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment / G. Liu, T. Chen, Z. Ding [et al.] // *Cell Prolif.* – 2021. – Vol. 54. – P. e13009.

137. Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor / K. Sakurama, K. Noma, M. Takaoka [et al.] // *Mol Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 127-134.

138. Initial and late resistance to imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors are predicted by different prognostic factors : a European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Italian Sarcoma Group-Australasian Gastrointestinal Trials Group study / M. Van Glabbeke, J. Verweij, P. G. Casali [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2005. – Vol. 23, № 24. – P. 5795-5804.

139. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response / N. Szerlip, A. Pedraza, D. Chakravatry [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109. – P. 3041-3046.
140. JAK-STAT core cancer pathway : An integrative cancer interactome analysis / F. Erdogan, T. B. Radu, A. Orlova [et al.] // *J Cell Mol Med.* – 2022. – Vol. 26, № 7. – P. 2049-2062.
141. Jumniensuk, C. Gastrointestinal stromal tumor : clinicopathological characteristics and pathologic prognostic analysis / C. Jumniensuk, M. Charoenpitakchai // *World J. Surg. Oncol.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 231.
142. Kabakov, A.E. Cell Death and Survival Assays / A.E. Kabakov, V.L. Gabai // *Methods Mol Biol.* – 2018. – Vol. 1709. – P. 107-127.
143. Katoh, M. FGF receptors : cancer biology and therapeutics / M. Katoh, H. Nakagama // *Med Res Rev.* – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 280-300.
144. Kelly, C. M. The management of metastatic GIST : current standard and investigational therapeutics / C. M. Kelly, L. Gutierrez Sainz, P. Chi // *J Hematol Oncol.* – 2021. – Vol. 14, № 1. – P. 2.
145. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor / M. C. Heinrich, C. L. Corless, G. D. Demetri [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2023. – Vol. 41, № 31. – P. 4829-4836.
146. KIT and PDGFRa mutational patterns in Sardinian patients with gastrointestinal stromal tumors / G. Palomba, P. Paliogiannis, M. C. Sini [et al.] // *Eur J Cancer Prev.* – 2021. – Vol. 30, № 1. – P. 53-58.
147. KIT Exon 9-Mutated Gastrointestinal Stromal Tumours : Biology and Treatment / A. Napolitano, K. Thway, M. J. Smith [et al.] // *Chemotherapy.* – 2022. – Vol. 67, № 2. – P. 81-90.
148. Kit mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours / M. Debiec-Rychter, R. Sciot, A. L. Cesne [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 42, № 8. – P. 1093-1103.

149. KIT mutations and expression : current knowledge and new insights for overcoming IM resistance in GIST / S. Zhou, O. Abdihamid, F. Tan [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 153.
150. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor : PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway / S. Bauer, A. Duensing, G. D. Demetri, J. A. Fletcher // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26, № 54. – P. 7560-7568.
151. Korc, M. The role of fibroblast growth factors in tumor growth / M. Korc, R. E. Friesel // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2009. – Vol. 9. – P. 639-651.
152. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 9 mutations : Update on genotype-phenotype correlation and validation of a high-resolution melting assay for mutational testing / H. Künstlinger, S. Huss, S. Merkelbach-Bruse [et al.] // *Am J Surg Pathol.* – 2013. – Vol. 37, № 11. – P. 1648-1659.
153. Lap-Endo cooperative surgery (LECS) in gastric GIST : updates and future advances / T. Z. J. Teng, F. Ishraq, A. F. T. Chay, K. V. Tay // *Surg Endosc.* – 2023. – Vol. 37, № 3. – P. 1672-1682.
154. Lasota, J. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) / J. Lasota, M. Miettinen // *Semin Diagn Pathol.* – 2006. – Vol. 23, № 2. – P. 91-102.
155. Lee, S. Targeting MAPK Signaling in Cancer : Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity / S. Lee, J. Rauch, W. Kolch // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 3. – P. 1102.
156. Loewe, S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs / S. Loewe // *Arzneimittelforschung.* – 1953. – Vol. 3. – P. 285–290.
157. Long-term outcome of molecular subgroups of GIST patients treated with standard-dose imatinib in the BFR14 trial of the French Sarcoma Group / A. Patrikidou, J. Domont, S. Chabaud [et al.] // *Eur J Cancer.* – 2016. – Vol. 52, № 1. – P. 173-180.
158. Loss of chromosome 9p21 and decreased p16 expression correlate with malignant gastrointestinal stromal tumor / Y. Zhang, H. Cao, M. Wang [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, № 37. – P. 4716-4724.

159. Low prognostic implication of fibroblast growth factor family activation in triple-negative breast cancer subsets / H. J. Lee, A. N. Seo, S. Y. Park [et al.] // *Ann Surg Oncol.* – 2014. – Vol. 21. – P. 1561-1568.
160. LY2874455 and Abemaciclib Reverse FGF3/4/19/CCND1 Amplification Mediated Gefitinib Resistance in NSCLC / D. Liu, H. Liu, J. Gan [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 918317.
161. Mabeta, P. The VEGF/VEGFR Axis Revisited : Implications for Cancer Therapy / P. Mabeta, V. Steenkamp // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 24. – P. 15585.
162. Mac Gabhann, F. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction : a computational study / F. Mac Gabhann, A. S. Popel // *Biophys Chem.* – 2007. – Vol. 128. – P. 125-139.
163. Mazur, M. T. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis / M. T. Mazur, H. B. Clark // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1983. – Vol. 7, № 6. – P. 507-519.
164. Mechanisms of sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors harboring KITAY502-3ins mutation : an in vitro mutagenesis screen for drug resistance / T. Guo, M. Hajdu, N. P. Agaram [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, № 22. – P. 6862-6870.
165. Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract with NTRK rearrangements : a clinicopathological, immunophenotypic, and molecular study of eight cases, emphasizing their distinction from gastrointestinal stromal tumor (GIST) / M. Atiq, J. Davis, J. Hornick [et al.] // *Modern Pathology.* – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. 95-103.
166. Miettinen, M. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach : a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up / M. Miettinen, L. H. Sobin, J. Lasota // *Am J Surg Pathol.* – 2005. – Vol. 29, № 1. – P. 52-68.
167. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors / M. C. Heinrich, C. L. Corless, C. D. Blanke [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol. 24, № 29. – P. 4764-4774.

168. Molecular Subtypes of KIT/PDGFR α Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors : A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic / S. A. Boikos, A. S. Pappo, J. K. Killian [et al.] // JAMA Oncol. – 2016. – Vol. 2, № 7. – P. 922-928.

169. Molecular target modulation, imaging, and clinical evaluation of gastrointestinal stromal tumor patients treated with sunitinib malate after imatinib failure / G. D. Demetri, M. C. Heinrich, J. A. Fletcher [et al.] // Clin Cancer Res. – 2009. – Vol. 15, № 18. – P. 5902-5909.

170. Multiple gastrointestinal stromal tumors with novel germline c-kit gene mutation, K642T, at exon 13 / K. Yamanoi, K. Higuchi, H. Kishimoto [et al.] // Hum Pathol. – 2014. – Vol. 45, № 4. – P. 884-888.

171. Naito, Y. Current status of and future prospects for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumours / Y. Naito, T. Nishida, T. Doi // Gastric Cancer. – 2023. – Vol. 26, № 3. – P. 339-351.

172. NCCN Guidelines® Insights : Gastrointestinal Stromal Tumors, Version 2.2022 / M. von Mehren, J. M. Kane, R. F. Riedel [et al.] // J Natl Compr Canc Netw. – 2022. – Vol. 20, № 11. – P. 1204-1214.

173. NCCN Task Force report : management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines / G. D. Demetri, R. S. Benjamin, C. D. Blanke [et al.] // J. Natl. Compr. Canc. Netw. – 2007. – Vol. 5, № 2. – P. S1-S29.

174. Neurofibromatosis type 1 system-based manifestations and treatments : a review / M. Saleh, A. Dib, S. Beaini [et al.] // Neurol Sci. – 2023. – Vol. 44, № 6. – P. 1931-1947.

175. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis / T. Takahashi, S. Serada, M. Ako [et al.] // Int. J. Cancer. – 2013. – Vol. 133. – P. 2737-2743.

176. New targets and therapies for gastrointestinal stromal tumors / A. Wozniak, Y. K. Gebreyohannes, M. Debiec-Rychter [et al.] // Expert Rev Anticancer Ther. – 2017. – Vol. 17. – P. 1117-1129.

177. New treatment strategies for advanced-stage gastrointestinal stromal tumours / L. R. Klug, H. M. Khosroyani, J. D. Kent, M. C. Heinrich // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2022. – Vol. 19, № 5. – P. 328-341.

178. Noncoding RNAs in Drug Resistance of Gastrointestinal Stromal Tumor / J. Li, S. Guo, Z. Sun, Y. Fu // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 808591.

179. Not all KIT 557/558 codons mutations have the same prognostic influence on recurrence-free survival : breaking the exon 11 mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) / L. Incorvaia, G. Badalamenti, D. Fanale [et al.] // *Ther Adv Med Oncol.* – 2021. – Vol. 13. – P. 1.

180. Novel Genomic Risk Stratification Model for Primary Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) in the Adjuvant Therapy Era / J. K. Dermawan, C. Kelly, Z. Gao [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2023. – Vol. 29, № 19. – P. 3974-3985.

181. Ornitz, D. M. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway / D. M. Ornitz, N. Itoh // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 215-266.

182. Pancreatic Gastrinoma, Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST), Pheochromocytoma, and Hürthle Cell Neoplasm in a Patient with Neurofibromatosis Type 1 : A Case Report and Literature Review / A. A. Arif, P. T. W. Kim, A. Melck [et al.] // *Am J Case Rep.* – 2021. – Vol. 22. – P. 927761.

183. Pathania, S. A holistic view on c-Kit in cancer : Structure, signaling, pathophysiology and its inhibitors / S. Pathania, O. T. Pentikäinen, P. K. Singh // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2021. – Vol. 1876, № 2. – P. 188631.

184. PDGFRA-mutant syndrome / R. Ricci, M. Martini, T. Cenci [et al.] // *Mod Pathol.* – 2015. – Vol. 28, № 7. – P. 954-964.

185. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors : frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib / C. L. Corless, A. Schroeder, D. Griffith [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2005. – Vol. 23, № 23. – P. 5357-5364.

186. PDGFR dimer-specific activation, trafficking and downstream signaling dynamics / M. A. Rogers, M. B. Campaña, R. Long, K. A. Fantauzzo // *J Cell Sci.* – 2022. – Vol. 135, № 17. – P. 1-18.

187. Personalized radiomics signature to screen for KIT-11 mutation genotypes among patients with gastrointestinal stromal tumors : a retrospective multicenter study / Q. W. Zhang, R. Y. Zhang, Z. B. Yan [et al.] // J Transl Med. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. 726.
188. Phase I Study of Rapid Alternation of Sunitinib and Regorafenib for the Treatment of Tyrosine Kinase Inhibitor Refractory Gastrointestinal Stromal Tumors / C. Serrano, A. Leal, Y. Kuang [et al.] // Clin Cancer Res. – 2019. – Vol. 25, № 24. – P. 7287-7293.
189. Physiological and tumor-associated angiogenesis : Key factors and therapy targeting VEGF/VEGFR pathway / P. Lorenc, A. Sikorska, S. Molenda [et al.] // Biomed Pharmacother. – 2024. – Vol. 180. – P. 117585.
190. Polkowski, M. Submucosal lesions / M. Polkowski, E. Butruk // Gastrointest Endosc Clin N Am. – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 33-54.
191. Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate / E. Wardelmann, S. Merkelbach-Bruse, K. Pauls [et al.] // Clin Cancer Res. – 2006. – Vol. 12, № 6. – P. 1743-1749.
192. Popescu, L. M. The Tandem : Telocytes – Stem Cells / L. M. Popescu // Int. j biol and biomed. Engineering. – 2011. – Vol. 5, № 2. – P. 83-92.
193. Potential Focal Adhesion Kinase Inhibitors in Management of Cancer : Therapeutic Opportunities from Herbal Medicine / F. Chen, Z. Zhong, C. Zhang [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23, № 21. – P. 13334.
194. Predicting malignant potential of gastrointestinal stromal tumors : Role of p16 and E2F1 expression / U. S. Tetikkurt, I. Y. Ozaydin, S. Ceylan [et al.] // Appl Immunohistochem Mol Morphol. – 2010. – Vol. 18, № 4. – P. 338-343.
195. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor / M. C. Heinrich, R. G. Maki, C. L. Corless [et al.] // J Clin Oncol. – 2008. – Vol. 26, № 33. – P. 5352-5359.

196. Prognosis and predictive value of KIT exon 11 deletion in GISTs / J. B. Bachet, I. Hostein, A. Le Cesne [et al.] // *Br J Cancer*. – 2009. – Vol. 101, № 1. – P. 7-11.
197. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor / M. Imamura, H. Yamamoto, N. Nakamura [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2007. – Vol. 20. – P. 529-537.
198. Prognostic Significance of C-MYC and EGFR Overexpression in Gastrointestinal Stromal Tumors : An Immunohistochemical Study / S. Ben Rejeb, D. Aloui, A. Ayari, A. Chouchen // *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. – 2025. – Vol. 33, № 1. – P. 43-48.
199. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors / S. Singer, B. P. Rubin, M. L. Lux [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2002. – Vol. 20, № 18. – P. 3898-3905.
200. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib : randomised trial / J. Verweij, P. G. Casali, J. Zalcberg [et al.] // *Lancet*. – 2004. – Vol. 364, № 9440. – P. 1127-1134.
201. p53 as a biomarker and potential target in gastrointestinal stromal tumors / C. E. Wu, C. P. Chen, W. K. Huang [et al.] // *Front Oncol*. – 2022. – Vol. 12. – P. 872202.
202. RAF1 facilitates KIT signaling and serves as a potential treatment target for gastrointestinal stromal tumor / L. Zhang, S. Zhang, X. Cao [et al.] // *Oncogene*. – 2024. – Vol. 43, № 27. – P. 2078-2091.
203. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment / R. Ullah, Q. Yin, A. H. Snell, L. Wan // *Semin Cancer Biol*. – 2022. – Vol. 85. – P. 123-154.
204. Ravegnini, G. Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors : Small Steps Toward Personalized Medicine? / G. Ravegnini, R. Ricci // *Epigenet Insights*. – 2019. – Vol. 12. – P. 1-4.
205. Revathidevi, S. Akt in cancer : Mediator and more / S. Revathidevi, A. K. Munirajan // *Semin Cancer Biol*. – 2019. – Vol. 59. – P. 80-91.

206. Role and significance of c-KIT receptor tyrosine kinase in cancer : A review / E. Sheikh, T. Tran, S. Vranic [et al.] // Bosn J Basic Med Sci. – 2022. – Vol. 22, № 5. – P. 683-698.

207. Ryan, J. A. Cell Cloning by Serial Dilution in 96 Well Plates / J. A. Ryan // Corning : website. – URL: https://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/Single_cell_cloning_protocol.pdf (accessed: 12.05.2025).

208. Salvatore, D. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications / P. Wolter, C. Stefan, B. Decallonne // Nat Rev Endocrinol. – 2021. – Vol. 17, № 5. – P. 296-306.

209. Schaefer, I. M. The GIST of Advances in Treatment of Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor / I. M. Schaefer, R. P. DeMatteo, C. Serrano // Am Soc Clin Oncol Educ Book. – 2022. – Vol. 42. – P. 1-15.

210. Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model / B. Yadav, K. Wennerberg, T. Aittokallio, J. Tang // Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2015. – Vol. 13. – P. 504–513.

211. Shah, R. R. Hepatotoxicity of tyrosine kinase inhibitors : clinical and regulatory perspectives / R. R. Shah, J. Morganroth, D. R. Shah // Drug Saf. – 2013. – Vol. 36, № 7. – P. 491-503.

212. Simons, M. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling / M. Simons, E. Gordon, L. Claesson-Welsh // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2016. – Vol. 17, № 10. – P. 611-625.

213. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma : A single-institution study of 200 patients / P. Salven, A. Orpana, L. Teerenhovi, H. Joensuu // Blood. – 2000. – Vol. 96. – P. 3712-3718.

214. Strauss, G. Gastrointestinal Stromal Tumors / G. Strauss, S. George // Curr Oncol Rep. – 2025. – Vol. 27, № 3. – P. 312-321.

215. Succinate dehydrogenase deficiency in pediatric and adult gastrointestinal stromal tumors / M. G. Belinsky, L. Rink, M. von Mehren [et al.] // *Front Oncol.* – 2013. – Vol. 3, № 117. – P. 1-14.
216. Surgical strategies for duodenal gastrointestinal stromal tumors / X. Fu, X. Wang, J. Xiong [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2022. – Vol. 407, № 2. – P. 835-844.
217. Synergistic anti-angiogenic treatment effects by dual FGFR1 and VEGFR1 inhibition in FGFR1-amplified breast cancer / K. Golfmann, L. Meder, M. Koker [et al.] // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37. – P. 5682-5693.
218. AXL in cancer : a modulator of drug resistance and therapeutic target / Y. Tang, H. Zang, Q. Wen, S. Fan // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2023. – Vol. 42, № 1. – P. 148.
219. Targeted deep sequencing reveals unrecognized KIT mutation coexistent with NF1 deficiency in GISTs / J. Wu, H. Zhou, X. Yi [et al.] // *Cancer Management and Research.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 297-306.
220. Targeted therapy of gastrointestinal stromal tumours / A. Jakhetiya, P. K. Garg, G. Prakash [et al.] // *World J. Gastrointest. Surg.* – 2016. – Vol. 8, № 5. – P. 345-352.
221. Telocytes are the physiological counterpart of inflammatory fibroid polyps and PDGFRA-mutant GISTs / R. Ricci, M. C. Giustiniani, M. Gessi [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2018. – Vol. 22, № 10. – P. 4856-4862.
222. Telocytes in the urinary system / Y. Zheng, T. Zhu, M. Lin [et al.] // *Journal of Translational Med.* – 2012. – Vol. 10. – P. 188.
223. The association between fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification and lung cancer : a meta-analysis / J. L. Miao, J. H. Zhou, J. J. Cai, R. J. Liu // *Arch Med Sci.* – 2020. – Vol. 16. – P. 16-26.
224. The clinical implications of sunitinib-induced hypothyroidism : a prospective evaluation / P. Wolter, C. Stefan, B. Decallonne [et al.] // *Br J Cancer.* – 2008. – Vol. 99, № 3. – P. 448-454.

225. The docking protein FRS2 α is a critical regulator of VEGF receptors signaling / P. Y. Chen, L. Qin, Z. W. Zhuang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111. – P. 5514-5519.

226. The FGFR landscape in cancer : analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing / T. Helsten, S. Elkin, E. Arthur [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22. – P. 259-267.

227. The Identity of PDGFRA D842V-Mutant Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) / A. Rizzo, M. A. Pantaleo, A. Astolfi [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 705.

228. The novel KIT exon 11 germline mutation K558N is associated with gastrointestinal stromal tumor, mastocytosis, and seminoma development / M. Meir, K. Maurus, J. Kuper [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2021. – Vol. 60, № 12. – P. 827-832.

229. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status / R. B. West, C. L. Corless, X. Chen [et al.] // *Am J Pathol.* – 2004. – Vol. 165, № 1. – P. 107-113.

230. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF / S. Ghalehbandi, J. Yuzugulen, M. Z. I. Pranjol, M. H. Pourgholami // *Eur J Pharmacol.* – 2023. – Vol. 949. – P. 175586.

231. The Use of Molecular Subtypes for Precision Therapy of Recurrent and Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor / P. Liu, F. Tan, H. Liu [et al.] // *Onco Targets Ther.* – 2020. – Vol. 24, № 13. – P. 2433-2447.

232. Tumeurs Stromales Gastro-Intestinales «GIST» : état des lieux et actualités à travers notre expérience portant sur 54 cas et une Revue de littérature / N. Taoufiq, A. Naim, Z. Bouchbika [et al.] // *Pan Afr Med J.* – 2017. – Vol. 27. – P. 165.

233. 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.

234. Update of phase I study of imatinib (STI571) in advanced soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors : a report of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group / A. T. van Oosterom, I. R. Judson, J. Verweij [et al.] // *Eur J Cancer*. – 2002. – Vol. 38, № 5. – P. S83-S87.

235. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis / C. S. Melincovici, A. B. Boşca, S. Şuşman [et al.] // *Rom J Morphol Embryol*. – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 455-467.

236. VEGF receptor signalling – in control of vascular function / A. K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2006. – Vol. 7. – P. 359-371.

237. Wang, Y. M. Succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors / Y. M. Wang, M. L. Gu, F. Ji // *World J Gastroenterol*. – 2015. – Vol. 21, № 8. – P. 2303-2314.

238. Whole-genome and Epigenomic Landscapes of Malignant Gastrointestinal Stromal Tumors Harboring KIT Exon 11 557-558 Deletion Mutations / K. Ohshima, T. Nagashima, K. Fujiya [et al.] // *Cancer Res Commun*. – 2023. – Vol. 3, № 4. – P. 684-696.

239. «Wild type» GIST : clinico-pathological features and clinical practice / R. Wada, H. Arai, S. Kure [et al.] // *Pathol Int*. – 2016. – Vol. 66, № 8. – P. 431-437.

240. Wiszniak, S. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A / S. Wiszniak, Q. Schwarz // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 128.

241. Xue, L. Angiogenic effect of fibroblast growth factor-1 and vascular endothelial growth factor and their synergism in a novel in vitro quantitative fibrin-based 3-dimensional angiogenesis system / L. Xue, H. P. Greisler // *Surgery*. – 2002. – Vol. 132. – P. 259-267.

242. Yang, L. Case Report : A Missense Mutation of KIT in Hyperpigmentation and Lentigines Unassociated With Systemic Disorders : Report of a Chinese Pedigree and a Literature Review / L. Yang, Y. Liu, T. Wang // *Front Med (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 9. – P. 847382.

243. Yang, J. Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity / J. Yang, J. Yan, B. Liu // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 978.
244. Yuzawa, S. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor / S. Yuzawa, Y. Opatowsky, Z. Zhang [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 130, № 2. – P. 323-334.
245. Zhang, Y. STAT1 in cancer : friend or foe? / Y. Zhang, Z. Liu // *Discov Med.* – 2017. – Vol. 24, № 130. – P. 19-29.
246. Zhang, Y. Telocytes and inflammation : A review / Y. Zhang, H. Tian // *Medicine (Baltimore).* – 2023. – Vol. 102, № 46. – P. 35983.
247. Zhao, X. Gastrointestinal stromal tumor / X. Zhao, C. Yue // *J Gastrointest Oncol.* – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 189-208.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 – Сигнальные пути в клетках ГИСО: JAK-STAT, RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR.....	21
Рисунок 2 – Гистологические варианты ГИСО.....	22
Рисунок 3 – Световая микроскопия ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1.....	73
Рисунок 4 – Световая микроскопия ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R....	74
Рисунок 5 – Световая микроскопия ИМ-резистентных клеток ГИСО 430.....	75
Рисунок 6 – Окраска чашек Петри с клетками ГИСО T1 (А), ГИСО T1-IM-R (Б) и ГИСО 430 (В) фиксирующим раствором кристаллического фиолетового.....	76
Рисунок 7 - Изучение способности ИМ ингибировать пролиферацию клеток ГИСО и индуцировать их гибель по механизму апоптоза.....	78
Таблица 1 – Показатели IC ₅₀ ИМ для клеточных линий ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R, ГИСО 430.....	79
Таблица 2 – Мутационный статус <i>KIT</i> в клеточных линиях ГИСО T1 и ГИСО T1-IM-R.....	80
Рисунок 8 – Скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм РТК – с-KIT, PDGFR α , FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	82
Рисунок 9 – Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	84
Рисунок 10 – Активация с-KIT-сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	85
Рисунок 11 – Активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	87
Рисунок 12 – Скрининговый анализ экспрессии фосфорилированных форм НТК – STAT1, MAPK и AKT в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	89
Рисунок 13 – Экспрессия НТК – STAT1, MAPK и AKT в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	90

Таблица 3 – Экспрессия фосфорилированных форм РТК и НТК, а также факторов роста (FGF-2, VEGF-A) в клеточных линиях ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R, ГИСО 430.....	92
Рисунок 14 – Активация FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО Т1 в условиях ингибирования тирозинкиназного рецептора с-KIT.....	95
Рисунок 15 – Влияние ИМ на экспрессию маркеров с-KIT- и FGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО Т1.....	96
Рисунок 16 – Ингибирование экспрессии рецепторной тирозинкиназы с-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R (А) и ГИСО 430 (Б).....	98
Рисунок 17 – Концентрация FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 в присутствии ИМ.....	100
Таблица 4 – Концентрация FGF-2 (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО, культивированных в присутствии ИМ.....	101
Рисунок 18 – Концентрация FGF-2 в супернатантах клеток ГИСО Т1, ГИСО Т1-ИМ-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна <i>KIT</i>	102
Таблица 5 – Концентрация FGF-2 (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в условиях нокдауна <i>KIT</i> с помощью кнРНК <i>KIT</i>	103
Рисунок 19 – Экспрессия <i>FGF-2</i> , <i>FGFR-1</i> , <i>FGFR-2</i> в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R (А) и ГИСО 430 (Б) условиях ингибирования тирозинкиназного рецептора с-KIT.....	104
Рисунок 20 – Влияние FGF-2 на экспрессию маркеров с-KIT- и FGFR-сигнальных путей в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1.....	108
Рисунок 21 – Влияние FGF-2 на экспрессию НТК – STAT1, MAPK и АКТ в ИМ-чувствительных клетках ГИСО Т1.....	109
Рисунок 22 – Влияние FGF-2 на цитотоксическую и антипролиферативную активность ИМ в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО Т1.....	111
Таблица 6 – Показатели IC ₅₀ иматиниба для клеток ГИСО Т1, культивированных в отсутствии или присутствии FGF-2.....	112
Рисунок 23 – Влияние ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО Т1-ИМ-R.....	115

Рисунок 24 – Влияние ИМ на экспрессию белков FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО 430.....	117
Рисунок 25 – Коиммунопреципитация тирозинкиназных рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	120
Рисунок 26 – Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназных рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R (А) и ГИСО 430 (Б).....	121
Рисунок 27 – Влияние ИМ на экспрессию и ко-локализацию тирозинкиназных рецепторов с-KIT, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R.....	123
Рисунок 28 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1.....	126
Рисунок 29 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1.....	128
Рисунок 30 – Цитотоксическая активность иматиниба (ИМ), BGJ398 (селективный ингибитор рецепторов FGFR1-4) и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R.....	130
Рисунок 31 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R.....	132
Таблица 7 – Показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и BGJ398 для клеточной линии ГИСО T1-IM-R.....	133
Рисунок 32 – Антипролиферативная активность ИМ, U0126, MK2206 и комбинаций препаратов (ИМ + U0126, ИМ + MK2206) в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R.....	135
Рисунок 33 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ, AZD4547 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R.....	137
Рисунок 34 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ, TAS-120 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-R.....	138

Таблица 8 – Показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (AZD4547 и TAS-120) для клеточной линии ГИСО T1-IM-R.....	140
Рисунок 35 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430.....	142
Рисунок 36 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430.....	143
Таблица 9 – Показатель синергизма комбинации препаратов ИМ и BGJ398 для клеточной линии ГИСО 430.....	145
Рисунок 37 – Иммунофлуоресцентная микроскопия тирозинкиназного рецептора с-KIT в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R.....	148
Рисунок 38 – Экспрессия тирозинкиназного рецептора с-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2.....	150
Рисунок 39 – Исследование экспрессии тирозинкиназного рецептора с-KIT в клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 методом иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.....	151
Рисунок 40 – Изучение цитотоксического и антипролиферативного эффекта ИМ в отношении клеток ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2.....	152
Таблица 10 – Показатели IC ₅₀ ИМ для клеточных линий ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R, ГИСО T1-IM-R-2.....	153
Рисунок 41 – Активация FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2.....	155
Рисунок 42 – Исследование экспрессии маркеров FGFR-сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2 методом иммунофлуоресцентной микроскопии.....	156
Рисунок 43 – Цитотоксическая активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных <i>KIT</i> -негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2.....	158
Рисунок 44 – Антипролиферативная активность ИМ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных <i>KIT</i> -негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2.....	160

Рисунок 45 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность ИМ, AZD4547 и TAS-120 в отношении ИМ-резистентных <i>KIT</i> -негативных клеток ГИСО T1-IM-R-2.....	163
Таблица 11 – Показатели IC ₅₀ селективных ингибиторов рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547, TAS-120) для клеточных линий ГИСО T1-IM-R и ГИСО T1-IM-R-2.....	164
Рисунок 46 – Изучение экспрессии <i>VEGF-A</i> , <i>VEGFR1-3</i> в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430, а также концентрации <i>VEGF-A</i> лиганда в супернатантах указанных клеточных культур.....	167
Таблица 12 – Концентрация <i>VEGF-A</i> (пг/мл) в супернатантах клеточных линий ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R, ГИСО 430.....	168
Таблица 13 – Показатели IC ₅₀ СУ и IC ₅₀ РЕГО для клеточных линий ГИСО.....	170
Рисунок 47 – Влияние FGF-2 и ИМ на экспрессию маркеров <i>VEGFR</i> - и <i>c-KIT</i> -сигнальных путей в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1.....	172
Таблица 14 – Концентрация <i>VEGF-A</i> (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО T1.....	173
Рисунок 48 – Влияние FGF-2 лиганда на активацию <i>VEGFR</i> -сигнального пути в ИМ-чувствительных клетках ГИСО T1.....	174
Рисунок 49 – Влияние FGF-2 лиганда на активацию <i>VEGFR</i> -сигнального пути в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430.....	176
Таблица 15 – Концентрация <i>VEGF-A</i> (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 при их культивировании в присутствии FGF-2.....	177
Рисунок 50 – Активация <i>VEGFR</i> -сигнального пути в клетках ГИСО T1 в условиях нокдауна <i>KIT</i>	179
Таблица 16 – Концентрация <i>VEGF-A</i> (пг/мл) в супернатантах клеток ГИСО в условиях нокдауна <i>KIT</i> с помощью кнРНК <i>KIT</i>	180
Рисунок 51 – Исследование активации <i>VEGFR</i> -сигнального пути в клетках ГИСО T1, ГИСО T1-IM-R и ГИСО 430 в условиях нокдауна <i>KIT</i>	181

Рисунок 52 – Исследование способности таргетных препаратов BGJ398 и РЕГО ингибировать активацию FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R.....	186
Рисунок 53 – Коиммунопреципитация тирозинкиназных рецепторов VEGFR1, FGFR1 и FGFR2 в ИМ-резистентных клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430.....	188
Рисунок 54 – Иммунофлуоресцентная микроскопия рецепторов FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО T1-ИМ-R и ГИСО 430.....	189
Рисунок 55 – Цитотоксическая активность СУ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R.....	192
Рисунок 56 – Антипролиферативная активность СУ, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R.....	194
Рисунок 57 – Цитотоксическая активность РЕГО, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R.....	196
Рисунок 58 – Антипролиферативная активность РЕГО, BGJ398 и их комбинации в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-ИМ-R.....	198
Таблица 17 – Показатель синергизма комбинации ингибиторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) и селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) для клеточной линии ГИСО T1-ИМ-R.....	199
Рисунок 59 – Цитотоксическая и антипролиферативная активность СУ, РЕГО и их комбинаций с BGJ398 в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО 430.....	201
Таблица 18 – Показатель синергизма комбинации ингибиторов VEGFR1-3 (СУ, РЕГО) и селективного ингибитора рецепторов FGFR1-4 (BGJ398) для клеточной линии ГИСО 430.....	202
Рисунок 60 – Активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в ИМ-резистентных клетках ГИСО происходит вследствие ингибирования с-KIT-сигналинга за счет действия ИМ или нокдауна гена <i>KIT</i> с помощью кнРНК <i>KIT</i>	225

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы выражает благодарность ассистенту кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанского ГМУ Минздрава России, канд. мед. наук Галембиковой А.Р.; старшему научному сотруднику Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, канд. биол. наук Валеевой Е.В.; старшему научному сотруднику Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, канд. биол. наук, доценту Шагимардановой Е.И.; заведующему кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», д-р биол. наук, доценту Киямовой Р.Г.; старшему преподавателю кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», канд. биол. наук Скриповой В.С.; заведующему лабораторией цитогенетики НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук Копнину П.Б. за оказанную помощь в организации исследований.