

ГАЛЕМБИКОВА АЙГУЛЬ РАФИКОВНА

**МЕХАНИЗМЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК
ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ К
ИНГИБИТОРАМ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II ТИПА**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Казань – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (**ректор – академик АН РТ, доктор медицинских наук, профессор Созинов Алексей Станиславович**).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Бойчук Сергей Васильевич

Официальные оппоненты:

Киямова Рамзия Галлямовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии медико-психолого-фармацевтический факультета; проректора по инновационному развитию и международной деятельности федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Казанская государственная медицинская академия – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «12» сентября 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2019 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) являются наиболее часто диагностируемыми мезенхимальными новообразованиями желудочно-кишечного тракта. Исторически термин «гастроинтестинальная стромальная опухоль» использовался для описания опухолей желудочно-кишечного тракта, классифицируемых световой микроскопией как лейомиома, лейомиосаркома или лейомиобластома, демонстрирующих ультраструктурные и иммуногистохимические особенности, которые давали возможность определять их негладкомышечное происхождение. Затем в 1998 году иммуногистохимически было обнаружено, что практически все эти опухоли были положительными по тирозинкиназному рецептору KIT (CD117) и имели мутации *c-KIT*, приводящие к лиганд-независимой активации этой киназы (Joensuu H., 2013, C. Boruban et al., 2007). В дальнейшем эти мутации стали определяющими в патогенезе развития ГИСО. 70-85% мутаций обнаруживается в 9 и 11-м экзонах *c-KIT*, около 5% мутаций приходится на ген, кодирующий тирозинкиназный рецептор тромбоцитарного фактора роста альфа (*PDGFR α*) (T. Wakai et al., 2004, M. Miettinen, 1988). С тех пор термин «ГИСО» используется для описания мезенхимальных желудочно-кишечных новообразований, являющихся KIT-позитивными и имеющих активирующие мутации *KIT* или *PDGFR α* , хотя остается небольшая часть ГИСО (до 10%), которая не имеет данных признаков.

В 2001 г. был впервые применен таргетный препарат иматиниб (Гливек) в лечении больной с диссеминированной формой ГИСО, который оказался весьма эффективным и сразу стал применяться в качестве монотерапии данного заболевания. Несмотря на высокую эффективность таргетной терапии в отношении ГИСО, более чем у 50% пациентов развивается вторичная лекарственная устойчивость после 2-х лет непрерывной таргетной терапии (J. Verweij et al., 2004; A.W. Gramza et al., 2009). Более того, молекулярно-генетические особенности ГИСО могут обуславливать существенные различия в чувствительности опухолей к ИМ. Высокая чувствительность к ИМ достигается при мутациях в 11 экзоне *c-KIT*, а первичная резистентность – при «диком типе» *c-KIT* и *PDGFR β* . Для пациентов с первичной и вторичной, имеющих первичную или вторичную резистентность к ИМ в качестве препарата второй линии терапии используется сунитиниб (Сутент), обладающей способностью ингибировать активность многих рецепторных тирозинкиназ, в том числе, KIT и PDGFR, а также, рецептора сосудистого фактора роста (VEGFR), рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF-1R) и др. Большей чувствительностью к сунитинибу обладают пациенты с первичной мутацией в 9 экзоне *c-KIT* и «диким типом» по сравнению с пациентами, имеющими мутацию в 11-м экзоне. В настоящее время различные таргетные препараты проходят исследования второй и третьей фазы, в качестве препаратов терапии

третьей линии (сорафениб) и дополнения к иматинибу (бевацизумаб). Клиническая гетерогенность ГИСО и неизбежное развитие устойчивости к таргетной терапии затрудняют создание универсальных алгоритмов лечения, и диктует необходимость поиска новых путей блокады опухолевой прогрессии.

По мнению большинства исследователей, в настоящее время ГИСО считаются опухолями, резистентными к большинству химиопрепаратов. Действительно, по данным различных авторов, эффективность различных химиопрепаратов является низкой и варьирует от 0 до 27% (R. P. Dematteo et al., 2002). Тем не менее, важно отметить, что данное мнение было сформировано на основании результатов клинических исследований, проведенных до внедрения в практическую онкологию основного диагностического критерия – экспрессии CD117, позволяющего дифференцировать ГИСО от других гладкомышечных и нейрогенных новообразований (лейомиосаркома, лейомиома, шваннома и пр.). Известно, что данные типы злокачественных новообразований обладают химиорезистентностью. Следовательно, эти данные могли привести к формированию ошибочного мнения о химиорезистентности ГИСО.

Цель исследования

Изучить механизмы чувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

Задачи исследования

1. Сравнить состояние системы репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО и лейомиосарком.
2. Оценить чувствительность ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.
3. Изучить способность иматиниба повышать чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

Методы и методология

В работе использовался ряд современных методов молекулярной биологии, биохимии и генетики: культивирование клеточных линий, вестерн-блоттинг, спектрофотометрия, проточная цитофлюорометрия, полимеразная цепная реакция.

Научная новизна

В рамках диссертационного исследования впервые было изучено состояние систем репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО и лейомиосарком. Были обнаружены нарушения процессов репарации двунитевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. Кроме того, в клетках ГИСО была выявлена гиперэкспрессия топоизомеразы II типа. Впервые были получены данные о чувствительности клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа *in vitro*. Примечательно, что цитотоксический эффект химиопрепаратов (доксорубицин и этопозид) был выявлен как в отношении ИМ-чувствительных, так и ИМ-резистентных

клеточных линиях ГИСО, что свидетельствует об ошибочности существовавшей ранее точки зрения о химиорезистентности ГИСО.

Впервые были получены данные о способности таргетного препарата ИМ ингибировать процессы репарации повреждений ДНК посредством гомологичной рекомбинации. Эти данные не только дополнили современные представления о молекулярном механизме действия данного таргетного препарата, но и открыли перспективы для его сочетанного применения с ингибиторами ДНК-топоизомеразы II типа, в том числе, у пациентов с развившейся устойчивостью к ИМ на фоне проводимой таргетной терапии.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты иллюстрируют важность изучения состояния систем репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках, так как эта область исследования позволяет обнаружить новые мишени для терапии злокачественных новообразований.

Экспериментальные данные свидетельствуют о чувствительности ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. Данные результаты имеют большое практическое значение и открывают перспективы для проведения химиотерапии больным с ГИСО, особенно после развившейся устойчивости опухоли к ИМ.

Результаты проведенного диссертационного исследования позволяют углубить современные представления о молекулярном механизме действия ИМ и открывают новые стратегии в противоопухолевой терапии ГИСО, в частности комбинированного использования ИМ и ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа.

Материалы диссертации могут быть использованы в медицинских ВУЗах в учебном процессе для преподавания разделов: «Патофизиология опухолевого роста», «Медицинские биотехнологии», а также в научно-исследовательской работе для дальнейшего изучения механизмов чувствительности и резистентности опухолевых клеток к различным противоопухолевым агентам.

Положения, выносимые на защиту

1. Гастроинтестинальные стромальные опухоли являются чувствительными к действию химиопрепаратов – ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа.
2. Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа посредством ингибирования процессов репарации двунитевых разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации ДНК

Личный вклад

Автором выбрана тема, составлена программа, определены этапы диссертационной работы, проведен анализ научной литературы по изучаемой проблеме. Автором выполнены

экспериментальные исследования на всех этапах диссертационной работы, которые проводились в лаборатории кафедры общей патологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» МЗ РФ (заведующий кафедрой, д.м.н., профессор Бойчук С.В.). Автором проведена статистическая обработка, группировка, анализ результатов, интерпретированы полученные данные. Формулирование выводов, рекомендаций, положений, выносимых на защиту, принадлежат лично автору.

Соответствие паспорту специальности

Основные положения, рекомендации и выводы диссертационной работы соответствуют искомой специальности 14.01.12 – онкология и области исследований п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и п.6. «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством экспериментов, современными методами исследования, соответствующими поставленным целям и задачам. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены фактическими данными, наглядно представленными в приведенных рисунках и таблицах. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской конференции «Петровские чтения – 2014» (Санкт-Петербург, 2014 г.), «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, 2015), Всероссийском научном медицинском форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2016, 2017), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2016, 2017).

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры общей патологии для преподавания раздела «Патогенез опухолевого роста» и курса «Медицинские биотехнологии» Казанского государственного медицинского университета и в научно-исследовательской работе лаборатории при кафедре общей патологии для дальнейшего изучения механизмов чувствительности и резистентности опухолевых клеток к различным противоопухолевым препаратам.

Публикации

Основные результаты диссертационного исследования отражены в 14 научных работах, из них 10 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 4 тезиса докладов на международных и всероссийских конференциях и форумах.

Объём и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, заключения, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 262 источника, из которых 243 зарубежных авторов. Работа изложена на 148 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами и 21 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были выбраны опухолевые клеточные культуры линии GIST-T1, GIST 882, GIST 430, GIST 48 (гастроинтестинальная стромальная опухоль), SK-LMS-1, SK-UT-1 (лейомиосаркома), а также BJ tert (фибробласты человека) в качестве контроля.

Вышеуказанные клеточные линии культивировали в чашках Петри p100 (Corning, США) в полной культуральной среде (ПКС) с добавлением 10-15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), 1% L-глутаминовой кислоты (ПанЭко, Россия) и 1% раствора пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия), содержащего 5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 ЕД/мл стрептомицина.

После культивирования опухолевые клетки лизировали до получения смеси белков для их дальнейшей идентификации методом иммуноблоттинга. Уровень экспрессии исследуемых белков осуществляли на приборе Fusion Solo 2M (Vilber Lourmat, Франция) с программным обеспечением FusionCaptAdvance Solo 4 16.08 (Vilber Lourmat, Франция). Интенсивность сигнала (в пикселях) анализировали в программе «Image J».

Способность химиопрепаратов влиять на жизнеспособность опухолевых клеточных линий оценивали методом колориметрического MTS-теста. С этой целью опухолевые клетки засеивали 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, КНР) исследуемыми клетками. При достижении 70% конfluence к клеткам добавляли химиопрепараты, в исследуемых концентрациях и не менее трех повторностях. После 48-часовой инкубации клеток с химиопрепаратами снимали результаты на планшетном фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 490 нм. Результаты получали в единицах оптической плотности на программном обеспечении SkanIt Software 3.0 (Thermo Scientific, США).

Статистическая обработка результатов производилась в программе Excel 2010 (Microsoft, США), статистическая достоверность которых обеспечивалась применением t-критерия Стьюдента.

Эффективность гомологичной рекомбинации под влиянием ИМ оценивали при помощи проточной цитофлуорометрии (FACSCanto II, BD, США) с использованием «индикаторной» клеточной линии DR-U2-OS, которая содержит единичную копию гена *GFP*, интегрированную в геном клеток остеосаркомы линии U2-OS. Примечательно, что *GFP* приобретает свою функциональную активность только при образовании в ДНК двунитевых разрывов (ДНР) путем синтеза флуоресцентного белка GFP. В свою очередь ДНР в ДНК индуцировались путем трансфекции в клетки pCBA-SceI-содержащей плазмиды (Addgene, США). Снижение количеств GFP-положительных клеток после образования в них SceI-индуцированных ДНР свидетельствовало о способности изучаемых препаратов влиять (ингибировать) процессы гомологичной рекомбинации ДНК.

Пролиферативную активность клеток оценивали в режиме реального времени с помощью системы многопараметрического анализа клеточных культур RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences, США). Эксперимент проводили в 8-луночных планшетах E-Plate L8 (ACEA Biosciences, США).

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе исследований был проведен анализ уровней экспрессии белков, участвующих в различных путях репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО, лейомиосарком и фибробластов человека. Были выявлены нарушения в системе репарации повреждений ДНК, наиболее значимыми, на наш взгляд, явились результаты стали результаты, свидетельствующие о снижении фонового уровня экспрессии белка BRCA1, сопровождающимся компенсаторным увеличением уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 (Рис. 1), что могло свидетельствовать о нарушениях процессов репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО. В то же время, повышение уровня экспрессии топоизомеразы II типа могло свидетельствовать о потенциальной чувствительности ГИСО к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа. Данная гипотеза нашла подтверждение в ходе проведения последующих исследований.

	BJ tert	GIST 882	GIST-T1	GIST 430	GIST 48	SK-LMS-1	SK-UT-1	
MGMT	0	10	9	5	5	0	3	$x < 0$
ERCC1	0	0	-1	0	-1	0	0	$0 < x < 5$
TFIIH	0	-1	0	1	-1	0	0	$6 < x < 10$
DNA polymerase β	0	11	30	14	2	1	7	$x > 11$
XRCC1	0	1	1	1	2	1	0	
MSH6	0	1	2	0	0	0	-1	
MSH2	0	0	0	0	0	1083	-1	
MSH1	0	0	1	-1	-1	1	1	
DNA-PK	0	0	0	0	0	0	0	
Ku70	0	0	0	0	0	1	0	
Ku80	0	0	0	0	0	0	0	
BRCA1	0	0	-1	-1	-1	1	1	
BRCA2	0	0	0	6	2	7	4	
Rad50	0	0	0	0	0	1	0	
Mre11	0	1	0	1	0	1	-1	
Rad17	0	0	0	0	0	0	1	
Rad51	0	1	5	1	2	3	0	
Topoisomerase II α	0	0	5	1	0	6	4	
Topoisomerase II β	0	8	22	5	1	32	11	
Актин	0	0	0	0	0	0	0	

Рисунок 1 – Уровень экспрессии белков, участвующих в различных сигнальных путях репарации повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), в нормальных фибробластах человека (BJ tert), ИМ-чувствительных (GIST-T1, GIST 822) и ИМ-резистентных (GIST 430, GIST 48) линиях ГИСО, а также линиях лейомиосарком (SK-LMS-1, SK-UT-1).

Методом MTS-теста было выявлено, что ингибиторы ДНК-топоизомеразы II типа (этопозид и доксорубицин) оказывают дозо-зависимый цитотоксический эффект как в отношении ИМ-чувствительной, так и ИМ-резистентной клеточных линий ГИСО (Рис. 2). Примечательно, что чувствительность ИМ-резистентной линии была ниже по сравнению с ИМ-чувствительной линией ГИСО.

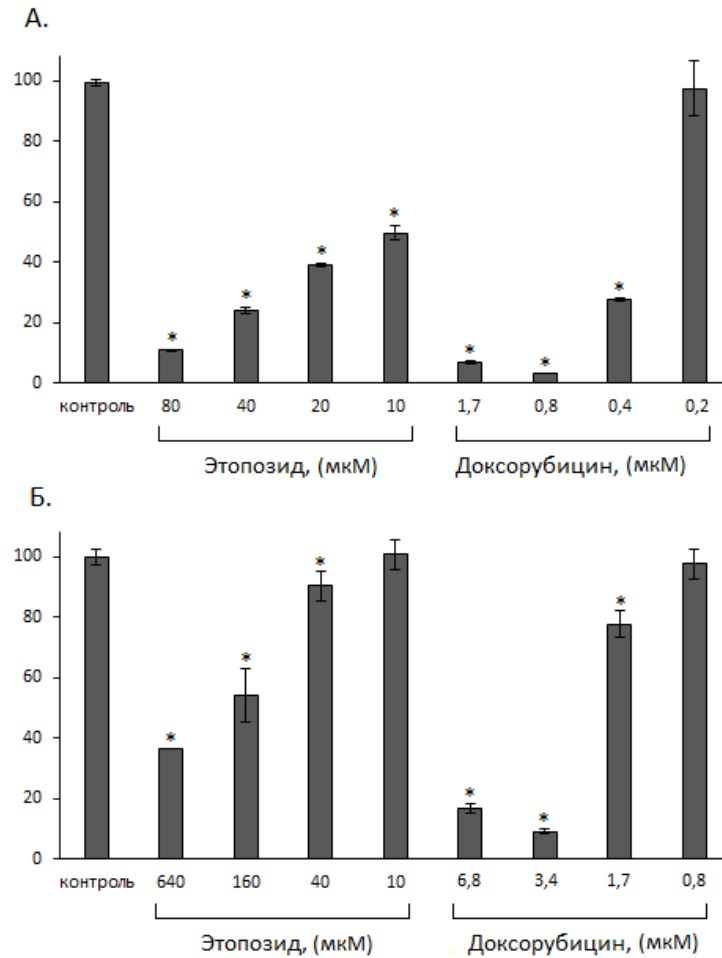


Рисунок 2 – Процент жизнеспособных клеток в линиях GIST-T1 (А) и GIST 430 (Б) после их инкубации с этопозидом и доксорубицином в течение 48 ч. Достоверность различий по сравнению с контролем (без химиопрепарата): (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Было выявлено, что основным механизмом гибели клеток ГИСО под влиянием этопозиды и доксорубицина являлся апоптоз, о чем свидетельствовало дозо-зависимое увеличение уровня экспрессии расщепленных форм ПАРП и каспазы-3 (Рис. 3). Полученные данные коррелировали с результатами МТТ теста, подтверждая более высокую чувствительность ИМ-чувствительных клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. Обнаруженный факт может свидетельствовать о развитии общих механизмов формирования устойчивости клеток ГИСО к действию таргетных и химиопрепаратов.

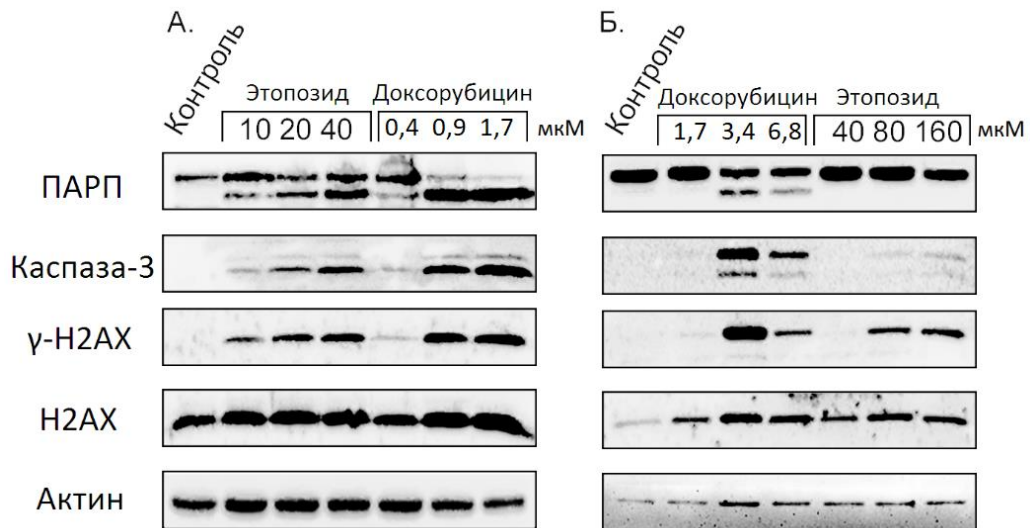


Рисунок 3 – Ингибиторы ДНК-топоизомеразы II типа (этопозид и доксорубицин) индуцируют апоптоз клеток ГИСО, чувствительных (А) и резистентных к ИМ (Б). Актин отражает одинаковую белковую нагрузку в исследуемых образцах.

Индукция апоптоза в клетках ГИСО под влиянием ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа, являлась, по всей видимости, следствием образования ДНР ДНК, о чем свидетельствовало дозо-зависимое увеличение уровня экспрессии γ -H2AX. Образование ДНР ДНК в результате воздействия вышеуказанных химиопрепаратов сопровождалась активацией механизмов репарации повреждений ДНК, о чем свидетельствовало повышение уровня экспрессии фосфорилированной (т. е. активированной) формы АТМ-киназы (pATM Ser1981), являющейся, как известно, одной из ключевых киназ, фосфорилирующих H2AX по серину в положении 139 и запускающих каскад реакций, направленных на остановку клеточного цикла и репарацию ДНР ДНК, в частности, путем гомологичной рекомбинации.

В пользу активации процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО, свидетельствовало повышение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 после их инкубации с доксорубицином. Несмотря на это, наблюдалась гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало время-зависимое увеличение уровня экспрессии расщепленной формы PARP (Рис. 4).

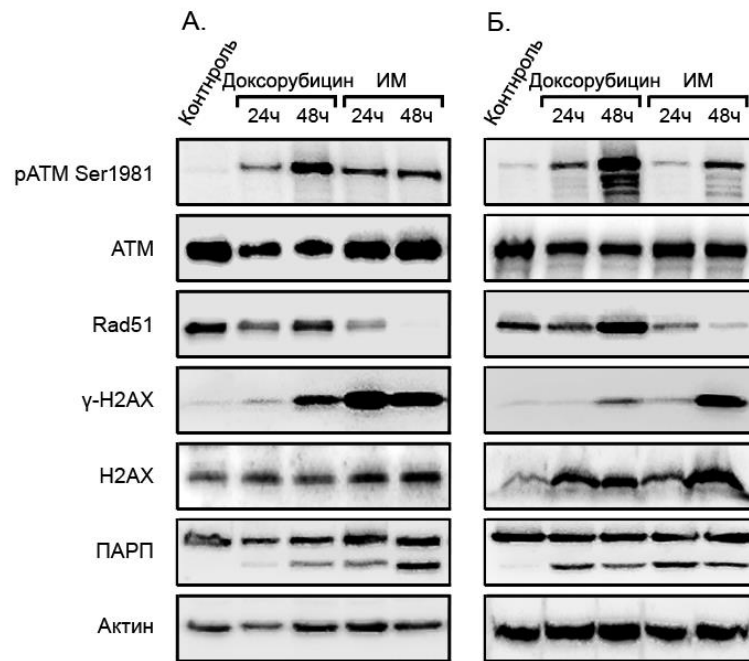


Рисунок 4 – Уровень экспрессии белков (pATM Ser1981, ATM, Rad51, γ-H2AX, H2AX, PARP) при 24 и 48-и часовой инкубации клеток ГИСО линий GIST-T1 (А), GIST 822 (Б) с доксорубицином (0,43 мкМ) и ИМ (1 мкМ). Актин отражает белковую нагрузку в образце.

ИМ также индуцировал повышение уровня экспрессии γ-H2AX и pATM в клетках ГИСО. Тем не менее, уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 снижался, что могло свидетельствовать об ослаблении процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО под действием ИМ.

Для изучения механизмов данного феномена, была исследована динамика изменений периода полу-жизни рекомбиназы Rad51 с помощью ингибитора белкового синтеза циклогексимида. Было обнаружено, что период полу-жизни данного белка в клетках ГИСО составляет примерно 12 ч (Рис. 5), а воздействие циклогексимида приводило почти к 2-х кратному снижению данного показателя.

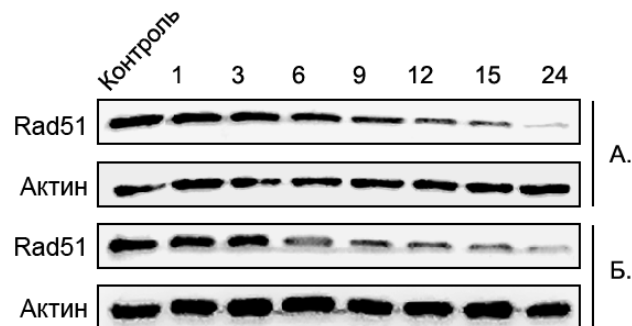


Рисунок 5 – Уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО линии GIST-T1 при 24-часовой экспозиции с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом (А) и его комбинацией с ИМ (Б). Актин отражает белковую нагрузку в образцах. Цифрами указано время экспозиции (в часах) клеток ГИСО с вышеуказанными препаратами.

Одним из возможных механизмов данного явления могло быть усиление интенсивности процессов протеасом-зависимой деградации данного белка под действием ИМ, что подтвердили результаты исследования с использованием ингибитора протеасом MG-132 (Рис. 6).

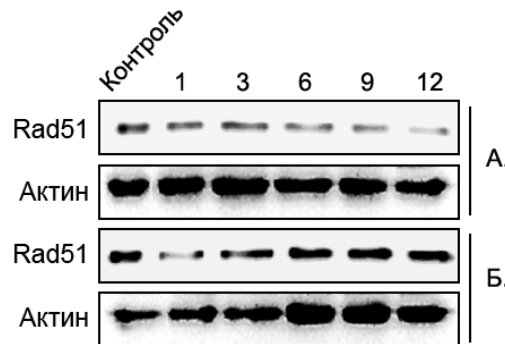


Рисунок 6 – Уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО линии GIST-T1 при 12-часовой экспозиции с ИМ (А), и его комбинацией с ингибитором протеасом MG-132 (Б). Актин отражает белковую нагрузку в образце. Цифрами указано время экспозиции в часах.

Была выдвинута гипотеза о способности ИМ ингибировать процессы гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО. Эксперименты с использованием репортерной клеточной линии остеосаркомы DR-U2-OS подтвердили данное предположение. Было показано, что трансфекция данной плазмиды приводила к увеличению количества GFP-положительных клеток, что свидетельствовало образованию ДНР ДНК, репарируемых путем гомологичной рекомбинации (Рис. 7А и Б). В то же время пре-инкубация клеток с ИМ приводила почти к 3-кратному снижению количества GFP-положительных клеток (Рис. 7Г). При этом сам препарат не оказывал существенного влияния на процент GFP-позитивных клеток в отсутствии ДНР ДНК (Рис. 7В). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности ИМ ингибировать процессы гомологичной рекомбинации ДНК.

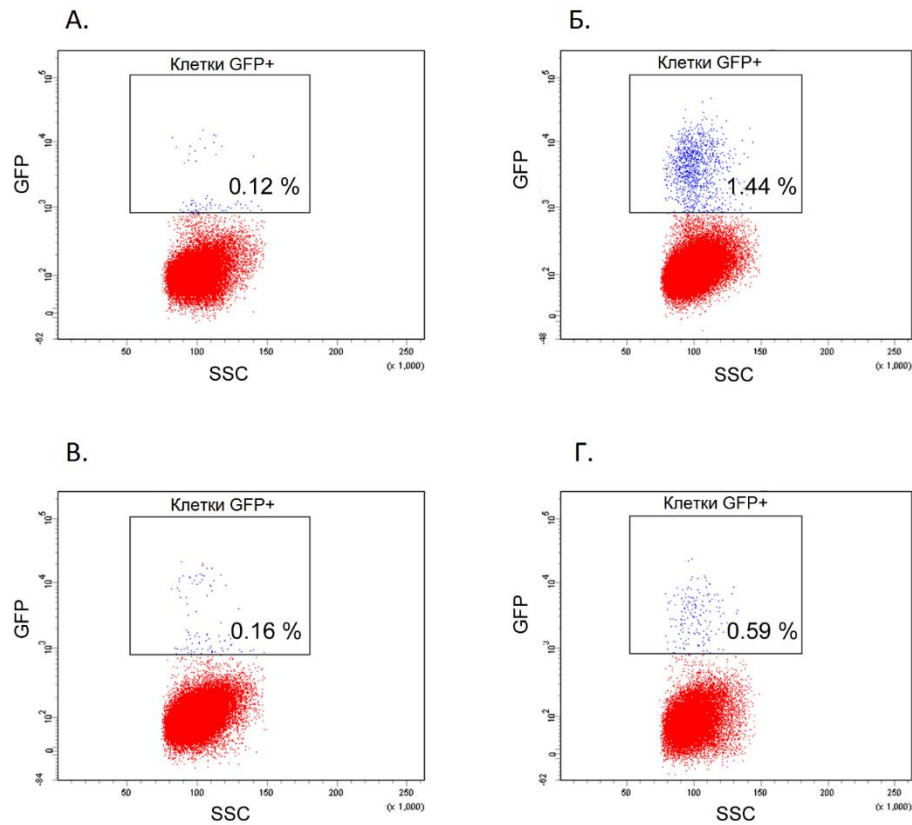


Рисунок 7 – Точечная (dot-plot) гистограмма клеточной линии DR-U2-OS. По горизонтали отображен параметр бокового светорассеяния (side scattering или SSC); по вертикали – интенсивность флюоресценции GFP, которая отражает долю GFP-положительных клеток в процентах (выделено квадратом). Клетки подвергались трансфекции контрольной (А и В) и SceI-содержащей (Б и Г) плазмидой и по истечению 12 ч инкубировали с ИМ (В и Г) в течение 48 ч.

Следующим этапом исследований явилось изучение способности ИМ модулировать чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. Результаты MTS-теста подтвердили способность данного таргетного препарата повышать чувствительность опухолевых клеток ГИСО к доксорубину и этопозиду (Рис. 8).

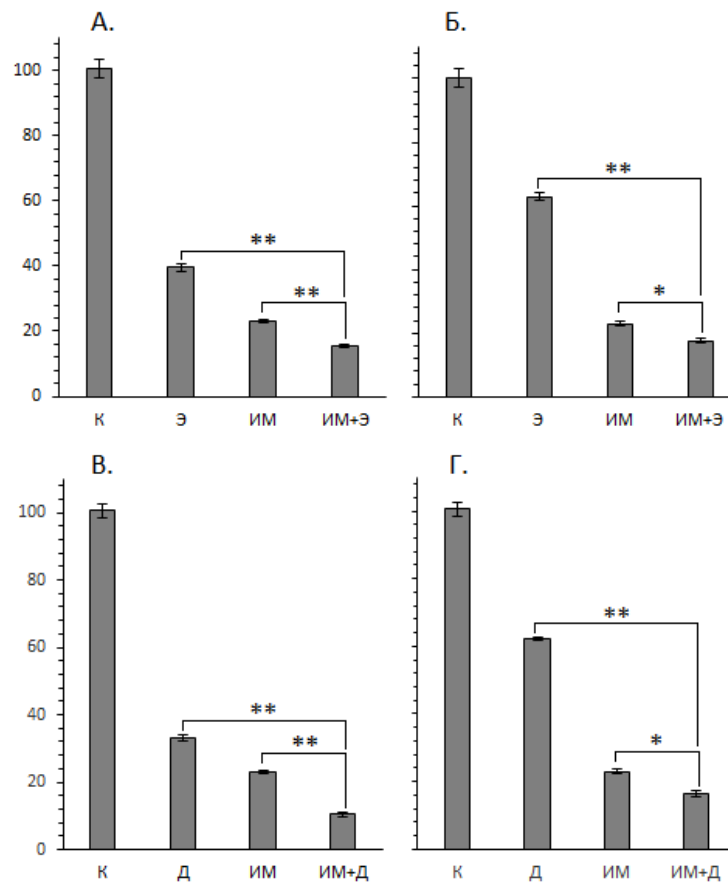


Рисунок 8 – Цитотоксическая активность этопозида (Э) в дозах 80 (А) и 40 (Б) мкМ и доксорубицина (Д) в дозах 0,43 (В) и 0,22 (Г) мкМ в отсутствие ИМ (0,5 мкМ) и на фоне его действия на клетки GIST-T1. Статистически значимая разница значений между исследуемыми параметрами: * - $p<0,01$, ** - $p<0,001$.

Результаты иммуноблоттинга также свидетельствовали о значительном повышении уровня экспрессии γ -H2AX в клетках ГИСО при комбинированном воздействии ИМ и ингибитора ДНК-топоизомеразы II типа в виду ослабления репарации ДНР в условиях генотоксического стресса, что коррелировало со значительным снижением рекомбиназы Rad51 в этих экспериментальных условиях (Рис. 9, А). Это приводило к усилению гибели клеток ГИСО по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало достоверное повышение уровня экспрессии расщепленной формы каспазы-3 на фоне комбинированного использования вышеуказанных препаратов по сравнению с клетками ГИСО, культивируемых с препаратами в отдельности (Рис. 9, Б).

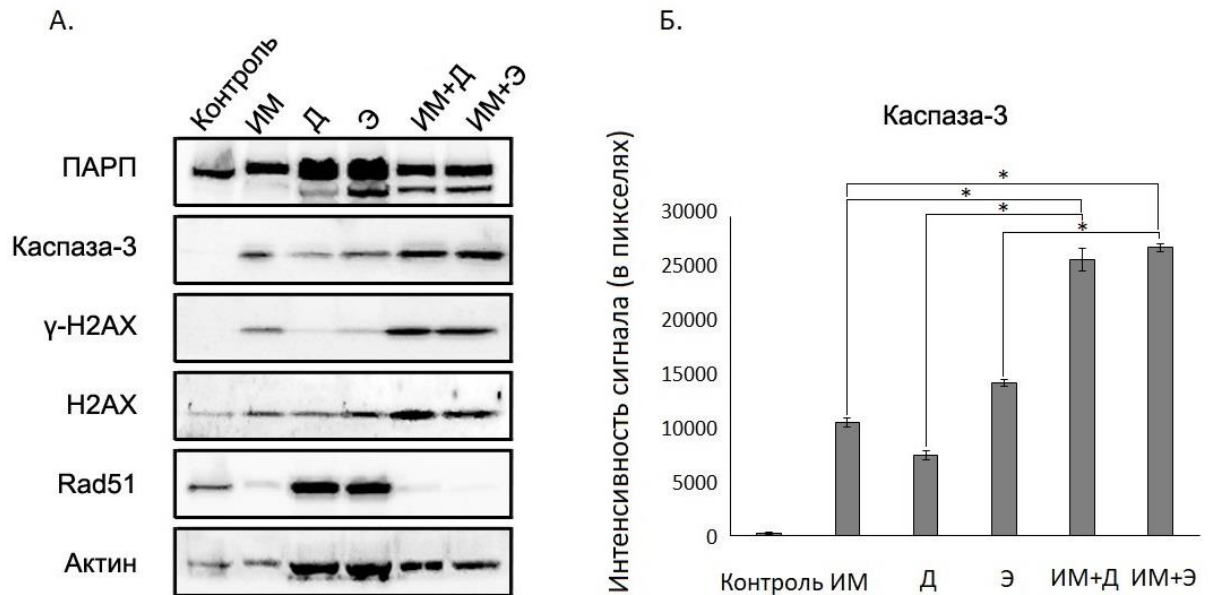


Рисунок 9 – А – уровень экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы ПАРП и каспаза-3), ДНР (γ -H2AX) и рекомбиназы Rad51 в клетках GIST-T1 под действием Д (доксорубицина – 0,22 мкМ), Э (этопозида – 20 мкМ), а также их комбинации с ИМ (1 мкМ). Актин отражает белковую нагрузку в образцах. Б – количественные показатели уровня экспрессии каспазы-3 в образцах, представленных на рис. 12, А. Статистически значимая разница значений между исследуемыми параметрами при $p < 0,01$ (*).

Способность ИМ снижать уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 была выявлена для всех использованных клеточных линий ГИСО, как с признаками чувствительности к ИМ, так и резистентности к препарату (Рис. 10).

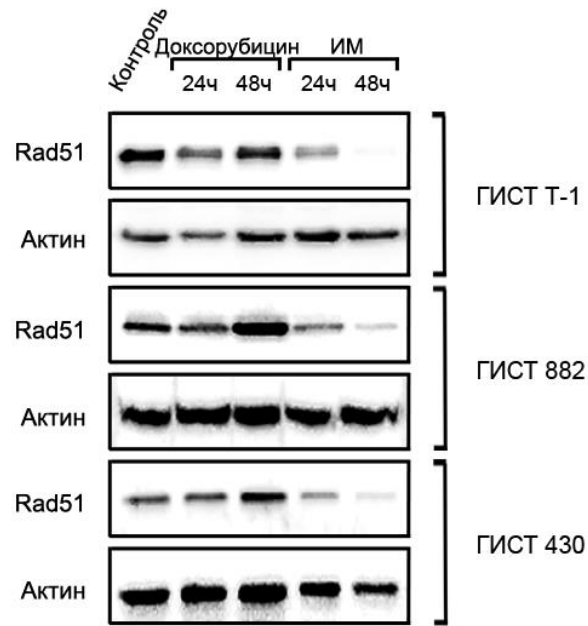


Рисунок 10 – Уровень экспрессия рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО (GIST-T1, GIST 882, GIST 430) под влиянием доксорубина (0,43 мкМ) и ИМ (1 мкМ) в течение 24 и 48 ч. Актин отражает белковую нагрузку в образце.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности ИМ повышать чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа в результате ИМ-индуцированного ослабления процессов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках, что может свидетельствовать о перспективности комбинированного использования ИМ и ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа для терапии больных с ГИСО.

Цитотоксический эффект химиопрепаратов был более выраженным в ИМ-чувствительных клеточных линий, что могло явиться следствием развития универсальных механизмов устойчивости клеток ГИСО к таргетным и химиопрепаратам. Согласно общепринятому мнению, химиорезистентность опухолей может являться результатом многих механизмов, среди которых наиболее часто встречающимися являются:

1. Активация генов-транспортеров, обуславливающих развитие множественной лекарственной устойчивости.
2. Усиление эффективности процессов репарации повреждений ДНК.

В связи с общеизвестной ролью белков-транспортеров MDR-1, MRP-1 и ABCG2 в развитии устойчивости опухолевых клеток к химиопрепаратам, был изучен уровень экспрессия данных ABC-транспортеров в различных клеточных линиях ГИСО. Была показана повышенная экспрессия белка MRP-1 в ИМ-резистентной линии ГИСО (GIST430) по сравнению с ИМ-чувствительными линиями (Рис. 11).

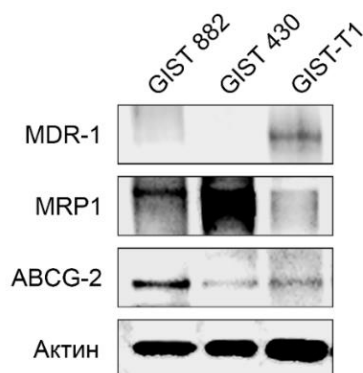


Рисунок 11 – Уровень экспрессия белков-транспортеров MDR-1, MRP-1, ABCG2 в клетках ГИСО (GIST 882, GIST 430, GIST-T1). Актин отражает белковую нагрузку в образце.

Данные результаты свидетельствуют о потенциальной роли данного белка-транспортера в развитии феномена множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) в ИМ-резистентной линии ГИСО. Тем не менее, следует отметить, что все исследованные клеточные линии ГИСО имеют различное происхождение и мутационный статус *KIT*. В связи с этим была предпринята попытка получения ИМ-резистентной сублинии ГИСО T-1. Спустя 18 мес. культивирования в присутствии постепенно возрастающих концентраций ИМ в клетках линии T-1 клеток появились устойчивые признаки резистентности к данному препарату, о чем, в частности, свидетельствовали результаты, полученные с помощью системы iCELLigence (Рис. 12). Было обнаружено, что ИМ не влиял на скорость пролиферации полученной сублинии (Рис. 12Б). Полученная сублиния опухолевых клеток ГИСО была обозначена как GIST-T1-IM-108R.

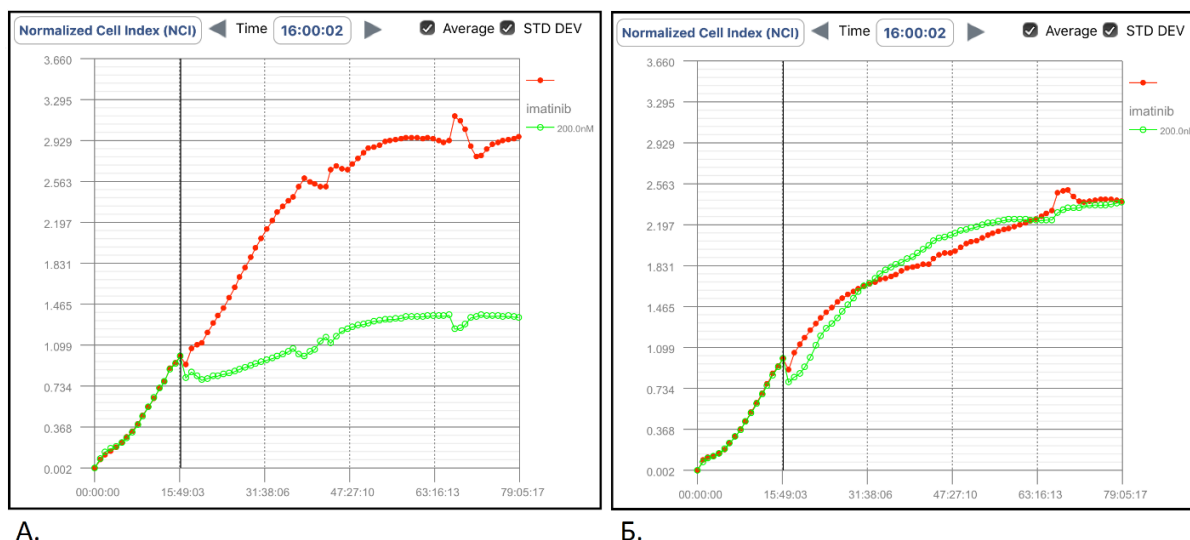


Рисунок 12 – Оценка пролиферативной активности клеток GIST-T1 (А) и GIST-T1-IM-108R (Б) в присутствии ИМ в концентрации 200 нМ. Красная линия – контроль, без ИМ, зеленая линия – под действием ИМ в концентрации 200 нМ. Кривые роста опухолевых клеток in vitro получены на приборе iCELLigence.

Результаты MTS-теста также показали более высокую жизнеспособность дочерней сублинии по сравнению с «материнскими» клетками в присутствии ИМ. Помимо резистентности к ИМ в дочерней сублинии была отмечена перекрестная резистентность к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. (Табл. 1).

Таблица 1 – Значения IC₅₀ для ИМ и ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа (этопозид и доксорубицин) в отношении ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клеток ГИСО (GIST-T1 и GIST-T1-IM-108R, соответственно)

	GIST-T1	GIST-T1-IM-108R	Кратность
ИМ (мкМ)	0,0012±0,0001	11,40±9,67	9500
Этопозид, мкМ)	42,69±1,38	146,41±7	3,43
Доксорубицин, (мкМ)	0,24±0,14	0,42±0,07	1,75

Результаты иммуноблоттинга подтвердили отсутствие признаков ИМ-индуцированного апоптоза в сублинии GIST-T1-IM-108R, что свидетельствовало в пользу развившейся резистентности к ИМ (Рис. 13).

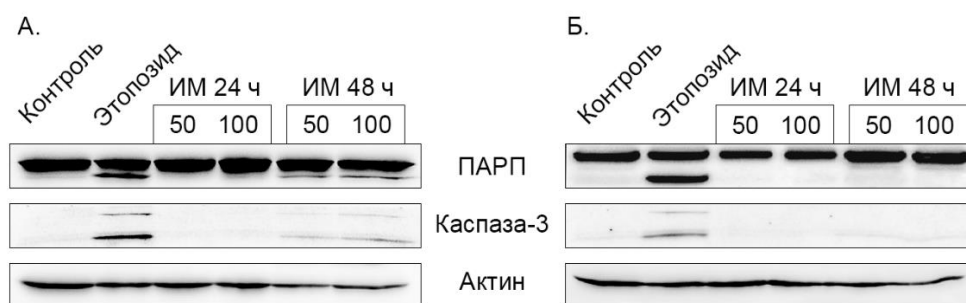


Рисунок 13 – Уровень экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы PARP и каспаза-3), в клетках GIST-T1 (А) и GIST-T1-IM-108R (Б) под действием этопозид (40 мкМ) и ИМ (50 и 100 мкМ). 24 и 48 ч продолжительность инкубации клеток под влиянием ИМ. Актин отражает белковую нагрузку в образце.

После получения ИМ-резистентной сублинии был проведен сравнительный анализ уровней экспрессии белков ABC-транспортёров в материнской и дочерней линиях клеток ГИСО. Методом иммуноблоттинга было показано, что полученная ИМ-резистентная сублиния гиперэкспрессирует белок-транспортёр ABCG2, по сравнению с ИМ-чувствительным клоном и паклитаксел-резистентной сублинией, также полученной в нашей лаборатории (Рис. 14). Паклитаксел-резистентная сублиния обладала признаками МЛУ к паклитакселу, а также доксорубину и этопозиду. В отличие от ИМ-резистентной сублинии, МЛУ паклитаксел-

резистентных клеток была обусловлена гиперэкспрессией другого белка-транспортера – MDR-1.

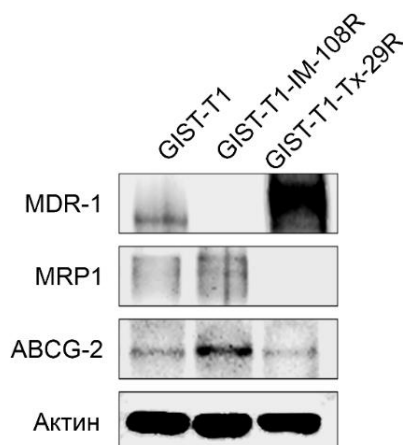


Рисунок 14 – Уровень экспрессия белков-транспортеров MDR-1, MRP-1, ABCG2 в клетках ГИСО (GIST-T1, GIST-T1-IM-108R, GIST-T1-Tx-29R). Актин отражает белковую нагрузку в образце.

Устойчивость ИМ-резистентной линии ГИСО к действию ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, по сравнению с ИМ-чувствительной линией ГИСО, могла явиться следствием активации репаративных процессов ДНК после генотоксического воздействия химиопрепаратов. С этой целью было проведено комплексное исследование уровней экспрессии 84-х генов, участвующих в различных путях репарации повреждений ДНК и регуляции клеточного цикла в обеих клеточных линиях с помощью ПЦР (Рис. 15). В результате были обнаружены следующие изменения:

- гиперэкспрессия *XRCC3*, который кодирует членов семейства RecA/Rad51-ассоциированных белков и участвует в репарации ДНР ДНК путем гомологичной рекомбинации, что в совокупности с высокой экспрессией *Rad51* и *H2AFX* может обуславливать пониженную чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа в виду эффективной репарации ДНР, вызванных этими химиопрепаратами,

- снижение экспрессии генов-онкосупрессоров *CDKN1A* и *TP73*, участвующих в аресте клеток с повреждениями ДНК в точках рестрикции клеточного цикла и запуска апоптоза, что может обуславливать повышенную пролиферацию и, соответственно, устойчивость данных клеток к ДНК-повреждающим агентам, например, ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

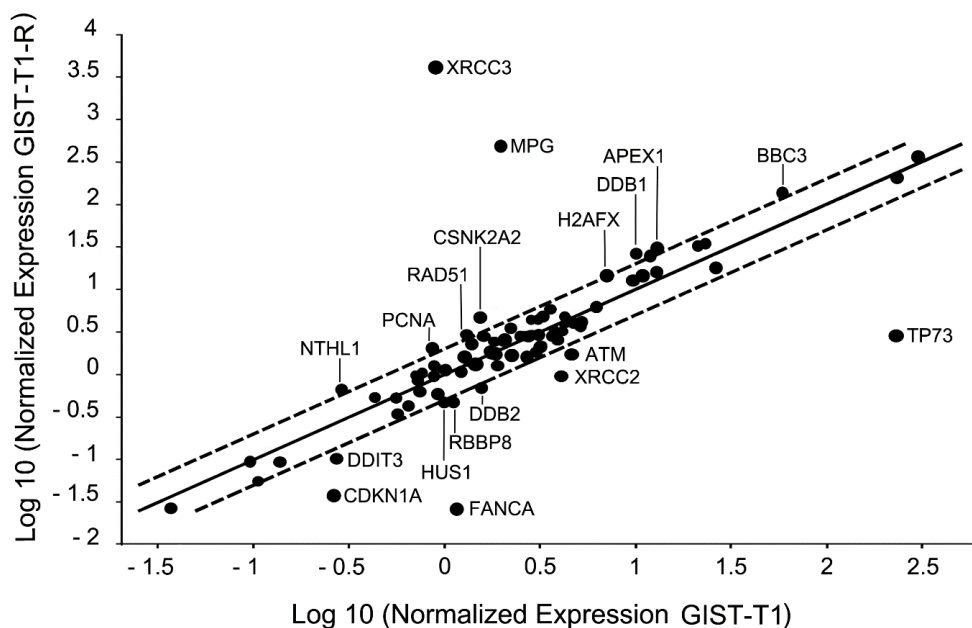


Рисунок 15 – Сравнение относительной экспрессии 84-х генов сигнальных путей репарации повреждений ДНК и регуляции клеточного цикла между ИМ-резистентными GIST-T1-IM-108R (по оси x) и ИМ-чувствительными GIST-T1 (по оси y) клетками. *MPG*, *XRCC3* и *CSNK2A2* гиперэкспрессированы, тогда как экспрессия *CDKN1A*, *FANCA*, *TP73* и *XRCC2* снижена не $\leq$ чем в 2 раза (вне пунктирной линии) в клетках GIST-T1-IM-108R относительно материнского клона GIST-T1. Для нормализации данных использовались три гена (β 2-микроглобулин, β -актин и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа).

Таким образом, развитие резистентности к ИМ в ГИСО может сопровождаться изменениями функциональной активности систем репарации повреждений ДНК и регуляции клеточного цикла, что делает эти клетки менее восприимчивыми к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

ВЫВОДЫ

1. В ГИСО обнаружены дефекты в системах репарации повреждений ДНК (снижение уровня экспрессии *BRCA1*, гиперэкспрессия *Rad51* и ДНК-топоизомеразы II типа).
2. ГИСО (как ИМ-чувствительные, так и резистентные) чувствительны к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа (доксорубицину и этопозиду), индуцирующих их гибель по механизму апоптоза. При этом ИМ-резистентные ГИСО менее чувствительны к вышеперечисленным химиопрепаратам.
3. ИМ вызывает сенситизацию ГИСО к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа (доксорубицину и этопозиду) в виду его способности ингибировать процессы гомологичной рекомбинации, снижать уровень экспрессии рекомбиназы *Rad51*. Основным

механизмом снижения уровня экспрессии Rad51 под действием ИМ является усиление процессов ее протеасом-зависимой деградации.

4. Развитие резистентности ГИСО к ИМ сопровождается снижением их чувствительности к действию ингибиторов топоизомеразы II типа, что может являться следствием активации белков-транспортеров (ABCG2 и MRP-7), обуславливающих выброс химиопрепаратов из ГИСО, высокой эффективностью процессов репарации повреждений ДНК (гиперэкспрессия *Rad51*, *H2AFX* и *XRCC3*), а также ослаблением регуляции клеточного цикла и апоптоза (снижение экспрессии *CDKN1A* и *TP73*).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. ГИСО являются чувствительными к действию химиопрепаратов – ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа.

2. Ингибитор тирозинкиназ ИМ повышает чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, что открывает новые перспективы комбинированного использования ИМ и ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа в терапии пациентов с неоперабельными, метастатическими рецидивирующими формами ГИСО, в том числе, резистентными к ИМ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бойчук С.В. Иматиниб ингибирует процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывает сенситизацию клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа / Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Мартынова Е.В. и др. // Цитология – 2016. - №3. – С. 178-18.

2. Бойчук С.В. Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных опухолей к ингибиторам топоизомераз II типа / Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Рамазанов Б.Р. и др. // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. - №1. – С. 76-81.

3. Бойчук С.В. Механизмы химиочувствительности клеточных линий гастроинтестинальных стромальных опухолей *in vitro* / Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р., Галембикова А.Р. и др. // Гены и клетки. – 2014. – Том 9, №4. – С. 116-120.

4. Бойчук С.В. Состояние системы репарации повреждений ДНК в гастроинтестинальных стромальных опухолях и перспективы терапии / Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р., Галембикова А.Р. и др. // Казанский медицинский журнал – 2014. – Т. 95, № 6. – С. 888-891.

5. Галембикова А.Р. Пивалоил-замещенные 2-пирролоны индуцируют гибель гастроинтестинальных стромальных опухолей, резистентных к иматинибу и химиопрепаратам /

Галембикова А.Р., Бойчук С.В., Зыкова С.С. и др. // Вопросы онкологии. – 2017, Т. 63, №1 – С. 135-140.

6. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д. Исследование химиочувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей линии Т-1 in vitro / 77-я научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2016», Санкт-Петербург 2016. С. 21-23.

7. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бойчук С.В. Оценка чувствительности гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) к химиопрепаратам различных групп // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6 (электронный журнал) URL: <http://www.science-education.ru/130-23728> (дата обращения: 06.12.2015).

8. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Хуснутдинов Р.Р. Изучение способности химиопрепаратов индуцировать гибель клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей линии Т-1 in vitro / 90-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых. Сборник тезисов. – Казань, 2016. – С. 280.

9. Галембиковой А.Р. Механизмы резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к иматинибу / Галембикова А.Р., Бойчук С.В. // Казанский медицинский журнал. – 2018. – № 6 (99). – С. 959-965.

10. Демидова Е.С., Галембикова А.Р. Оценка чувствительности иматиниб-резистентной клеточной линии гастроинтестинальной стромальной опухоли к цитостатикам различных групп // 91-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых. Сборник тезисов. – Казань, 2017. – С. 281.

11. Дунаев П.Д. Получение иматиниб-резистентного субклона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли и исследование его чувствительности к химиопрепаратам / Дунаев П.Д., Бойчук С.В., Галембикова А.Р. и др. // Казанский медицинский журнал – 2017. – №6 (98). – С. 993-997.

12. Усолова Н.Ю., Галембикова А.Р. Принципы диагностики и лечения гастроинтестинальных стромальных опухолей / 90-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых. Сборник тезисов. – Казань, 2016. – С. 282.

13. Хуснутдинов Р.Р., Галембикова А.Р., Бойчук С.В. Получение клона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли с признаками множественной лекарственной устойчивости и оценка его свойств // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. №4. – С. 36-41.

14. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance [Электронный ресурс] / Boichuk S, Galembikova A [et al.] // Molecules. – 2017. – Vol. 22, № 12. – 2152. –Режим доступа: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/12/2152>.