

Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам топоизомераз II типа

С. В. Бойчук^{1,2}, А. Р. Галембикова¹, Б. Р. Рамазанов¹, А. Дусинг²

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Россия, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49;

²Раковый центр Университета г. Питтсбурга;

США, 15232, Пенсильвания, Питтсбург, Центральная авеню, 5117

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Цель исследования — изучить механизмы чувствительности клеточных линий гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) к ингибиторам топоизомераз II типа, а также способность иматиниба модулировать чувствительность ГИСО к вышеуказанным химиопрепаратам.

Материалы и методы. Проведено исследование чувствительности некоторых клеточных линий ГИСО к ингибиторам топоизомераз II типа, а также способности таргетного препарата иматиниба моделировать чувствительность клеток ГИСО к данным химиопрепаратам. Экспрессию маркеров повреждения и репарации ДНК оценивали методом иммуноблоттинга. Апоптоз клеток ГИСО оценивали методом иммуноблоттинга по уровню экспрессии расщепленной формы поли(аденозиндифосфат-рибоза)-полимеразы, а также каспазы-3. Кроме того, подсчет апоптотических клеток проводили методом проточной цитометрии по изменению интенсивности флуоресценции красителя пропидия йодида и обнаружению гиподиплоидных клеток.

Результаты. Обнаружено, что клетки ГИСО чувствительны к ингибиторам топоизомеразы II типа — этопозиду и доксорубину. Вышеуказанные химиопрепараты индуцируют образование двунитевых разрывов ДНК в клетках ГИСО и последующую их гибель по механизму апоптоза. Иматиниб повышает чувствительность клеток ГИСО к данным химиопрепаратам, что может быть обусловлено снижением способности клеток ГИСО справляться с генотоксическим стрессом по причине ослабления процессов гомологичной рекомбинации поврежденных ДНК. Иматиниб-индуцированное снижение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО является следствием ее усиленной протеасом-зависимой деградации.

Выводы. Клеточные линии ГИСО чувствительны к ингибиторам топоизомераз II типа. Иматиниб способен повышать чувствительность клеток ГИСО к данным химиопрепаратам.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, иматиниб, химиопрепараты, апоптоз, повреждение и репарация ДНК, рекомбиназа Rad51

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.076–081

Imatinib enhances the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to topoisomerase II inhibitors

S. V. Boichuk^{1,2}, A. R. Galembikova¹, B. R. Ramazanov¹, A. Duensing²

¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan, 420012, Russia;

²Hillman Cancer Center, University of Pittsburgh;

5117 Centre Ave, Pittsburgh, PA, 15232, USA

Objective: to study the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to the topoisomerases type II inhibitors and ability of imatinib to enhance GISTs sensitivity to the chemotherapeutic drugs indicated above.

Subjects and Methods. We studied the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to the topoisomerases II inhibitors and ability of imatinib to enhance GISTs sensitivity to these chemotherapeutic agents. The expression of DNA damage and repair (DDR) markers was examined by western-blotting. Cleaved forms of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3 were served as an apoptotic markers measured by western blotting. Amount of apoptotic cells was counted by flow cytometry analysis by using a propidium iodide DNA staining procedure and counting the numbers of hypodiploid cells.

Results. We observed the sensitivity of GISTs to topoisomerase II inhibitors — doxorubicine and etoposide inducing DNA double-strand breaks and apoptotic cell death. Imatinib enhances GISTs sensitivity to topoisomerase II inhibitors. This might be due to reduced ability of GISTs to repair DNA damage by homologous recombination. Imatinib-induced reduction of Rad51 recombinase might be due to increased proteasome-dependent degradation.

Conclusion. GIST cells are sensitive to topoisomerase II inhibitors (etoposide and doxorubicin) in vitro. Imatinib enhances GISTs sensitivity to the chemotherapeutic agents indicated above.

Key words: gastrointestinal tumors, imatinib, chemotherapeutic agents, DNA damage and repair, apoptosis, Rad51 recombinase

Введение

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) являются гистологически и молекулярно-генетически гетерогенными новообразованиями, происходящими из интерстициальных клеток Каюла, регулирующих в норме моторику желудочно-кишечного тракта. Установлено, что основным патогенетическим механизмом развития большинства ГИСО (до 85 % случаев) является активирующая мутация гена тирозинкиназного рецептора *c-KIT*, связывающегося в норме со стволовым клеточным фактором. В редких случаях (до 5 %) мутации происходят в гене, кодирующем тирозинкиназный рецептор тромбоцитарного фактора роста (например *PDGFR-α*). Так как результатом активирующей мутации гена тирозинкиназного рецептора *c-KIT* в ГИСО является стимуляция их митотической активности и пролиферации, вполне логичной схемой лечения больных ГИСО считается проведение таргетной терапии относительно селективным ингибитором тирозинкиназ — иматинибом (Гливеком), основной механизм действия которого основан на конкурентном взаимодействии с аденозинтрифосфат-связывающим участком тирозинкиназных рецепторов *KIT*, *PDGFR-α* и $-β$ и др. На сегодняшний день использование данного препарата считается общепринятым для лечения рецидивирующих и метастатических опухолей, что позволяет увеличить продолжительность жизни больных ГИСО более чем в 2 раза.

Тем не менее, несмотря на впечатляющую эффективность проведения таргетной терапии иматинибом на начальных сроках использования данного препарата, стабилизации опухолевого процесса удается добиться не более чем у 30 % пациентов с ГИСО, а описанные в литературе случаи длительных ремиссий после назначения данной схемы лечения являются единичными. Кроме того, после 2 лет с момента начала проведения таргетной терапии иматинибом более чем у половины пациентов с ГИСО начинает развиваться резистентность к данному препарату, обусловленная развитием вторичных мутаций в клетках опухоли [1, 2]. Вышеизложенное явилось предпосылкой для разработки и внедрения в практическую онкологию таргетных препаратов второго и третьего поколения — сунитиниба (Сутент) [3] и регорафениба (Стиварга) [4, 5], воздействующих сразу на несколько типов тирозинкиназ и подавляющих их активность. Например, было показано, что применение сунитиниба после иматиниба существенно увеличивает время до прогрессирования процесса (27 нед против 6 нед), а регрессия была отмечена у 7–9 % больных [3].

Известно, что проведение химиотерапии больным ГИСО в настоящее время считается нецелесообразным из-за существующей точки зрения о химиорезистентности данных опухолей [6]. Имеются данные о том, что даже несмотря на агрессивные схемы системной химиотерапии средняя выживаемость у больных с неоперабельными и метастатическими ГИСО

не превышает 2 лет. Эффективность химиотерапии в целом составляет не более 10 %, а общая выживаемость при ее проведении — 8–9 мес [7, 8].

Тем не менее результаты проведенных нами ранее исследований показали, что некоторые химиопрепараты могут быть эффективными по отношению к клеточным линиям ГИСО *in vitro* [9]. Примечательно, что данный эффект химиопрепаратов был выявлен как в отношении иматиниб-чувствительных, так и резистентных к иматинибу клеточных линий ГИСО. Изучение состояния различных систем репарации повреждений ДНК в разных клеточных линиях ГИСО выявило ряд существенных изменений в фоновом уровне экспрессии ряда белков, участвующих в репарации повреждений ДНК, что свидетельствует о возможной чувствительности опухолевых клеток ГИСО к некоторым химиопрепаратам, в частности ингибиторам топоизомераз [10].

Исходя из вышеизложенного, представляло интерес изучение противоопухолевой активности ингибиторов топоизомераз II типа в отношении клеток ГИСО, а также способности таргетного препарата иматиниба повышать их чувствительность к вышеуказанным препаратам.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были выбраны клеточные линии ГИСО 882 и Т-1, обладающие чувствительностью к иматинибу. Клетки ГИСО культивировали в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂) в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (15 %), антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамина (все реагенты — Invitrogen). Клетки культивировали с иматинибом в течение 24 ч с последующим внесением доксорубина (Sigma) или этопозида (Calbiochem). В качестве контроля клетки инкубировали с каждым из вышеуказанных препаратов в отдельности. Экспрессию белков оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител. Анализ клеточного цикла, а также подсчет гиподиплоидных (апоптозных) клеток осуществляли методом проточной цитометрии (FACSCanto II, Vector Dickinson). Оценку внутриклеточного распределения белков проводили методом иммунофлуоресцентной микроскопии. В отдельных случаях клетки ГИСО инкубировали с ингибитором протеасом MG-132 (Sigma), а также с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом (Sigma).

Результаты и обсуждение

Выявлена чувствительность клеточных линий ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II — этопозиду и доксорубину (рис. 1). В клетках ГИСО данные препараты время- и дозозависимо индуцировали развитие генотоксического стресса, что проявлялось накоплением двунитевых разрывов ДНК. В пользу этого

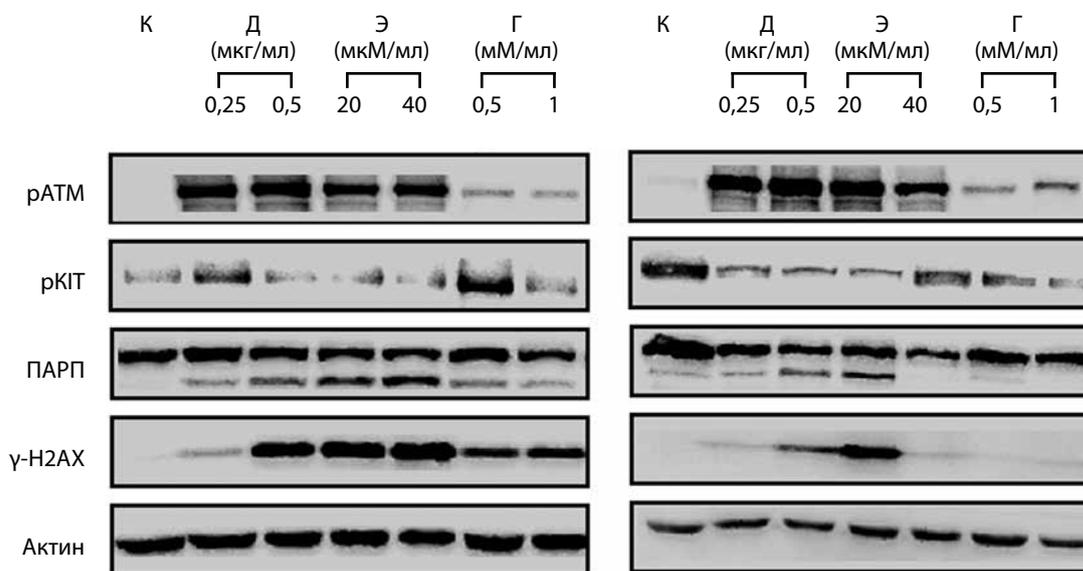


Рис. 1. Состояние белков репарации повреждений ДНК в условиях генотоксического стресса, вызванного химиопрепаратами, в клеточных линиях ГИСО 882 (а) и Т-1 (б). Уровень экспрессии поли(аденозиндифосфат-рибоза)-полимеразы (ПАРП), фосфорилированных форм АТМ-киназы (рАТМ), с-К1Т (рК1Т) и гистона 2А (γ-Н2АХ), а также актина. К – контроль; Д – доксорубицин; Э – этопозид; Г – гидроксимочевина; цифрами отмечена доза препарата

свидетельствовало дозозависимое повышение уровня экспрессии гистона 2А (Н2АХ), фосфорилированного по остаткам серина в положении 139, именуемого в дальнейшем γ-Н2АХ, который является общепризнанным маркером двунитевых разрывов ДНК (см. рис. 1). Было также выявлено существенное повышение фокального распределения данной формы гистона в клетках ГИСО после их инкубации с препаратами по сравнению с контролем. Обнаружено, что уровень экспрессии γ-Н2АХ в клетках ГИСО после их инкубации с исследованными соединениями коррелировал с повышенным уровнем экспрессии фосфорилированной (т.е. активированной) формы АТМ-киназы (рАТМ Ser1981), являющейся, как известно, одним из ключевых факторов, фосфорилирующих Н2АХ и запускающих каскад реакций, направленных на репарацию двунитевых разрывов ДНК (см. рис. 1). Примечательно, что при инкубации клеток ГИСО с химиопрепаратами из группы сравнения (например гидроксимочевинной) уровень экспрессии γ-Н2АХ был существенно ниже по сравнению с клетками ГИСО, инкубированными с доксорубицином и этопозидом.

Обнаруженный нами эффект ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа по отношению к клеткам ГИСО линий 882 и Т-1 был также времязависимым (рис. 2). В частности, было показано увеличение уровня экспрессии γ-Н2АХ и рАТМ Ser1981 в обеих клеточных линиях после их инкубации с доксорубицином (см. рис. 2). Индукция двунитевых разрывов ДНК в клетках ГИСО сопровождалась активацией механизмов репарации вышеназванных повреждений ДНК, в частности процессов гомологичной рекомбинации. В пользу этого свидетельствовало значительное повышение уровня экспрессии белка Rad51 (см. рис. 2) и его фокального

распределения в клетках ГИСО после инкубации с вышеуказанными химиопрепаратами. Об активации механизмов репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО, инкубированных с химиопрепаратами, также свидетельствовало значительное увеличение уровня экспрессии фосфорилированной (т.е. активированной) формы белка p53 (p53 Ser15). Тем не менее, несмотря на активацию в клетках ГИСО механизмов репарации повреждений ДНК, вызываемых ингибиторами топоизомеразы II, спустя 48 ч инкубации кле-

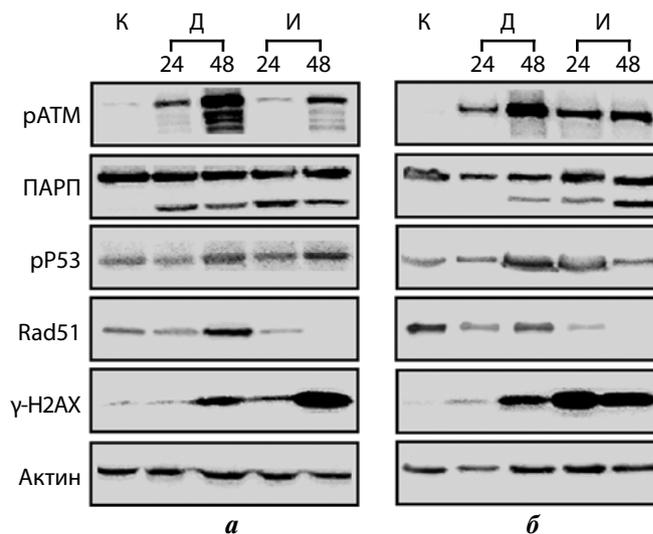


Рис. 2. Состояние белков репарации повреждений ДНК в условиях генотоксического стресса, вызванного доксорубицином и иматинибом, в клеточных линиях ГИСО 882 (а) и Т-1 (б). Уровень экспрессии ПАРП, фосфорилированных форм АТМ-киназы (рАТМ), белка p53 (рP53) и Н2АХ (γ-Н2АХ), а также рекомбиназы Rad51 и актина. К – контроль; Д – доксорубицин; И – иматиниб; цифрами отмечено время экспозиции каждого препарата (в часах)

ток с данными соединениями наблюдалась их гибель по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало дозо- и времязависимое увеличение уровня экспрессии расщепленной формы ПАРП (см. рис. 1, 2). Известно, что расщепленные фрагменты данного фермента (например, 86 и 24 кДа) появляются в результате активации каспазы-3 и каспазы-7, и поэтому они являются общепризнанным маркером апоптоза.

Интересным, на наш взгляд, представляется обнаруженный нами факт накопления γ -H2AX в клетках ГИСО под влиянием иматиниба (см. рис. 2). Появление γ -H2AX в клетках ГИСО, инкубированных с иматинибом, является важным проапоптогенным сигналом и обуславливает способность таргетного препарата индуцировать гибель клеток ГИСО по механизму апоптоза [11–13].

Мы обнаружили, что инкубация клеток ГИСО с иматинибом также приводит к времязависимому снижению уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 (см. рис. 2). Для изучения возможных механизмов снижения уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО под действием иматиниба были проведены следующие эксперименты. Было показано, что в клетках ГИСО линии Т-1 период полужизни рекомбиназы Rad51 составляет около 12 ч (рис. 3а), в то время как инкубация клеток ГИСО с иматинибом на фоне ингибитора элонгации мРНК циклогексимида приводила к существенному снижению уровня экспрессии данного белка в аналогичные сроки культивирования (рис. 3б). Одним из возможных механизмов снижения уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО под влиянием иматиниба может быть усиление процессов протеасом-зависимой деградации данного белка. В пользу этого свидетельствуют полученные нами данные о способности ингибитора протеасом MG-132 препятствовать снижению уровня экспрессии белка Rad51 в клетках ГИСО, инкубированных с иматинибом (рис. 4).

Ослабление уровня экспрессии белка Rad51 в клетках ГИСО, инкубированных с иматинибом, может свидетельствовать о способности данного таргетного препарата ослаблять эффективность процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО, а следовательно, увеличивать чувствительность клеток к воздействию химиопрепаратов.

Для проверки этой гипотезы клетки ГИСО культивировали с иматинибом в течение 24 ч с последую-

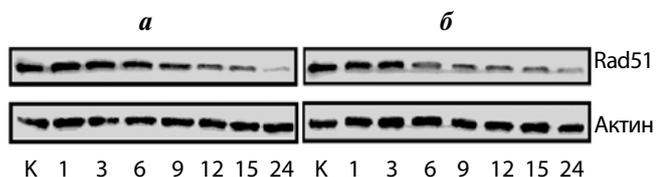


Рис. 3. Уровень экспрессии белков Rad51 и актина в клеточной линии ГИСО Т-1 при 24-часовой экспозиции с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом (а) или его комбинацией с иматинибом (б). К – контроль; цифрами обозначено время экспозиции (в часах)

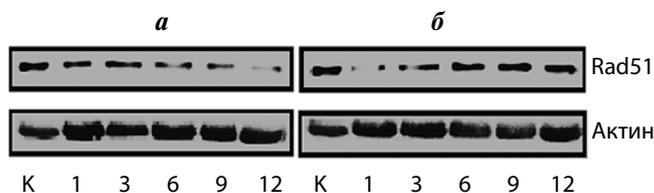


Рис. 4. Уровень экспрессии белков Rad51 и актина в клеточной линии ГИСО Т-1 при 12-часовой экспозиции с иматинибом (а) или его комбинацией с ингибитором протеасом MG-132 (б). К – контроль; цифрами обозначено время экспозиции (в часах)

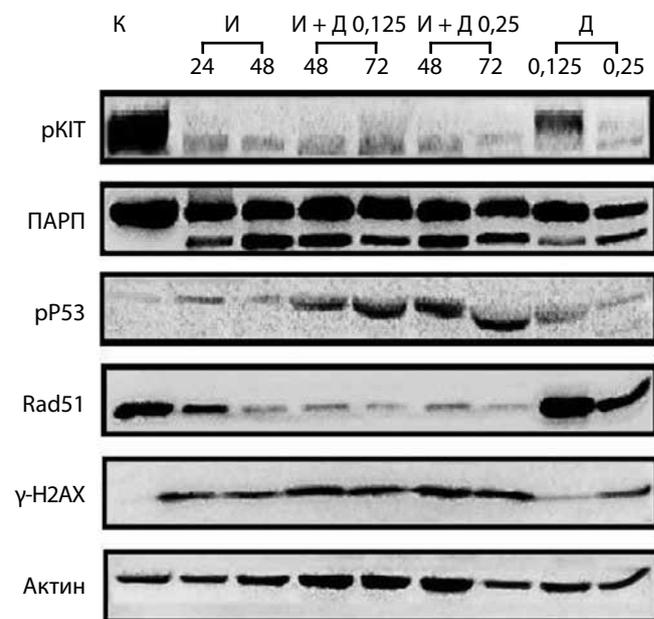


Рис. 5. Состояние белков репарации поврежденных ДНК в клетках ГИСО Т-1, инкубированных с иматинибом и доксорубицином. Уровень экспрессии фосфорилированных форм с-К1Т (pK17), белка p53 (pP53), H2AX (γ -H2AX), а также ПАРП, Rad51 и актина. К – контроль; И – иматиниб; Д – доксорубицин; цифрами 24, 48, 72 отмечено время экспозиции каждого препарата (в часах); цифрами 0,125 и 0,25 – концентрация доксорубицина в мкг/мл

щим внесением в культуру клеток ингибиторов топоизомераз II типа – доксорубицина (рис. 5) или этопозида (рис. 6). Было обнаружено, что культивирование клеток ГИСО с иматинибом и доксорубицином приводит к значимому повышению уровня экспрессии γ -H2AX, а также фосфорилированной формы белка p53 (см. рис. 5). Аналогичный эффект наблюдался при культивировании клеток ГИСО с иматинибом и этопозидом (см. рис. 6). Важным, на наш взгляд, является факт отсутствия повышения уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО в данных экспериментальных условиях, что свидетельствует о несостоятельности процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО, несмотря на наличие значительных повреждений ДНК, а именно двунитевых разрывов. Примечательно, что была отмечена обратная зависимость между уровнем экспрессии рекомбиназы Rad51 и повреждением ДНК, оцениваемым по уровню экспрессии γ -H2AX, что также может свидетельствовать о снижении эффективности

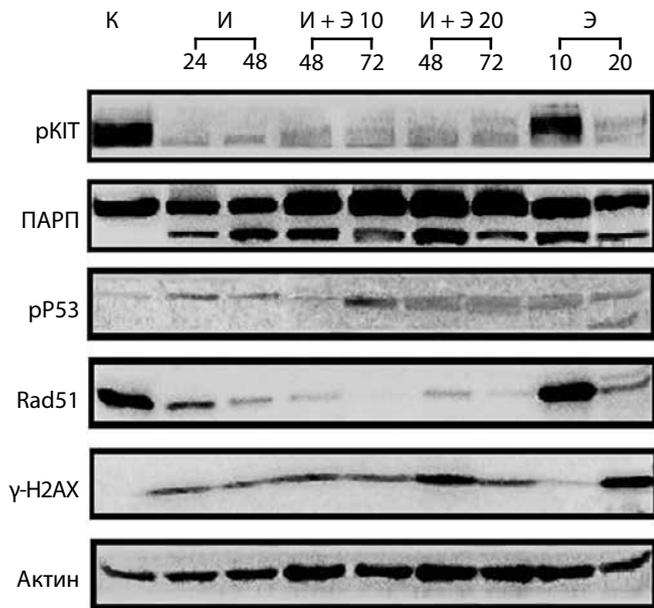


Рис. 6. Состояние белков репарации поврежденных ДНК в клетках ГИСО T-1, инкубированных с иматинибом и этопозидом. Уровень экспрессии фосфорилированных форм c-KIT (pKIT), белка p53 (pP53), H2AX (γ -H2AX), а также PARP, Rad51 и актина. К – контроль; И – иматиниб; Э – этопозид; цифры 24, 48, 72 отмечено время экспозиции каждого препарата (в часах), цифры 10 и 20 – концентрация этопозидов в мкМ/мл

процессов репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации.

Результатом несостоятельности процессов репарации повреждений ДНК в данных экспериментальных условиях явилось значимое усиление экспрессии расщепленной формы PARP (по сравнению с клетками ГИСО, инкубированными только с химиопрепаратом), что свидетельствовало об усилении гибели клеток ГИСО по механизму апоптоза. Усиление гибели клеток ГИСО по механизму апоптоза было подтверждено методом проточной цитометрии, позволившим выявить достоверно значимое повышение количества гиподиплоидных клеток по сравнению с клетками ГИСО, инкубированными только с иматинибом или ингибиторами топоизомераз II типа.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о способности некоторых ингибиторов топоизомераз II типа индуцировать гибель клеток ГИСО по механизму апоптоза и, таким образом, ставят под сомнение традиционную точку зрения о химиорезистентности клеток ГИСО. Известно, что данная точка зрения ба-

зировалась в основном на результатах клинических исследований, проведенных задолго до внедрения в практическую онкологию точных методов диагностики ГИСО, позволяющих обнаружить совокупность гистологических и иммуногистохимических признаков, отличающих данный тип опухолей от других гладкомышечных и нейрогенных новообразований (например лейомиом, лейомиосарком и шванном). Известно, что последние отличаются устойчивостью к большинству современных химиопрепаратов. Поэтому присутствие пациентов с вышеуказанными новообразованиями могло существенным образом повлиять на достоверность результатов проведенных ранее клинических исследований.

Обнаруженный нами факт иматиниб-индуцированного снижения уровня рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО свидетельствует об ослаблении механизмов гомологичной рекомбинации в этих клетках, что делает их более чувствительными к генотоксическому стрессу, индуцируемому доксорубицином и этопозидом. Данный факт может обуславливать повышенную чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам топоизомераз II типа на фоне проведения таргетной терапии.

Заключение

Некоторые клеточные линии ГИСО обладают чувствительностью к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, индуцирующим их гибель по механизму апоптоза. Инкубация клеток ГИСО с иматинибом в значительной степени повышает их чувствительность к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II – доксорубицину и этопозиду. Этот феномен может являться следствием способности иматиниба снижать эффективность процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО. Полученные нами экспериментальные данные о способности иматиниба повышать чувствительность клеток ГИСО к некоторым химиопрепаратам свидетельствуют о потенциальной возможности и перспективности проведения комбинированной (иматиниб + ингибитор ДНК-топоизомеразы II типа) терапии больным с неоперабельными формами ГИСО, а также рефрактерными к монотерапии таргетным препаратом.

Благодарности

Работа финансировалась грантом Российского научного фонда № 14-15-00342.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gramza A. W., Corless C. L., Heinrich M. C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2009;15(24):7510–8.
2. Verweij J., Casali P. G., Zalcberg J. et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. Lancet 2004;364(9440):1127–34.
3. Hopkins T. G., Marples M., Stark D. Sunitinib in the management of gastrointestinal stromal tumours (GISTs). Eur J Surg Oncol 2008;34(8):844–50.

4. Boichuk S., Rausch J., Duensing A. New developments in management of gastrointestinal stromal tumors: regorafenib, the new player in the team. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 2014;4:1–10.
5. Demetri G. D., Reichardt P., Kang Y. K. et al. GRID study investigators. 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. *Lancet* 2013;381(9863):295–302.
6. 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(5):466–77.
7. Blay J. Y., Reichardt P. Advanced gastrointestinal stromal tumor in Europe: a review of updated treatment recommendations. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9(6):831–8.
8. Casper E. S. Gastrointestinal stromal tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2000;1(3):267–73.
9. Boichuk S., Lee D. J., Mehalek K. R. et al. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2014;74(4):1200–13.
10. Бойчук С. В., Рамазанов Б. Р., Галембикова А. Р. и др. Состояние системы репарации повреждений ДНК в гастроинтестинальных опухолях и перспективы их терапии. *Казанский медицинский журнал* 2014;(6):888–91. [Boichuk S. V., Ramazanov B. R., Galembikova A. R. et al. Condition of repair system of DNA damage in gastrointestinal tumors and prospects of their therapy. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2014;(6):888–91. (In Russ.)].
11. Bauer S., Parry J. A., Mühlenberg T. et al. Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Res* 2010;70(1):150–9.
12. 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(6):2685–92.
13. Wu D., Ingram A., Lahti J. H. et al. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem* 2002;277(14):12001–8.