

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ (ГИСТ) К ХИМИОПРЕПАРАТАМ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП

Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бойчук С.В.

Казанский государственный медицинский университет, ailuk000@mail.ru

Цель. Изучить механизмы репарации повреждений ДНК и апоптоза в клеточных линиях гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) в результате воздействия на них некоторых групп химиопрепаратов *in vitro* для оценки перспектив проведения химиотерапии пациентам с неоперабельными и/или метастатическими формами ГИСТ, а также пациентам с развившейся резистентностью к таргетным препаратам, например, иматинибу. **Материалы и методы.** Проведено исследование чувствительности опухолевых клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ), к ингибиторам топоизомераз II типа (доксорубин и этопозид), препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления винбластину, нокодазолу и паклитакселу), гидроксимочевине, цисплатине, а также таргетному препарату иматинибу. Экспрессию маркеров повреждения ДНК и апоптоза опухолевых клеток оценивали методом иммуноблоттинга. **Результаты.** Обнаружено, что клетки ГИСТ чувствительны к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. Вышеуказанные химиопрепараты индуцируют образование двуниевых разрывов ДНК в клетках ГИСТ и последующую их гибель по механизму апоптоза. Препараты, оказывающие влияние на веретено деления, а также цисплатин обладают наибольшим про-апоптотическим эффектом в отношении к клеткам ГИСТ. **Выводы.** Опухолевые клетки ГИСТ высоко чувствительны к препаратам, влияющим на динамическое состояние веретена деления, а также препаратам платины и, в меньшей степени, к ингибиторам топоизомераз II типа.

Ключевые слова: ГИСТ, повреждение и репарация ДНК, химиопрепараты, апоптоз.

SENSITIVITY OF GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS (GISTS) TO THE VARIOUS CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

Galembikova A.R., Dunaev P.D., Boichuk S.V.

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia, ailuk000@mail.ru

Aims. To study the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTS) to the various types of chemotherapeutic agents *in vitro* to further evaluate their potent clinical use in patients with metastatic, unresectable and imatinib-resistant forms of GISTS. **Materials and methods.** We examined the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTS) to the topoisomerases II inhibitors (doxorubicin and etoposide), microtubule-interacting drugs (paclitaxel, vinblastin and nocodazol), hydroxyurea, cis-platinum and imatinib. The expression of apoptosis and DNA damage markers was examined by western-blotting. **Results.** GISTS are sensitive to topoisomerase II inhibitors - doxorubicin and etoposide. These drugs effectively induced DNA double-strand breaks and apoptotic cell death in GISTS. The platinum-containing and the microtubule-interacting drugs were the most effective pro-apoptotic agents in GISTS. **Conclusion.** GISTS are highly sensitive to microtubule-interacting drugs, platinum-containing drugs and to the less extent to the topoisomerase type II inhibitors.

Keywords: gastrointestinal tumors (GISTS), DNA damage and repair, chemotherapeutic agents, apoptosis.

В настоящее время проведение химиотерапии больным с ГИСТ считается нецелесообразным по причине имеющейся точки зрения о химиорезистентности данных злокачественных новообразований [1]. Поэтому основным нехирургическим методом лечения больных с неоперабельными, рецидивирующими и/или метастатическими формами ГИСТ является проведение им таргетной терапии иматинибом (Гливеком), воздействующей на активирующую мутацию тирозинкиназного рецептора c-KIT в опухолевых клетках ГИСТ, следствием которой является усиление пролиферации и митотической активности

опухолевых клеток ГИСТ. Однако, несмотря на высокую изначальную эффективность применения таргетных препаратов (в том числе, иматиниба) в лечении пациентов с ГИСТ с течением времени к ним начинает развиваться резистентность, существенно образом снижающая эффективность их дальнейшего применения. Например, было установлено, что после 2-х лет с момента начала проведения таргетной терапии иматинибом у более чем у половины пациентов с ГИСТ развивается резистентность к данному препарату, обусловленная развитием в клетках ГИСТ вторичных мутаций [2,7]. Несмотря на открытие и внедрение в практическую онкологию таргетных препаратов второго и третьего поколения (Сутент и Регорафениб, соответственно) высокая частота побочных эффектов от их применения, а также развитие к ним вторичной резистентности опухоли, являются стимулом для поиска новых альтернативных решений в терапии больных с неоперабельными, рецидивирующими и метастатическими формами ГИСТ.

Также известно, что существующее в настоящее время мнение о химиорезистентности ГИСТ основано на результатах клинических наблюдений, проведенных до внедрения в практическую онкологию точных методов диагностики ГИСТ, позволяющих обнаружить совокупность гистологических и иммуногистохимических признаков, отличающих ГИСТ от других типов гладкомышечных и нейрогенных новообразований (например, лейомиосарком, лейомиом и шванном). Установлено, что данные типы опухолей обладают устойчивостью к большинству современных химиопрепаратов. Следовательно, отсутствие на момент проведения данных исследований точных методов дифференциальной диагностики ГИСТ и других гладкомышечных и нейрогенных злокачественных новообразований могли существенно образом повлиять на достоверность результатов исследований и привести к формированию ошибочного мнения о химиорезистентности ГИСТ.

В соответствии с вышеизложенным, представляло интерес изучение способности химиопрепаратов различных групп оказывать анти-пролиферативный эффект по отношению к клеткам ГИСТ и вызывать их гибель по механизму апоптоза.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия ГИСТ T-1, чувствительная к действию таргетного препарата иматиниба. Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C, 5%CO₂) в культуральной среде RPMI-1640 (ПанЭКО) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамин (все реагенты ПанЭКО). Опухолевые клетки ГИСТ культивировали с доксорубицином, винбластином, нокадазолом, паклитакселом, иматинибом (Sigma), этопозидом, гидроксимочевинной (Calbiochem). Изменение уровня экспрессии белков-маркеров повреждения ДНК и маркеров

апоптоза оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител (мАТ).

Результаты исследований и их обсуждение.

Было обнаружено, что инкубация опухолевых клеток ГИСТ Т-1 с химиопрепаратами индуцирует их гибель по механизму апоптоза. Об этом свидетельствовало значительное повышение уровней экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 в клетках ГИСТ после их инкубации с большинством из химиопрепаратов (РИС.1А). Наибольший про-апоптогенный эффект был обнаружен у препаратов платины, а также препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (в частности, винбластина). Ингибиторы топоизомеразы II типа доксорубин и этопозид также вызывали гибель клеток ГИСТ по механизму апоптоза, тем не менее их эффект был менее выраженным. Примечательно, что уровень экспрессии одного из расщепленных фрагментов ПАРП (мол. массой 86 кДа) в опухолевых клетках ГИСТ коррелировал с уровнем экспрессии каспазы-3, что согласуется с данными литературы, свидетельствующими о способности каспаз (в том числе каспазы-3) индуцировать расщепление ПАРП на 2 фрагмента молекулярной массой 86 и 24 кДа, соответственно [6]. Важно отметить, что про-апоптогенный эффект ряда химиопрепаратов (этопозид, цисплатины, а также всех препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек) был более выраженным по сравнению с действием таргетного препарата иматиниба. Была также выявлена корреляционная зависимость между про-апоптогенным эффектом вышеназванных химиопрепаратов и их способностью индуцировать повышение уровня экспрессии гистона 2А, фосфорилированного по остаткам серина в положении 139 (γ -H2AX) (РИС.1Б). Известно, что данная форма гистона является общепризнанным маркером двунитевых разрывов ДНК, а также накапливается в М-фазе клеточного цикла, в частности, за счет АТМ- или DNA-PKcs/Chk2-опосредованных механизмов фосфорилирования данной формы гистона даже на фоне отсутствия каких-либо повреждений ДНК, в том числе, двунитевых разрывов [4, 5]. В клетках ГИСТ, инкубированных с таргетным препаратом иматинибом, происходило умеренное повышение уровня экспрессии γ -H2AX, коррелировавшее с уровнем экспрессии расщепленной формы ПАРП, являющейся маркером апоптоза. Эти данные коррелируют с данными литературы, свидетельствующими о способности H2AX индуцировать апоптоз клеток ГИСТ под влиянием иматиниба [3].

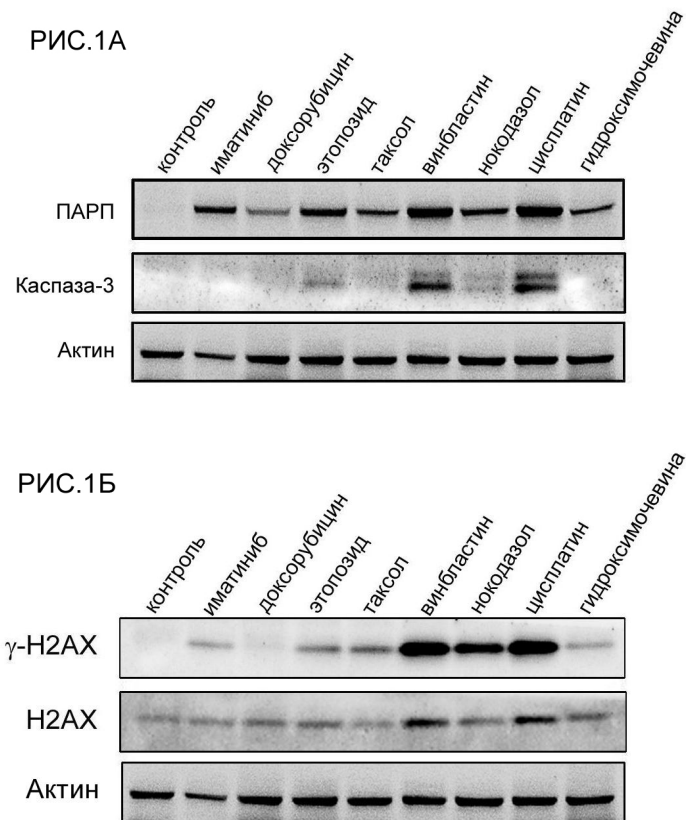


РИС. 1. Способность химиопрепаратов и таргетного препарата иматиниба индуцировать апоптоз (А) и вызывать фосфорилирование гистона H2AX – γ -H2AX (Б) в клетках ГИСТ T-1.

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о способности химиопрепаратов индуцировать гибель клеток ГИСТ по механизму апоптоза. Наибольшим про-апоптогенным эффектом в отношении опухолевых клеток ГИСТ обладают препараты, влияющие на динамическое состояние микротрубочек, а также препараты платины. Полученные нами результаты свидетельствуют о чувствительности опухолевых клеток ГИСТ к некоторым химиопрепаратам, что ставит под сомнение существовавшую в настоящее время точку зрения о химиорезистентности у ГИСТ.

Заключение. Клетки ГИСТ чувствительны к ингибиторам топоизомеразы II типа, индуцирующим образование двунитевых разрывов ДНК и последующую гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза. Наиболее эффективными химиопрепаратами в отношении клеток ГИСТ явились препараты, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления – винбластин и паклитаксел. Полученные нами экспериментальные данные о чувствительности клеток ГИСТ к некоторым химиопрепаратам *in vitro* свидетельствуют о перспективности использования вышеназванных химиопрепаратов в лечении больных с

неоперабельными, рецидивирующими и/или метастатическими формами ГИСТ, а также формами рефрактерными к монотерапии таргетным препаратом, в частности, иматинибом.

Работа финансировалась грантом Российского Научного Фонда (РНФ) № 14-15-00342.

Список литературы

1. Dematteo R.P., Heinrich M.C., El-Rifai W.M., Demetri G . Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. Hum Pathol. 2002; 33: 466–77.
2. Gramza A.W., Corless C.L., Heinrich M.C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res. 2009;15: 7510–8.
3. Liu Y., Tseng M., Perdreau S.A., et al. Histone H2AX is a mediator of gastrointestinal stromal tumor cell apoptosis following treatment with imatinib mesylate. Cancer Res. 2007; 67: 2685–92.
4. McManus KJ, Hendzel MJ. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. Mol Biol Cell 2005; 16:5013-25.
5. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. 1998;273:5858–5868.
6. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, et.al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell. 1995;81(5):801-9.
7. Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J., et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomised trial. Lancet. 2004; 364: 1127–32.

Рецензенты:

Фассахов Р.С., д.м.н., профессор, директор ФБУН Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань.

Поздеев О.К., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии ГБОУ ДПО Казанская государственная медицинская академия.