

between accidental hypothermia and acute pancreatitis. *J. Clin. Pathol.* 1982; 35: 1244–1248. DOI: 10.1136/jcp.35.11.1244.

11. Cavallaro G., Filippi L., Raffaelli G. et al. Heart rate and arterial pressure changes during whole-body deep hypothermia. *ISRN Pediatrics*. 2013; 2013: 140213. DOI: 10.1155/2013/140213.

12. Cooke R. The role of the myosin ATP-ase activity

in adaptive thermogenesis by skeletal muscle. *Biophys. Rev.* 2011; (3): 33–45. DOI: 10.1007/s12551-011-0044-9.

13. Kiyatkin E.A. Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts. *Front Biosci.* 2010; 15: 73–92. DOI: 10.2741/3608.

14. Liu S. Strategies for therapeutic hypometabothemia. *J. Exp. Stroke Transl. Med.* 2012; 5 (1): 31–42. DOI: 10.6030/1939-067X-5.1.31.

УДК 615.277.3: 615.036.8: 57.085.23

© 2017 Дунаев П.Д. и соавторы

ПОЛУЧЕНИЕ ИМАТИНИБ-РЕЗИСТЕНТНОГО СУБКЛОНА КЛЕТОК ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОЙ СТРОМАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ

Павел Дмитриевич Дунаев, Сергей Васильевич Бойчук*, Айгуль Рафиковна Галембикова, Рамиль Рамисович Хуснутдинов

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 04.07.2017; принята в печать 25.07.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-993

Цель. Получить клон иматиниб-резистентных клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) и оценить его чувствительность к химиопрепаратам различных групп.

Методы. Для получения иматиниб-резистентного клона опухолевые клетки линии ГИСО T1 культивировали в присутствии постепенно увеличивающихся доз иматиниба в течение 18 мес. Каждые 3 мес проводили сравнительную оценку чувствительности клеток ГИСО T1 к иматинибу с помощью колориметрического MTS-теста. Уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза, оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител. После получения клона клеток ГИСО T1 с признаками резистентности к таргетному препарату иматинибу оценивали его чувствительность к химиопрепаратам различных групп (доксорубину, этопозиду, винбластину, паклитакселу, цисплатину). Чувствительность иматиниб-резистентных клеток ГИСО T1 к химиопрепаратам, а также уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза, оценивали с помощью колориметрического MTS-теста и методом иммуноблоттинга.

Результаты. Через 18 мес культивирования клеток ГИСО T1 в присутствии постепенно возрастающих концентраций иматиниба в клетках были обнаружены признаки резистентности к данному препарату. Полученный субклон опухолевых клеток ГИСО T1-IM-108R был чувствителен ко всем использованным химиопрепаратам. Наибольший цитостатический эффект в отношении иматиниб-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R был обнаружен у доксорубина, винбластина и этопозиды.

Вывод. Иматиниб-резистентные клетки ГИСО T1 обладают чувствительностью к химиопрепаратам различных групп; полученный субклон клеток ГИСО T1-IM-108R может быть использован при проведении скрининга наиболее эффективных в отношении ГИСО химиопрепаратов и вновь синтезированных соединений.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, резистентность, клонирование опухолевых клеток, химиопрепараты, иматиниб.

ESTABLISHMENT OF IMATINIB-RESISTANT GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR CELL SUBLINE AND INVESTIGATION OF ITS SENSITIVITY TO THE CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

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

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To establish the subline of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor (GISTs) cells and to evaluate its sensitivity to various types of chemotherapeutic agents.

Methods. To establish imatinib-resistant subline, tumor cells of GIST T-1 line were cultured with gradually increasing doses of imatinib for 18 months. Sensitivity of GIST T-1 cells to imatinib was comparably evaluated every 3 months by using MTS-based colorimetric assay. Level of expression of proteins serving as apoptotic markers, was examined by Western blotting with appropriate monoclonal antibodies. After establishment of GIST T-1 cell line with the signs of resistance to target medication imatinib, its sensitivity to various groups of chemotherapy (doxorubicin, etoposide, vinblastine, paclitaxel and cisplatin) was evaluated. Sensitivity of imatinib-resistant GIST T-1 cells to chemotherapy as well as the level of expression of proteins serving as apoptotic markers, was evaluated by using MTS-based colorimetric assay and Western blotting.

Results. After 18 month of culturing GIST T1 cells in the presence of gradually increasing doses of imatinib, the signs of resistance to this drug were observed. The obtained subline of GIST T1 IM-108R cells was sensitive to all used chemotherapeutic agents. Doxorubicin, vinblastine and etoposide were found to be the most potent cytostatic agents against imatinib-resistant GIST T1 IM-108R cells.

Conclusion. Imatinib-resistant GIST T1 subline cells are sensitive to various types of chemotherapeutic agents; the established GIST T1 IM-108R cell subline might be further used for screening for the most effective chemotherapeutic agents and novel synthesized compounds.

Keywords: gastrointestinal stromal tumors, resistance, tumor cell cloning, chemotherapeutic agents, imatinib.

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) — одни из самых распространённых злокачественных новообразований мезенхимального происхождения желудочно-кишечного тракта [1]. Опухоль развивается из интерстициальных клеток Кахаля (энтеральных пейсмейкерных клеток), функция которых заключается в генерации повторяющихся медленных волн деполяризации, распространяющихся на оба слоя мышечной оболочки пищеварительной трубки [1, 2]. ГИСО наиболее часто встречаются в желудке (50–60%) и тонкой кишке (30–35%), реже в ободочной и прямой кишке (5%), а также пищеводе (1%). Иногда встречаются внекишечные формы ГИСО, которые расположены в забрюшинном пространстве, сальнике, брыжейке, матке [2].

Характерный признак клеток ГИСО — активирующая мутация гена КИТ, приводящая к гиперэкспрессии и гиперактивации тирозинкиназного рецептора c-kit (CD117). В результате повышается митотическая активность клеток Кахаля, что в итоге приводит к их злокачественной трансформации. Мутацию гена КИТ отмечают в 85–95% случаев всех ГИСО [3].

По этой причине в качестве таргетной терапии ГИСО используют препарат иматиниб (ИМ) (гливек), являющийся селективным ингибитором тирозинкиназного рецептора c-kit. Под влиянием ИМ нарушается пролиферация клеток ГИСО, возникает их гибель по механизму апоптоза [1].

Тем не менее, более чем у половины пациентов с ГИСО через 2 года после начала проведения таргетной терапии ИМ развивается резистентность к данному препарату. Этот факт обусловлен рядом причин: возникновением вторичных мутаций c-kit в опухолевых клетках (обычно в экзонах 13 и 17), утратой экспрессии c-kit, активацией других тирозинкиназ (например, Ax1, c-Met) [3, 4]. В случае развития резистентности к ИМ вследствие вторичных мутаций c-KIT пациенту назначают таргетные препараты второй линии (сунитиниб) или третьей линии (регорафениб). Тем не менее, их применение приводит к незначительному эффекту, сопровождается рядом тяжёлых побочных эффектов и развитием резистентности [2].

Следовательно, поиск эффективных методов нехирургического лечения больных с метастатическими, рецидивирующими и неоперабельными формами ГИСО представляется весьма актуальным.

На протяжении длительного времени

существовала точка зрения о низкой эффективности химиотерапии у больных с ГИСО [5]. Однако сейчас данное положение подвергают пересмотру. Результаты проведённых нами исследований доказывают, что ингибиторы топоизомеразы II типа (доксорубин, этопозид), а также препараты, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (винбластин, паклитаксел), способны оказывать цитостатический эффект в отношении ИМ-чувствительных клеток ГИСО [6, 7].

Ряд исследований последних лет был направлен на изучение эффективности комбинированного использования ИМ и химиопрепаратов (например, доксорубина) для лечения пациентов с ГИСО [8]. В этом контексте наиболее актуально, на наш взгляд, изучение химиочувствительности ГИСО на фоне уже развившейся резистентности к ИМ.

В связи с вышеизложенным было проведено изучение чувствительности полученного в нашей лаборатории ИМ-резистентного клона опухолевой линии ГИСО Т1 к химиопрепаратам различных групп.

Объектом исследования была клеточная линия ГИСО Т-1, чувствительная к действию таргетного препарата ИМ [9]. Для получения ИМ-резистентного клона опухолевые клетки культивировали в присутствии постепенно увеличивающихся доз препарата (Sigma-Aldrich, США) в течение 18 мес. Начальная доза ИМ в культуре клеток составляла 0,4 нмоль, конечная — 1000 нмоль. Клетки культивировали в стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂) в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, пенициллина и стрептомицина (все реагенты — «ПанЭко», Россия), а также 15% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США).

Каждые 3 мес проводили сравнительную оценку чувствительности клеток ГИСО Т1 к ИМ. С этой целью опухолевые клетки засеивали в лунки плоскодонного 96-луночного культурального планшета (Corning, США). При достижении 70% конфлюентности к клеткам добавляли ИМ в различных концентрациях (от 0,4 до 1000 нмоль) и культивировали в течение 48 ч (37 °С, 5% CO₂). Чувствительность опухолевых клеток к ИМ оценивали колориметрическим методом (MTS-тест) с помощью реагента CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega, США) на планшетном анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США)

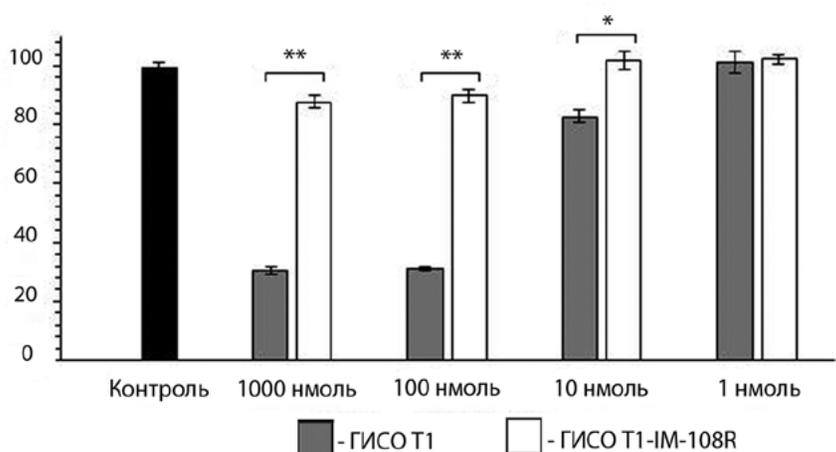


Рис. 1. Цитотоксическая активность иматиниба (1–1000 нмоль) в отношении клеток иматиниб-чувствительной линии ГИСО Т1 («материнский клон») и клеток иматиниб-резистентной линии ГИСО Т1-ИМ-108R («дочерний субклон»), инкубация 48 ч; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

при длине волны 492 нм. Уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза, оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител.

После получения субклона клеток ГИСО Т1 с признаками резистентности к таргетному препарату ИМ оценивали его чувствительность к химиопрепаратам различных групп (все химиопрепараты — Sigma-Aldrich, США):

а) ингибиторы топоизомеразы II типа (доксорубин 30–8000 нг/мл; этопозид 2,5–640 мкмоль);

б) препараты, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (винбластин 0,01–10 000 нмоль; паклитаксел 1–10 000 нмоль);

в) препараты, нарушающие биосинтез белка за счёт образования прочных ковалентных связей с молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты (цисплатин 0,03–80 мкмоль).

Чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1 к химиопрепаратам, а также уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза, оценивали вышеописанными методами.

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2007 и BIOSTATISTICA (S.A. Glantz, McGraw Hill, США). Для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли *t*-критерий Стьюдента. При $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение.

Через 18 мес культивирования клеток ГИСО Т1 в присутствии постепенно возрастающих концентраций ИМ (осуществлено ~108 пассажей) в клетках были обнаружены признаки резистентности к данному препарату. К примеру, в присутствии различных концентраций ИМ (10, 100 и 1000 нмоль) жизнеспособность «дочерних» (то есть ИМ-резистентных) клеток ГИСО Т1-ИМ-108R существенно превышала жизнеспособность «материнских» (ИМ-чувствительных) клеток ГИСО Т1 (рис. 1). Полученный субклон опухолевых клеток ГИСО Т1 был обозначен как Т1-ИМ-108R.

На основании результатов колориметрического MTS-теста были определены эффективные концентрации ИМ, вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC_{50}) клеток ИМ-чувствительной линии ГИСО Т1 и ИМ-резистентной линии ГИСО Т1-ИМ-108R. Значение IC_{50} ИМ для клеток «дочернего» субклона ГИСО Т1-ИМ-108R составило $11\,401,7 \pm 966,5$ нмоль, что более чем в 9000 раз превышает аналогичный показатель для клеток «материнского» клона ГИСО Т1 (IC_{50} ИМ $1,19 \pm 0,12$ нмоль).

Учитывая известный факт того, что под влиянием ИМ происходит гибель опухолевых клеток ГИСО преимущественно по механизму апоптоза [1], было проведено сравнительное исследование способности препарата индуцировать апоптоз клеток «материнского» клона ГИСО Т1 и его ИМ-резистентного субклона ГИСО Т1-ИМ-108R. Было обнаружено отсутствие экспрессии расщеплённых форм каспазы-3 и

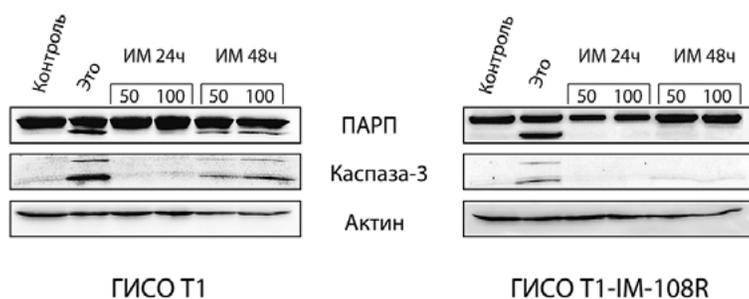


Рис. 2. Изучение способности имитиниба индуцировать гибель по механизму апоптоза клеток «материнского» имитиниб-чувствительного клона ГИСО Т1 и клеток «дочернего» имитиниб-резистентного субклона ГИСО Т1-ИМ-108R. Маркёры апоптоза — расщеплённые формы каспазы-3 и поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП); актин отражает уровень белка в образцах. Иматиниб (ИМ) — 50 и 100 нмоль (инкубация 24 и 48 ч). Этопозид (Это) — 40 мкмоль (инкубация 48 ч), положительный контроль апоптоза

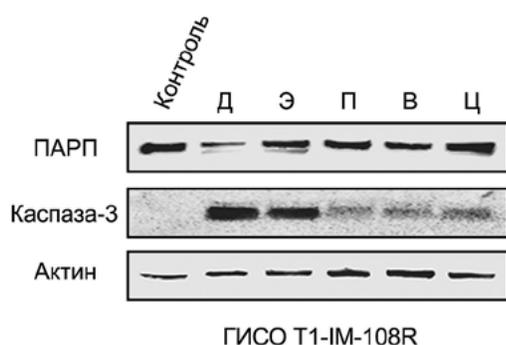


Рис. 3. Изучение способности химиопрепаратов индуцировать гибель по механизму апоптоза клеток имитиниб-резистентного субклона ГИСО Т1-ИМ-108R. Инкубация 48 ч. Маркёры апоптоза — расщеплённые формы каспазы-3 и поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП); актин отражает уровень белка в образцах. Доксорубин (Д) — 500 нг/мл, этопозид (Э) — 80 мкмоль, паклитаксел (П) — 1 мкмоль, винбластин (В) — 1 нмоль, цисплатин (Ц) — 5 мкмоль

поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП) в резистентных клетках после их инкубации с ИМ на всех сроках культивирования (рис. 2). Ожидается, что «материнские» клетки ГИСО Т1 погибали по механизму апоптоза через 48 ч культивирования с препаратом.

Таким образом, ИМ индуцировал апоптоз исключительно клеток «материнского» ИМ-чувствительного клона ГИСО Т1. Программированная гибель клеток «дочернего» субклона ГИСО Т1-ИМ-108R под влиянием данного препарата отсутствовала.

Примечательно, что включённый в группу сравнения ингибитор топоизомеразы II типа этопозид был эффективен в отношении обоих типов клеток, что стало основанием для более углублённого изучения активности химиопрепаратов различных групп в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО Т1-ИМ-108R. Было обнаружено, что через 48 ч после инкубации с химиопрепаратами у клеток ГИСО Т1-ИМ-108R повышалась экспрессия расщеплённых форм каспазы-3 и ПАРП, что свидетельствует об индукции их апоптоза (рис. 3). Максимальный эффект был выражен у доксорубина и этопозиды.

Далее на основании колориметрического MTS-теста были определены эффективные концентрации химиопрепаратов, вызывающие 50% ингибирование выживаемости (IC_{50}) опухолевых клеток. Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что ИМ-резистентные клетки ГИСО Т1-ИМ-108R

Таблица 1

Показатели IC_{50} химиопрепаратов для клеток ГИСО Т1 и ГИСО Т1-ИМ-108R

Химиопрепарат	IC_{50} химиопрепарата (ГИСО Т1)	IC_{50} химиопрепарата (ГИСО Т1-ИМ-108R)	Кратность
Доксорубин, нг/мл	134,9±13,4	287,5±38,5	2,13
Этопозид, мкмоль	20,7±1,8	146,41±7,0	7,07
Паклитаксел, нмоль	6,7±0,9	189,3±17,3	28
Винбластин, нмоль	0,08±0,015	0,15±0,004	1,88
Цисплатин, мкмоль	0,3±0,01	3,97±0,58	13,2

Примечание: полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение; кратность — отношение 50% ингибирования выживаемости (IC_{50}) химиопрепарата (ГИСО Т1-ИМ-108R) к IC_{50} химиопрепарата (ГИСО Т1).

чувствительны ко всем использованным химиопрепаратам.

Значения IC_{50} винбластина и доксорубина для ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R сопоставимы с их значениями IC_{50} для ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1. Значение IC_{50} этопозиды для ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R в 7 раз превышало аналогичный показатель для ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1. Показатели IC_{50} паклитаксела и цисплатина для ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R более чем в 10 раз превышали аналогичные показатели для ИМ-чувствительных клеток ГИСО T1. Следовательно, наибольший цитостатический эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R оказывали доксорубин, винбластин и, в меньшей степени, этопозид.

Таким образом, результатом проведённых исследований стало получение субклона опухолевых клеток линии ГИСО T1, обладающего устойчивостью к таргетному препарату ИМ. Полученный субклон клеток, обозначенный как T1-IM-108R, обладает чувствительностью к химиопрепаратам различных групп. Наибольший цитостатический эффект в отношении ИМ-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R был обнаружен у доксорубина, винбластина и этопозиды.

ВЫВОДЫ

1. Иматиниб-резистентные клетки ГИСО T1 обладают чувствительностью к химиопрепаратам различных групп: (а) ингибиторам топоизомеразы II типа (доксорубину, этопозиду); (б) препаратам, влияющим на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (винбластину, паклитакселу); (в) препаратам, нарушающим биосинтез белка за счёт образования прочных ковалентных связей с молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты (цисплатину). Наибольший цитостатический эффект в отношении иматиниб-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R оказывали доксорубин, винбластин и, в меньшей степени, этопозид.

2. Преимущественный механизм гибели иматиниб-резистентных клеток ГИСО T1 под действием химиопрепаратов — апоптоз.

3. Полученный клон клеток ГИСО T1-IM-108R может быть использован при про-

ведении скрининга наиболее эффективных в отношении гастроинтестинальных стромальных опухолей химиопрепаратов и вновь синтезированных соединений.

*Работа выполнена при поддержке
Российского научного фонда
(грант №14-15-00342).*

*Авторы заявляют об отсутствии
конфликта интересов по представленной
статье.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Jakhetya A., Garg P.K., Prakash G. et al. Targeted therapy of gastrointestinal stromal tumours. *World J. Gastrointest. Surg.* 2016; 8 (5): 345–352. DOI: 10.4240/wjgs.v8.i5.345.
2. Boichuk S.V., Rausch J.L., 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. DOI: 10.2147/GICTT.S20679.
3. Gramza A.W., Christopher L.C., Michael C.H. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (24): 7510–7518. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0190.
4. De Silva C.M., Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. *Pathol. Oncol. Res.* 2003; 9 (1): 13–19. PMID: 12704441.
5. 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): 1127–1134. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17098-0.
6. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бойчук С.В. Оценка чувствительности гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) к химиопрепаратам различных групп. *Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования».* 2015; 6. <http://www.science-education.ru/130-23728> (дата обращения: 04.07.2017) [Galembikova A.R., Dunayev P.D., Boychuk S.V. Evaluation of sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to the various chemotherapeutic agents. *Elektronnyy nauchnyy zhurnal «Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya».* 2015; 6. <http://www.science-education.ru/130-23728> (access date: 04.07.2017). (In Russ).]
7. Хуснутдинов Р.Р., Галембикова А.Р., Бойчук С.В. Получение клона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли с признаками множественной лекарственной устойчивости и оценка его свойств. *Соврем. технол. в мед.* 2016; 8 (4): 36–41. [Khusnutdinov R.R., Galembikova A.R., Boychuk S.V. Establishment of the clone of gastrointestinal stromal tumor cells with the signs of multiple drug resistance and assessment of its properties. *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2016; 8 (4): 36–41. (In Russ).] DOI: 10.17691/stm2016.8.4.05.
8. Pessetto Z.Y., Ma Y., Hirst J.J. et al. Drug repurposing identifies a synergistic combination therapy with imatinib mesylate for gastrointestinal stromal tumor. *Mol. Cancer Ther.* 2014; 13 (10): 2276–2287. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0043.
9. Taguchi T., Sonobe H., Toyonaga S. et al. Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor. *Lab. Invest.* 2002; 82 (5): 663–665.