

# ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНА КЛЕТОК ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОЙ СТРОМАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ С ПРИЗНАКАМИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И ОЦЕНКА ЕГО СВОЙСТВ

DOI: 10.17691/stm2016.8.4.05

УДК 576.3:616.33/.34–006.3/.6:577.32

Поступила 2.08.2015 г.



Р.Р. Хуснутдинов, аспирант кафедры общей патологии;  
А.Р. Галембикова, аспирант кафедры общей патологии;  
С.В. Бойчук, д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей патологии

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Республика Татарстан, 420012,  
ул. Бултерова, 49

**Цель исследования** — получение клона опухолевых клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО), обладающего устойчивостью к химиопрепаратам различного механизма действия, и оценка его чувствительности к некоторым химиопрепаратам разных групп.

**Материалы и методы.** Для получения клона клеток ГИСО, резистентного к химиопрепаратам, использована клеточная линия ГИСО Т-1. Оценка жизнеспособности опухолевых клеток проводили в режиме реального времени на клеточном анализаторе iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США). С помощью колориметрического МТТ-теста оценивали чувствительность клона клеток ГИСО Т-1-29R к действию ингибиторов топоизомераз II типа (доксорубицина и этопозид); препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (винбластин и паклитаксел); гидроксимочевины; цисплатина; таргетного препарата иматиниба. Экспрессию маркеров апоптоза, повреждений ДНК и химиорезистентности определяли методом иммуноблоттинга.

**Результаты.** Клон опухолевых клеток линии ГИСО Т-1 с признаками химиорезистентности (Т-1-29R) был получен в результате 8-месячного культивирования опухолевых клеток ГИСО в присутствии постепенно увеличивающихся доз паклитаксела. Обнаружено, что клетки Т-1-29R обладают резистентностью к паклитакселу, а также перекрестной резистентностью к доксорубицину и этопозиду. Чувствительность клеток клона к остальным химиопрепаратам, в том числе к иматинибу, не изменилась. В опухолевых клетках Т-1-29R выявлено повышение уровня экспрессии некоторых белков множественной лекарственной устойчивости, например MDR-1.

**Заключение.** Клон клеток линии ГИСО Т-1-29R обладает фенотипическими признаками множественной лекарственной устойчивости, что делает перспективным его использование для оценки химиочувствительности клеток ГИСО, а также при проведении скрининга новых соединений на предмет их цитотоксической и противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** гастроинтестинальные стромальные опухоли; ГИСО; клонирование опухолевых клеток; паклитаксел; доксорубицин; этопозид; цитотоксичность; резистентность.

**Как цитировать:** Khusnutdinov R.R., Galembikova A.R., Boichuk 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, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.05>

## English

### Establishment of the Clone of Gastrointestinal Stromal Tumor Cells with the Signs of Multiple Drug Resistance and Assessment of Its Properties

R.R. Khusnutdinov, PhD Student, General Pathology Department;  
A.R. Galembikova, PhD Student, General Pathology Department;  
S.V. Boichuk, MD, DSc, Professor, Head of General Pathology Department

Kazan State Medical University, 49 Butlerova St., Republic of Tatarstan, Kazan, 420012, Russian Federation

Для контактов: Бойчук Сергей Васильевич, e-mail: boichuksergei@mail.ru

**The aim of the investigation** was to obtain a tumor cell clone of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) possessing resistance to chemotherapeutic agents of different mode of action, and to assess its sensitivity to various groups of chemotherapeutic agents.

**Materials and Methods.** GIST cell line T-1 was used to obtain a clone of chemoresistant GIST cells. The viability assessment of tumor cells was carried out by using i-CELLigence RTCA cell analyzer (ACEA Biosciences, USA). The sensitivity of GIST T-1-29R cell clone to type II topoisomerase inhibitors (doxorubicin and etoposide); chemotherapeutic agents affecting the dynamic state of the spindle microtubules (vinblastine and paclitaxel); hydroxyurea; cisplatin; targeted drug imatinib were evaluated by using the MTT-based assay. Expression of apoptosis, the markers of DNA damage and chemoresistance was examined by immunoblotting.

**Results.** A clone of GIST T-1 tumor cell line with the signs of chemoresistance (T-1-29R) was obtained after 8-month of cultivation of GIST tumor cells in the presence of the gradually increasing doses of paclitaxel. T-1-29R cells were found to possess resistance to paclitaxel, and cross-resistance to doxorubicin and etoposide, as well. Sensitivity of T-1-29R cells to other chemotherapeutic agents, including imatinib, did not change. Some multiple drug resistance proteins, e.g. MDR-1, were revealed to have an increased expression level in T-1-29R tumor cells when compared to parent T-1 cells.

**Conclusion.** A clone of GIST T-1-29R cell line possesses phenotypical features of multiple drug resistance, that makes its perspective use for the assessment of GIST chemosensitivity, and for screening of new compounds for their cytotoxic and antitumor activities *in vitro* and *in vivo*, as well.

**Key words:** gastrointestinal stromal tumors; GISTs; tumor cell cloning; paclitaxel; doxorubicin; etoposide; cytotoxicity; resistance.

Несмотря на существовавшую на протяжении длительного времени точку зрения о низкой эффективности химиотерапии у больных с гастроинтестинальными стромальными опухолями (ГИСО) [1, 2], в последнее время появились исследования, свидетельствующие об обратном. Например, показаны достаточно хорошие перспективы для использования отдельных химиопрепаратов в лечении больных с метастатическими и неоперабельными формами ГИСО [3, 4]. Результаты, полученные нашей научной группой, также свидетельствуют о том, что некоторые опухолевые клеточные линии ГИСО чувствительны к ингибиторам топоизомеразы II типа как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 6]. Примечательно, что эффект химиопрепаратов данной группы был выявлен в отношении клеточных линий ГИСО — как чувствительных, так и резистентных к таргетному препарату иматинибу. Кроме того, мы обнаружили, что иматиниб способен вызывать сенситизацию опухолевых клеток ГИСО к химиопрепаратам данной группы [7]. Одним из потенциальных механизмов такого феномена является обнаруженная нами способность иматиниба ингибировать процессы гомологичной рекомбинации ДНК и, как следствие, невозможность опухолевых клеток репарировать повреждения ДНК, возникшие под воздействием на них доксорубина и этопозиды [8]. Результаты этих экспериментальных данных коррелируют с результатами некоторых клинических исследований, показавших эффективность применения иматиниба в комбинации с малыми дозами доксорубина у больных с ГИСО [9]. Примечательно, что эффективность использования вышеуказанной комбинации препаратов была показана в том числе в группе больных, у которых не определялись известные «традиционные» мутации *KIT/PDGFR*A.

Вышеизложенное свидетельствует о хороших перспективах применения отдельных химиопрепаратов для терапии больных с ГИСО. В то же время является очевидным факт неуклонного развития

химиорезистентности злокачественных новообразований после начала проведения химиотерапии онкологическим больным. Временной интервал, в течение которого опухоль остается восприимчивой к химиопрепаратам, зависит от многих факторов и может варьировать в каждом индивидуальном случае. Следовательно, представляется перспективной индивидуальная оценка чувствительности опухоли к химиопрепаратам и подбор индивидуальных схем химиотерапии онкологическим больным, в том числе больным с ГИСО.

Одним из критериев, используемых при поиске новых перспективных соединений с противоопухолевой активностью, является их способность индуцировать гибель опухолевых клеток с резистентностью к уже известным химиопрепаратам различных групп. Вследствие существовавшей длительное время ошибочной, на наш взгляд, точки зрения о низкой эффективности химиопрепаратов в лечении больных с ГИСО в настоящее время в арсенале исследователей не имеется клеточных линий ГИСО, обладающих фенотипическими свойствами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

**Цель исследования** — получение клона опухолевых клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей, обладающего устойчивостью к химиопрепаратам различного механизма действия, и оценка его чувствительности к некоторым химиопрепаратам разных групп.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия ГИСО T-1, чувствительная к действию таргетного препарата иматиниба [10]. Для получения клона клеток ГИСО с признаками МЛУ опухолевые клетки культивировали с химиопрепаратом паклитаксолом в течение 8 мес. Начальная доза химиопрепарата в культуре клеток составляла 0,4 нмоль, конечная — 24 нмоль. Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в культуральной среде RPMI-1640 с добавлени-

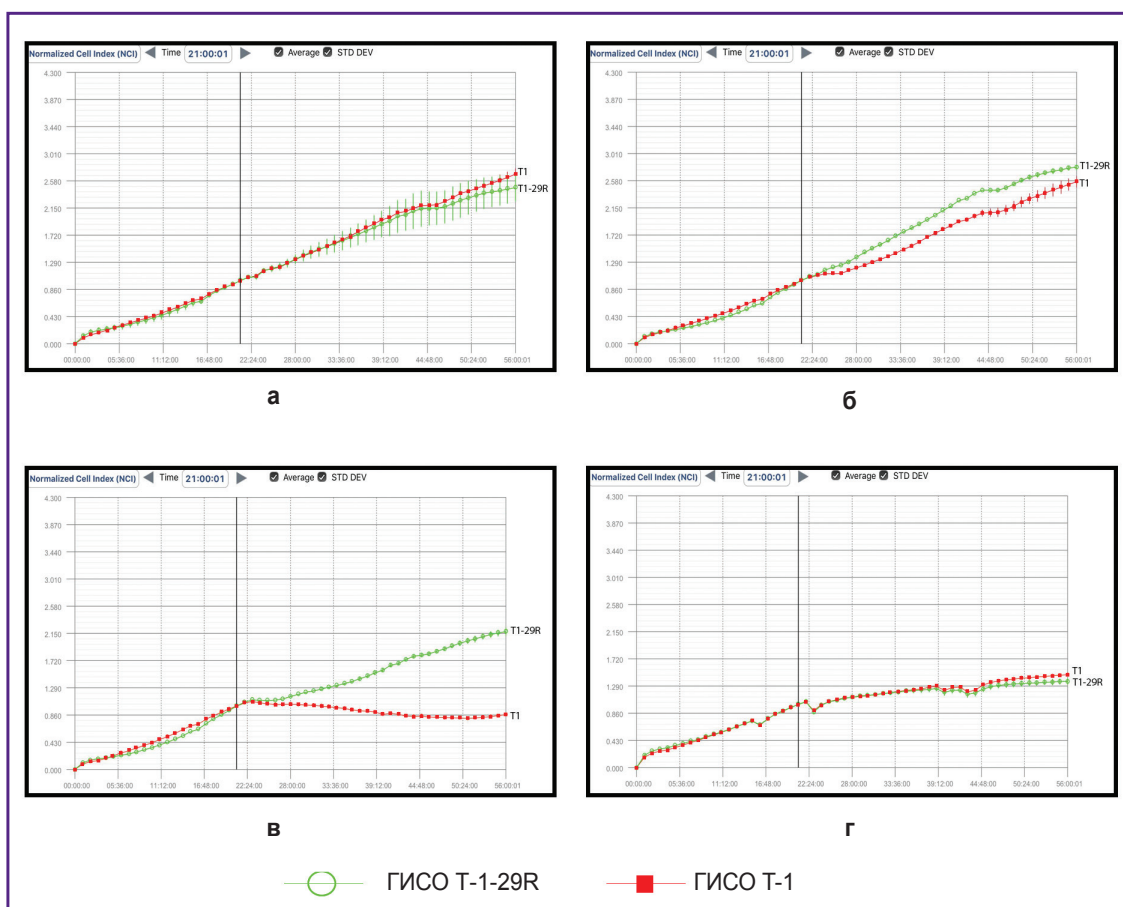
ем L-глутамина, пенициллина и стрептомицина (все реагенты — «ПанЭКО», Россия), а также 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Каждые 2 мес проводили сравнительную оценку чувствительности клеток ГИСО и их клон к химиопрепаратам различных групп: доксорубину, винбластину, паклитакселу, иматинибу (Sigma-Aldrich, США), этопозиду, гидроксимочевине (Calbiochem, США) и цисплатину. С этой целью опухолевые клетки засевали в лунки плоскодонного 96-луночного культурального планшета (Corning, США) и культивировали в трех повторностях в течение 48–72 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Цитотоксичность вышеуказанных препаратов оценивали колориметрически с помощью реагента CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega, США) на планшетном анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм. Оценка пролиферативной способности клеток ГИСО в присутствии паклитаксела проводили методом измерения клеточного индекса в режиме реального времени с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Уровень экспрессии белков, являющихся маркерами повреждений ДНК, апоптоза и химиорезистентности, оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител.

Статистический анализ результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2007.

**Результаты и обсуждение.** Спустя 8 мес культивирования клеток ГИСО T-1 в присутствии постепенно возрастающих концентраций паклитаксела (29-й пассаж) в них появились признаки резистентности к данному химиопрепарату — полученный клон опухолевых клеток ГИСО был обозначен как T-1-29R.

О наличии химиорезистентности клеток T-1-29R свидетельствовали результаты оценки их пролиферативной активности в режиме реального времени в присутствии паклитаксела. Например, было обнаружено, что пролиферативные способности «материнского» и «дочернего» клонов клеток в отсутствие химиопрепарата (контроль) не отличались друг от друга (рис. 1, а). При культивировании клеток T-1-29R в присутствии паклитаксела в дозах 1 и 10 нмоль (рис. 1, б, в соот-



**Рис. 1.** Оценка пролиферативной способности клеток ГИСО T-1 и T-1-29R без присутствия препарата паклитаксела (а — контроль) и при различных его концентрациях: б — 1 нмоль; в — 10 нмоль; г — 100 нмоль. Кривые роста опухолевых клеток *in vitro* получены на приборе iCELLigence (США)

ветственно) скорость их пролиферации значительно превышала аналогичный показатель «материнского» клон ГИСО Т-1. Культивирование «материнских» и «дочерних» клеток ГИСО в присутствии высоких доз паклитаксела (100 нмоль) было губительным для обоих типов опухолевых клеток (рис. 1, а).

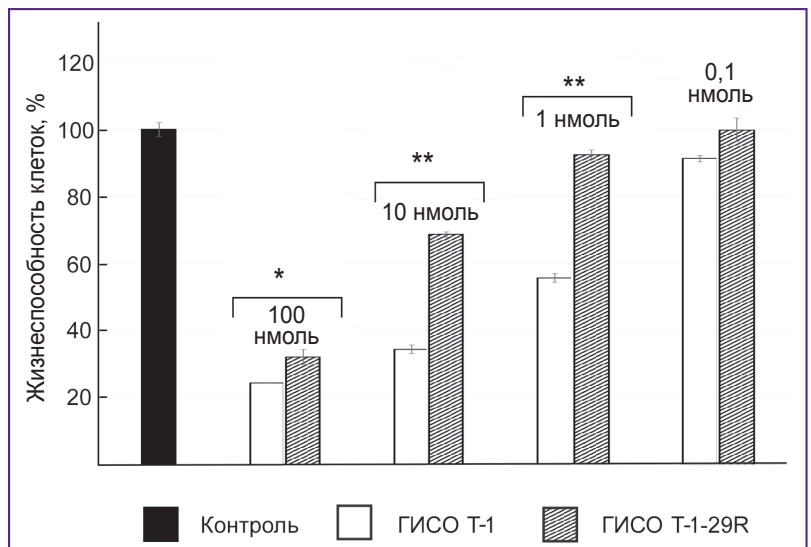
Результаты фотокolorиметрического МТТ-теста также показали более высокую жизнеспособность клеток Т-1-29R по сравнению с «материнскими» опухолевыми клетками ГИСО Т-1 в присутствии данного химиопрепарата, что свидетельствовало в пользу имеющейся в клетках ГИСО Т-1-29R устойчивости к паклитакселу (рис. 2).

Помимо резистентности к паклитакселу в клетках ГИСО Т-1-29R была отмечена устойчивость к действию ингибиторов топоизомеразы II типа, например доксорубицина (рис. 3).

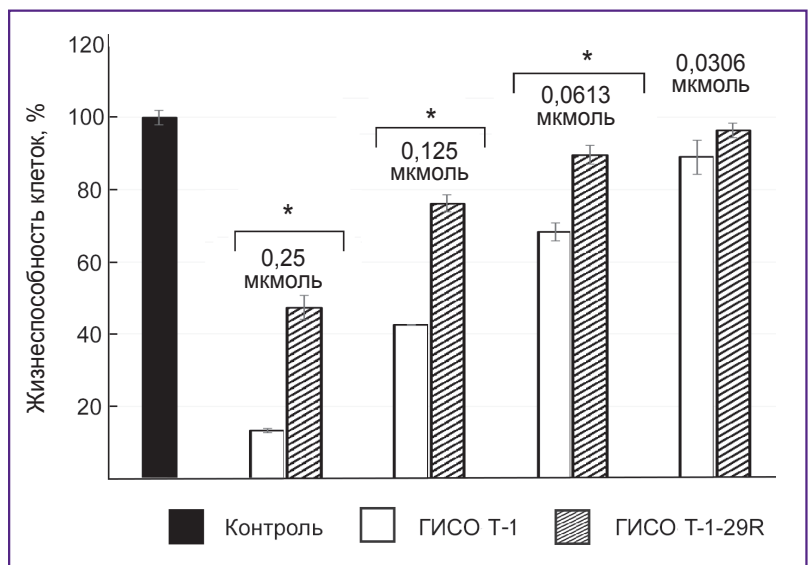
На основании проведенных исследований были определены эффективные концентрации химиопрепаратов, вызывающие 50% ингибирование выживаемости ( $IC_{50}$ ) опухолевых клеток Т-1 и Т-1-29R. Сравнительные значения  $IC_{50}$  химиопрепаратов (см. таблицу) свидетельствуют о том, что клон клеток ГИСО Т-1-29R обладает перекрестной резистентностью к ингибиторам топоизомеразы II типа, а также к некоторым препаратам, влияющим на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (таксанам).

Учитывая тот факт, что основным механизмом гибели опухолевых клеток под действием вышеуказанных препаратов является апоптоз, было проведено сравнительное изучение их способности индуцировать гибель «материнских» (Т-1) и «дочерних» (Т-1-29R) клеток ГИСО по механизму апоптоза. Установлено, что инкубация «материнских» клеток ГИСО Т-1 с паклитакселом приводит к значительному и дозозависимому повышению уровней экспрессии расщепленных форм каспазы-3 и поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (PARP), являющихся общепризнанными маркерами апоптоза (рис. 4, а). Ожидаемо не выявлено повышения уровня экспрессии данных белков в клетках ГИСО Т-1-29R, инкубированных с паклитакселом (рис. 4, б).

Аналогичным образом инкубация клеток ГИСО Т-1 (но не Т-1-29R!) с ингибиторами топоизомеразы II типа приводила к дозозависимому повышению уровней экспрессии вышеуказанных маркеров апоптоза (рис. 5, а, б соответственно). Примечательно, что уровень



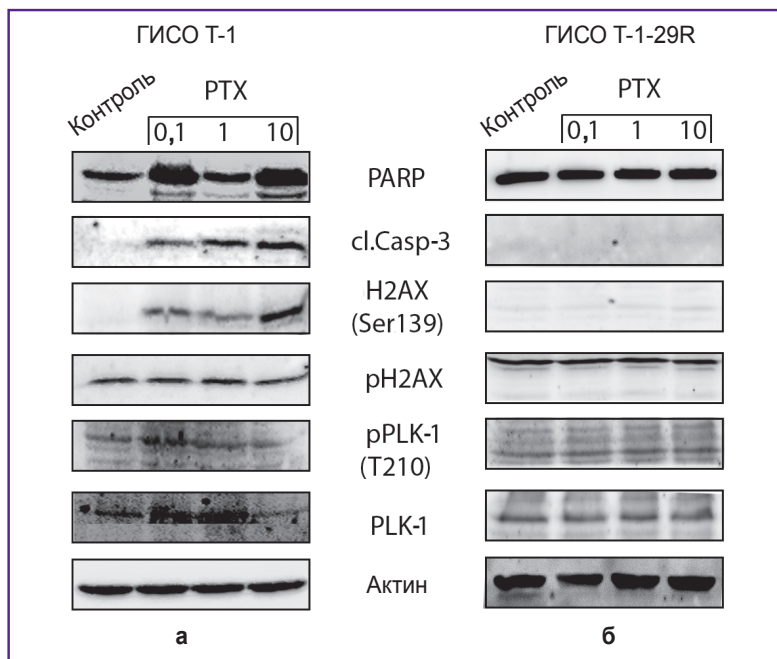
**Рис. 2.** Цитотоксическая активность паклитаксела в отношении клеток ГИСО Т-1 и Т-1-29R. Цитотоксичность определяли по результатам МТТ-теста. Статистически значимая разница значений между исследуемыми клеточными линиями: \* —  $p < 0,01$ ; \*\* —  $p < 0,001$



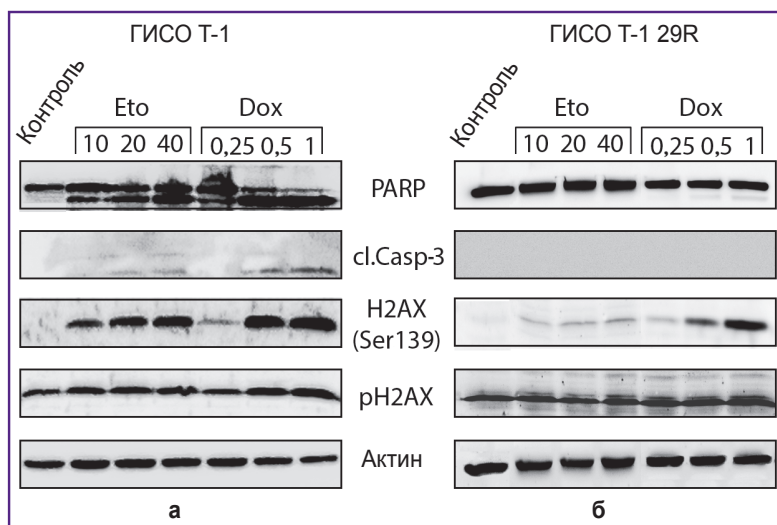
**Рис. 3.** Цитотоксическая активность доксорубицина в отношении клеток ГИСО Т-1 и Т-1-29R. Цитотоксичность определяли по результатам МТТ-теста. \* — статистически значимая разница значений между исследуемыми клеточными линиями;  $p < 0,001$

#### Цитотоксические свойства химиопрепаратов в отношении клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли

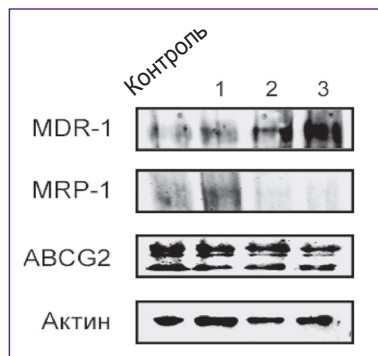
Химиопрепарат	ГИСО Т-1	ГИСО Т-1-29R
Паклитаксел, нмоль	0,67±0,09	21,47±1,03
Доксорубицин, мкг/мл	0,14±0,07	0,27±0,03
Этопозид, мкмоль	42,69±1,38	70,95±0,97
Цисплатин, мкмоль	5,34±0,24	6,4±0,4



**Рис. 4.** Паклитаксел (PTX) индуцирует апоптоз клеток ГИСО Т-1 (а), но не Т-1-29R (б). Маркеры апоптоза — расщепленные формы PARP и каспазы-3 (cl.Casp-3), маркеры М-фазы — повышение уровня экспрессии pH2AX и pPLK-1. Концентрации паклитаксела указаны в нмоль. В качестве контроля использовали уровень экспрессии актина



**Рис. 5.** Доксорубицин (Dox) и этопозид (Eto) индуцируют апоптоз преимущественно клеток ГИСО Т-1 (а), но не Т-1-29R (б). Маркеры апоптоза — расщепленные формы PARP и каспазы-3 (cl.Casp-3), маркер двунитевых разрывов ДНК — повышение уровня экспрессии pH2AX (Ser139). Концентрации этопозида указаны в мкмоль, доксорубицина — в мкг/мл



**Рис. 6.** Динамика уровней экспрессии белков химиорезистентности (MDR-1, MRP-1 и ABCG2) в клетках ГИСО Т-1 при их культивировании в присутствии паклитаксела: 1 — 2 мес, 2 — 5 мес, 3 — 8 мес культивирования

экспрессии гистона 2А, фосфорилированного по остаткам серина в положении 139 (Ser139) (pH2AX), который является общепризнанным маркером двунитевых разрывов ДНК, значительно повышался в клетках ГИСО Т-1 после воздействия вышеназванных химиопрепаратов (см. рис. 5, а). В то же время отмечено лишь минимальное повышение уровня экспрессии pH2AX в клетках Т-1-29R после их инкубации с этопозидом (см. рис. 5, б). Эффект доксорубицина также был менее выраженным по сравнению с «материнскими» клетками ГИСО Т-1.

Снижение уровней экспрессии маркеров апоптоза на фоне снижения уровня повреждений ДНК (двунитевых разрывов) в клетках Т-1-29R после воздействия на них ингибиторов топоизомеразы II типа могло являться следствием ряда факторов, например активации репаративных процессов ДНК после генотоксического воздействия химиопрепаратов, усиления элиминации химиопрепаратов из опухолевых клеток и уменьшения тем самым времени их воздействия на ДНК и др. Учитывая выбранный нами временной интервал для оценки уровня экспрессии pH2AX в опухолевых клетках, первое предположение следует признать маловероятным. В пользу усиления элиминации химиопрепаратов из опухолевых клеток Т-1-29R свидетельствует значительное повышение в них уровня экспрессии Р-гликопротеина (MDR-1), ответственного

за элиминацию цитостатиков из клеток и обуславливающего тем самым развитие МЛУ (рис. 6). В то же время не было отмечено изменений в уровне экспрессии некоторых других белков-транспортёров, обуславливающих развитие МЛУ, например ABCG2, уровень экспрессии которых был изначально высоким.

**Заключение.** Результатом проведенных исследований явилось получение клона клеток опухолевой линии ГИСО Т-1, обладающего устойчивостью к действию химиопрепаратов различных групп, а именно влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (паклитаксела), а также ингибиторов топоизомеразы II типа (доксорубина и этопозида). Полученный клон клеток ГИСО с признаками множественной лекарственной устойчивости может быть использован при проведении скрининга наиболее эффективных в отношении ГИСО химиопрепаратов и вновь синтезированных соединений. Результаты исследования свидетельствуют о высокой чувствительности клеток ГИСО к действию ингибиторов топоизомеразы II типа и таксанов, что подтверждает необходимость пересмотра существующей точки зрения об их химиорезистентности.

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

**Конфликт интересов** у авторов отсутствует.

## Литература/References

1. Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J., LeCesne A., Reichardt P., Blay J.Y., Issels R., van Oosterom A., Hogendoorn P.C., Van Glabbeke M., Bertulli R., Judson I. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004; 364(9440): 1127–1134, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17098-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17098-0).
2. 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): 466–477, <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.124122>.
3. Pessetto Z.Y., Weir S.J., Sethi G., Broward M.A., Godwin A.K. Drug repurposing for gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(7): 1299–1309, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-12-0968>.
4. Pessetto Z.Y., Ma Y., Hirst J.J., von Mehren M., Weir S.J., Godwin A.K. Drug repurposing identifies a synergistic combination therapy with imatinib mesylate for gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(10): 2276–2287, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0043>.
5. Boichuk S., Lee D.J., Mehalek K.R., Makielski K.R., Wozniak A., Seneviratne D.S., Korzeniewski N., Cuevas R., Parry J.A., Brown M.F., Zewe J., Taguchi T., Kuan S.F., Schöffski P., Debiec-Rychter M., Duensing A. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2014; 74(4): 1200–1213, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1955>.
6. 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. Galembikova A.R., Dunaev P.D., Boichuk S.V. Sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to the various chemotherapeutic agents. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2015; 6. URL: <https://www.science-education.ru/en/article/view?id=23728>.
7. Boichuk S.V., Galembikova A.R., Ramazanov B.R., Duensing A. Imatinib enhances the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to topoisomerase II inhibitors. *Advances in Molecular Oncology* 2015; 2(1): 076, <https://doi.org/10.17650/2313-805X.2015.2.1.076-081>.
8. Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Мартынова Е.В., Рамазанов Б.Р., Дусинг А. Иматиниб ингибирует процессы гомологичной рекомбинации и вызывает сенситизацию клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. *Цитология* 2016; 58(3): 178–185. Boichuk S.V., Galembikova A.R., Martinova E.V., Ramazanov B.R., Duensing A. Imatinib effectively inhibits homologous recombination and sensitizes gastrointestinal stromal tumor cells to the topoisomerase type II inhibitors. *Tsitologiya* 2016; 58(3): 178–185.
9. Maurel J., Martins A.S., Poveda A., López-Guerrero J.A., Cubedo R., Casado A., Martínez-Trufero J., Ramón Ayuso J., Lopez-Pousa A., Garcia-Albeniz X., Garcia del Muro X., de Alava E. Imatinib plus low-dose doxorubicin in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors refractory to high-dose imatinib. A phase I–II study by the Spanish Group for Research on Sarcomas. *Cancer* 2010; 116(15): 3692–3701, <https://doi.org/10.1002/cncr.25111>.
10. Taguchi T., Sonobe H., Toyonaga S., Yamasaki I., Shuin T., Takano A., Araki K., Akimaru K., Yuri K. 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, <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780461>.