

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России Рукша Татьяны Геннадьевны на диссертационную работу Дунаева Павла Дмитриевича «Механизмы вторичной резистентности к таргетным препаратам в патогенезе гастроинтестинальных стромальных опухолей», представленную к публичной защите в диссертационный совет 21.2.012.02 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3. – Патологическая физиология.

Актуальность темы исследования

Резистентность опухолевых клеток к таргетным и химиопрепаратам является одним из ключевых факторов, влияющих на клиническое течение и прогноз онкологического заболевания. В диссертационном исследовании Дунаева П.Д. рассматриваются механизмы вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов – иматинибу, сунитинибу и регорафенибу. Возникновение вторичной (приобретенной) резистентности ГИСО к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов диагностируется в случае прогрессивного роста опухоли и развития метастазов, возникающих после 6 месяцев лечения данными таргетными препаратами. ГИСО представляют собой опухоли мезенхимального происхождения, локализующиеся преимущественно в мышечной оболочке желудка и кишечника. В патогенезе ГИСО ключевую роль играют мутации генов *KIT* или *PDGFR α* , приводящие к гиперактивации тирозинкиназных рецепторов c-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: 1) JAK-STAT; 2) RAS-RAF-MAPK; 3) PI3K-AKT-mTOR, способствующих их пролиферации и миграции, а также подавлению программы апоптоза. В настоящее время в научной литературе широко обсуждаются механизмы пролиферации опухолевых клеток, индуцированные сигналингом, запускаемым вследствие связывания различных лигандов со своими тирозинкиназными рецепторами. Учитывая вышеизложенное, диссертационная работа Дунаева П.Д. является актуальной и

своевременной, поскольку автором исследованы новые молекулярные механизмы пролиферации клеток ГИСО, резистентных к таргетным препаратам, связанные с активацией FGFR- и VEGFR-сигнальных путей и представляющие научно-практический интерес.

Научная новизна исследования

Дунаевым П.Д. впервые представлены сведения о том, что вторичная резистентность ГИСО к ингибиторам тирозинкиназных рецепторов (иматинибу, сунитинибу, регорафенибу) обусловлена активацией FGFR- и VEGFR-сигнальных путей и снижением активности KIT-сигнального пути. Важно отметить, что в основе активации FGFR- и VEGFR-сигналинга лежит аутокринный механизм, обусловленной гиперпродукцией клетками ГИСО фактора роста фибробластов второго типа (FGF-2) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A). Полученные результаты позволили автору определить комбинацию таргетных препаратов, индуцирующую апоптоз клеток ГИСО, которая была представлена в виде сочетания иматиниба и селективных ингибиторов FGFR-сигналинга (BGJ398, AZD4547, TAS-120).

Заслуживают внимания результаты Дунаева П.Д. по исследованию гетерогенности популяции ГИСО, резистентной к тирозинкинажным ингибиторам. Автор убедительно продемонстрировал наличие клонов ГИСО, различающихся по уровню экспрессии тирозинкиназного рецептора c-KIT. В отсутствии экспрессии *KIT* клетки ГИСО обладали повышенной чувствительностью к селективным ингибиторам рецепторов FGFR1-4 (BGJ398, AZD4547 и TAS-120), что было обусловлено гиперактивацией FGFR-сигнального пути.

Безусловной научно-практической ценностью обладают результаты автора по изучению взаимодействия между тирозинкиназными рецепторами FGFR1-2 и VEGFR1-2 в клетках ГИСО с помощью ко-иммуноперципитации и иммунофлуоресцентной микроскопии. Обнаруженная Дунаевым П.Д. взаимосвязь между FGFR- и VEGFR-рецепторами обеспечила подбор эффективной комбинации тирозинкиназных ингибиторов для индукции программированной гибели клеток ГИСО, резистентных к таргетным препаратам. В частности, комбинация селективного ингибитора FGFR-сигнального пути (BGJ398) с ингибиторами VEGFR-сигнального пути

(сунитиниб, регорафениб) обладала выраженным синергизмом в отношении клеток ГИСО.

Таким образом, представленные в диссертационном исследовании Дунаева П.Д. научные результаты открывают новые аспекты патогенеза ГИСО и позволяют рассматривать комбинации ингибиторов FGFR- и VEGFR-сигналинга в качестве перспективных направлений таргетной терапии диссеминированных форм ГИСО.

Теоретическая и практическая значимость результатов

В диссертации Дунаева П.Д. продемонстрировано, что вторичная резистентность клеток ГИСО к тирозинкиназным ингибиторам обусловлена формированием альтернативных путей пролиферации опухолевых клеток за счет аутокринной активации FGFR- и VEGFR-сигналинга. Данное открытие имеет важное значение для патологической физиологии, поскольку уточняет патогенез ГИСО. В тоже время, полученные Дунаевым П.Д. результаты имеют ценность и для практической медицины – онкологии. Обнаруженная автором гиперэкспрессия FGF-2 и VEGF-A лигандов в клетках ГИСО может свидетельствовать о развитии их вторичной резистентности к препарату первой линии таргетной терапии – иматинибу. Гиперэкспрессия компонентов FGFR-сигнального пути в клетках ГИСО может указывать на активацию в опухолевых клетках VEGFR-сигнального пути, что требует дополнительного молекулярно-генетического исследования опухолевого материала и последующей коррекции таргетной терапии. Наконец, наличие в клетках ГИСО активации FGFR- и VEGFR-сигналинга может быть основанием для использования в качестве таргетной терапии злокачественного новообразования ингибиторов указанных сигнальных путей.

Резюмируя вышеизложенное, диссертация Дунаева П.Д. имеет значение для теоретической и практической медицины, поскольку содержит информацию о новых молекулярных механизмах вторичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам и позволяет уточнить критерии прогноза данного заболевания. Результаты диссертационного исследования Дунаева П.Д. внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу.

Оценка содержания диссертации, её структуры и завершенности

Диссертация Дунаева П.Д. написана понятным языком и в целом соответствует стандартам оформления научно-квалификационных работ. Особенного внимания достоин обзор литературы (Глава 1), в котором Дунаев П.Д. детально описывает молекулярно-генетические, морфологические и клинические особенности ГИСО, а также современные принципы их таргетной терапии. Кроме того, в обзоре литературы рассмотрены механизмы первичной и вторичной резистентности ГИСО к тирозинкиназным ингибиторам. Отдельная часть Главы 1 посвящена роли FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в канцерогенезе. Список научных работ, использованных автором в качестве источника информации для обзора литературы, включает 247 наименований, из которых 221 зарубежных авторов.

Клеточные линии ГИСО и методы исследования механизмов их резистентности к таргетным препаратам подробно описаны в Главе 2 диссертации. Автор проводил эксперименты с использованием современного оборудования и реагентов, которые позволили культивировать опухолевые клетки, оценивать их жизнеспособность и пролиферацию, изучать экспрессию белков и генов FGFR- и VEGFR-сигналинга, анализировать вторичные мутации гена *KIT*, а также выполнить нокдаун *KIT* с помощью соответствующей короткой интерферирующей РНК. Взаимодействие между тирозинкиназными рецепторами ГИСО было изучено автором с помощью ко-иммунопреципитации и иммунофлуоресцентной микроскопии.

В Главе 3 представлены результаты собственных исследований автора по изучению механизмов вторичной резистентности ГИСО к таргетным препаратам (иматинибу, сунитинибу, регорафенибу). Дунаевым П.Д. убедительно показано, что в отсутствии вторичных мутаций *KIT* приобретенная резистентность ГИСО к тирозинкиназным ингибиторам возникает вследствие изменения их киназного профиля, проявляющегося в виде снижения активности *KIT*-сигнального пути и повышения активности FGFR- и VEGFR-сигнальных путей. Данные результаты получены автором методом иммуноблоттинга с использованием наборов реагентов для скринингового анализа экспрессии тирозинкиназ, а также клеточных лизатов ГИСО. Автором установлено, что экспрессия маркеров FGFR- и VEGFR-сигнальных путей повышалась в клетках ГИСО после нокдауна *KIT* с помощью соответствующей короткой интерферирующей РНК. Дунаевым П.Д. выполнены эксперименты по изучению активации VEGFR-сигналинга в клетках ГИСО на фоне добавления в

культуры клеток экзогенного FGF-2 лиганда. Автором были получены результаты, свидетельствующие, что активация VEGFR-сигнального пути в клетках ГИСО является вторичным событием, обусловленным гиперпродукцией опухолевыми клетками FGF2 лиганда. Обнаруженная Дунаевым П.Д. активация FGFR- и VEGFR-сигнальных путей в клетках ГИСО позволила использовать комбинацию иматиниба с селективными ингибиторами FGFR-сигналинга (BGJ398, AZD4547 и TAS-120), либо комбинацию ингибитора FGFR-сигнального пути (BGJ398) с ингибиторами VEGFR-сигнального пути (сунитиниб, регорафениб) для индукции цитотоксического и антипролиферативного эффектов в отношении данных клеток.

В Главе 4 диссертации автор сопоставляет полученные экспериментальные данные с результатами, представленными в научной литературе, посвященной патогенезу ГИСО. Далее автор формулирует выводы и практические рекомендации. Диссертация Дунаева П.Д. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком научно-методическом уровне.

В автореферате отражены все основные разделы и положения диссертационной работы Дунаева П.Д. «Механизмы вторичной резистентности к таргетным препаратам в патогенезе гастроинтестинальных стромальных опухолей».

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Диссертантом сформулированы 3 основополагающих положения, выносимые на защиту и соответствующие 6 выводам из результатов выполненного исследования, которые полностью соответствуют поставленным задачам. Достоверность полученных автором результатов и обоснованность научных положений не вызывает сомнений, поскольку диссертация Дунаева П.Д. представляет собой многолетнее экспериментальное исследование, выполненное с использованием нескольких клеточных линий ГИСО, различающихся по происхождению и мутационному статусу *KIT*. Сопоставление данных, полученных на разных культурах клеток, постановка нескольких параллельных экспериментов, грамотный выбор контролей и соответствующая статистическая обработка подтверждают достоверность и надежность результатов работы. В диссертации присутствует большое

количество таблиц и качественно выполненных рисунков, что облегчает интерпретацию полученных автором результатов и способствует их тщательному анализу.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Дунаевым П.Д. полностью выполнены требования к публикациям основных научных результатов на соискание ученой степени доктора медицинских наук. По теме диссертации автором 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). Результаты и выводы диссертационной работы представлялись для обсуждения на международных и отечественных научных конференциях.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы

Принципиальных замечаний по диссертации нет. В ходе рецензирования возникли следующие вопросы, требующие обсуждения в порядке дискуссии:

1. Почему комбинация иматиниба с селективным ингибитором FGFR-рецепторов (BGJ398) не оказывала цитотоксического и антипролиферативного эффекта в отношении клеток ГИСО 430?
2. Как может соотноситься экспрессия VEGF-A, FGFR1-2 в опухолевых клетках после терапии иматинибом *in vitro* и в клетках опухоли у пациентов?
3. Возможно ли прогнозировать активацию иных сигнальных путей при развитии вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей, помимо FGFR, VEGFR? Какими в таком случае могут быть терапевтические подходы?

Заключение

Диссертационная работа Дунаева Павла Дмитриевича «Механизмы вторичной резистентности к таргетным препаратам в патогенезе гастроинтестинальных стромальных опухолей», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3 – Патологическая физиология, является завершенной научно-квалификационной

работой, содержащей решение научной проблемы по исследованию роли рецепторных тирозинкиназ в механизмах вторичной резистентности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к таргетным препаратам, имеющей важное значение для патологической физиологии.

Рассматриваемая работа по актуальности, научной новизне, уровню проведенных исследований, теоретической и практической значимости полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., в действующей редакции Постановления Правительства Российской Федерации №1382 от 16 октября 2024 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Дунаев Павел Дмитриевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

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

Рукша Татьяна Геннадьевна

660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, зд. 1 "3"
тел. +7 (391) 228 36 49
e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

« 30 » июня 2025 г.

Подпись профессора Т.Г. Рукша заверяю:

Ученый секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО КрасГМУ
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор



Мельникова Надежда Николаевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский

университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, зд. 1
тел. +7 (391) 228-08-76 e-mail: rector@krasgmu.ru веб-сайт: <https://krasgmu.ru/>