

**ИМАТИНИБ ИНГИБИРУЕТ ПРОЦЕССЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ДНК  
И ВЫЗЫВАЕТ СЕНСИТИЗАЦИЮ КЛЕТОК  
ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ  
К ИНГИБИТОРАМ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II ТИПА**

© С. В. Бойчук,<sup>1,\*</sup> А. Р. Галембикова,<sup>1</sup> Е. В. Мартинова,<sup>2</sup>  
Б. Р. Рамазанов,<sup>1</sup> А. Дусинг<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012,

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, 420000, и

<sup>3</sup> Раковый центр Университета г. Питтсбурга, Питтсбург, США, 15232;

\* электронный адрес: boichuksergei@mail.ru

Действие ингибитора тирозинкиназ иматиниба на клетки гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) повышает их чувствительность к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа доксорубицину и этопозиду. Этот феномен обусловлен способностью таргетного препарата снижать уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСТ и эффективно подавлять процессы гомологичной рекомбинации ДНК. Результатом несостоятельности репаративных процессов в клетках ГИСТ под действием иматиниба является усиление их гибели по механизму апоптоза после индукции в клетках ГИСТ повреждений, вызванных ингибиторами ДНК-топоизомеразы II типа. Описанный эффект препарата наблюдался как в чувствительных, так и в резистентных к иматинибу клеточных линиях ГИСТ, но не наблюдался на клетках лейомиосарком, которые оставались нечувствительными к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа после предварительного действия иматиниба.

**Ключевые слова:** гомологичная рекомбинация, Rad51, сенситизация, апоптоз, иматиниб, ингибиторы ДНК-топоизомеразы II типа, гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСТ).

**Принятые сокращения:** ГИСТ — гастроинтестинальные стромальные опухоли, ИМ — иматиниб мезилат.

Основным патогенетическим механизмом развития гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) является активирующая мутация гена тирозинкиназного рецептора *c-KIT*, результатом которой является стимуляция митотической активности и пролиферации интерстициальных клеток Каяла, в норме регулирующих моторику желудочно-кишечного тракта. Поэтому использование ингибитора тирозинкиназ иматиниба мезилата (ИМ) является эффективным в терапии пациентов с неоперабельными, рецидивирующими и (или) метастатическими формами заболевания. Тем не менее развитие вторичных мутаций в клетках ГИСТ под действием данного таргетного препарата приводит к развитию лекарственной резистентности к данному препарату в течение 2 лет с момента начала проведения таргетной терапии (Verweij et al., 2004; Gramza et al., 2009). Существующая общепринятая концепция о химиорезистентности опухолевых клеток ГИСТ в последнее время подвергается существенному пересмотру. Например, наши исследования показали, что в клетках ГИСТ сохраняется высокая чувствительность к некоторым химиопрепаратам, в частности к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа митаксантрону (Boichuk et al., 2014). Кроме того, было обнаружено, что действие ИМ на клетки ГИСТ существенным образом влияет на

уровень экспрессии некоторых белков (например, рекомбиназы Rad51), участвующих в reparации повреждений ДНК (Бойчук и др., 2015). С учетом характера повреждений ДНК, вызываемых ингибиторами ДНК-топоизомеразы II типа, снижение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 под действием ИМ позволило сделать предположение о возможности ИМ-опосредованной сенситизации опухолевых клеток ГИСТ к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа вследствие снижения эффективности процессов гомологичной рекомбинации.

В настоящей работе представлены экспериментальные данные о способности ИМ подавлять процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывать сенситизацию различных клеточных линий ГИСТ, в том числе ИМ-резистентных к химиопрепаратам, относящихся к классу ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа.

### Материал и методика

**Клетки.** Объектами исследования служили клеточные линии ГИСТ, обладающие чувствительностью к ИМ (ГИСТ882 и Т-1) и резистентные к нему (ГИСТ430), любезно предоставленные профессорами Джонатаном

Флетчером (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, США) и Такахиро Тахагучи (Kochi University, Япония). В качестве отрицательного контроля использовали клеточную линию лейомиосаркомы SK-LMS-1 (ATCC, США), относящуюся (как и клетки ГИСТ) к группе сарком мягких тканей, имеющих признаки гладкомышечной и нейрогенной дифференцировки. Эти клетки в отличие от клеток ГИСТ не имеют активирующей мутации гена *c-KIT* и, следовательно, невосприимчивы к действию таргетного препарата ИМ. Клетки культивировали в стандартных условиях ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) в культуральной среде RPMI-1640 (ПАНЭКО, Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), антибиотики (пенициллин и стрептомицин) и L-глутамин (все реагенты от ПАНЭКО, Россия). Клетки культивировали в присутствии ИМ, либо химиопрепараторов доксорубицина (Sigma, США) или этопозида (Calbiochem, США), либо ИМ (преинкубация клеток в течение 12 ч) в сочетании с одним из вышеуказанных химиопрепараторов. Маточные (1000-кратные) растворы вышеназванных препаратов готовили на диметилсульфоксиде (ДМСО).

Экспрессию белков, отражающих повреждение ДНК, активацию путей репарации повреждений ДНК и развитие апоптоза, оценивали методом иммуноблотинга с использованием соответствующих моноклональных антител.

Эффективность процессов гомологичной рекомбинации оценивали методом проточной цитометрии (FACSCanto II, BD) с использованием индикаторной клеточной линии DR-U2-OS, содержащей интегрированную в геном клеток линии U-2-OS единичную копию гена *GFP*, приобретающего свою функциональность только после индукции двухнитевых разрывов ДНК посредством трансфекции в клетки *Scel*-содержащей плазиды (Addgene, США) и последующей репарации данных разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации. Эта клеточная линия ранее успешно нами использовалась при изучении способности некоторых клеточных белков (например, белка PML и Rad51) влиять на процессы гомологичной рекомбинации ДНК (Boichuk et al., 2011).

Таким образом, увеличение или уменьшение количества GFP-позитивных клеток после индукции в них *Scel*-индуцированных разрывов являлось критерием усиления и ослабления процессов гомологичной рекомбинации соответственно.

Для оценки пролиферативной способности клеточных линий ГИСТ засевали в лунки плоскодонного 96-луночного культурального планшета (Costar, США). После достижения 70—80%-ной конфлюэнтности клеток в культуральную среду вносили ИМ, или химиопрепараторы (доксорубицин или этопозид), или ИМ в сочетании с одним химиопрепаратором, вносимых последовательно с интервалом 12 ч. Клетки культивировали (в трех повторностях и при различных концентрациях химиопрепараторов) в течение 48 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере, содержащей 5 %  $\text{CO}_2$ . Пролиферативную способность клеток ГИСТ определяли фотоколориметрически с помощью реагента CellTiter 96(r) AQueous MTS Reagent Powder (Promega, США) на планшетном анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм. Статистический анализ результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2007.

## Результаты

Результаты колориметрического MTS-теста показали способность таргетного препарата ИМ индуцировать чувствительность опухолевых клеток ГИСТ к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II типа доксорубицину и этопозиду. Например, преинкубация клеток ГИСТ882 с ИМ (1 мкМ) в течение 12 ч и последующее внесение в среду клеток этопозида в различных концентрациях приводила к дозозависимому снижению пролиферативной активности опухолевых клеток, превышающей эффект каждого из препаратов, использованных в отдельности (рис. 1). Примечательно, что ИМ также вызывал чувствительность клеток ГИСТ882 к доксорубицину в низких дозах, не оказывавших самостоятельного цитотоксического действия на нативные (не предобработанные ИМ) клетки (рис. 1, в). Эта закономерность была выявлена и на другой клеточной линии ГИСТ, чувствительной к ИМ (T-1).

Ингибиторы ДНК-токоизомеразы II типа (например, доксорубицин) в зависимости от времени действия индуцировали образование двухнитевых разрывов ДНК в клетках ГИСТ882 и T-1, о чем свидетельствовало значительное повышение уровня экспрессии гистона 2А, фосфорилированного по остаткам серина в положении 139 ( $\gamma\text{-H2AX}$ ) (рис. 2). Это в свою очередь приводило к активации процессов репарации повреждений ДНК за счет увеличения уровней экспрессии ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) и киназы ATM, фосфорилированных по остаткам серина 2056 (pДНК-ПК-S2056) и 1981 (pATM-S1981), а также соответствующих «точек рестрикции», регулирующих клеточный цикл (белка Р53, фосфорилированного по серину-15 (pP53-S15)). Аналогичные изменения в клетках ГИСТ наблюдали и при их инкубации с этопозидом. Повреждения ДНК в клетках ГИСТ активировали процессы гомологичной рекомбинации, что подтверждалось повышением уровня рекомбиназы Rad51 (рис. 2). Несмотря на то что в клетках ГИСТ, обработанных ИМ, происходили аналогичные изменения (хотя и менее выраженные) уровня экспрессии  $\gamma\text{-H2AX}$ , pATM-S1981 и pP53-S15, экспрессия рекомбиназы Rad51 значительно снижалась, что может свидетельствовать об ослаблении процессов гомологичной рекомбинации в клетках под действием ИМ. Примечательно, что уровень экспрессии Rad51 оставался по-прежнему низким в клетках ГИСТ, культивированных с ингибиторами ДНК-токоизомеразы II на фоне действия ИМ. При этом высокие уровни экспрессии  $\gamma\text{-H2AX}$  и pATM-S1981 в этих экспериментальных условиях свидетельствовали как о наличии двухнитевых разрывов ДНК, так и об активации сигнальных путей репарации этих повреждений (рис. 2).

Таким образом, мы предположили, что низкие значения колориметрического MTS-теста, свидетельствующие о низкой жизнеспособности опухолевых клеток ГИСТ в условиях сочетанного воздействия на клетки ИМ и доксорубицина (или этопозида), могут быть следствием несостоятельности процессов репарации повреждений ДНК, индуцированных ингибиторами ДНК-токоизомеразы II, а молекулярным механизмом этого феномена — давление в клетках процессов гомологичной рекомбинации, опосредованных Rad51, в результате действия ИМ.

Для подтверждения правомочности данной гипотезы мы изучили способность ИМ подавлять процессы гомологичной рекомбинации, запускаемые *Scel*-индуцируемыми двухнитевыми разрывами ДНК. Оказалось, что трансфекция плазиды pCBA-*Scel* в «индикаторную»

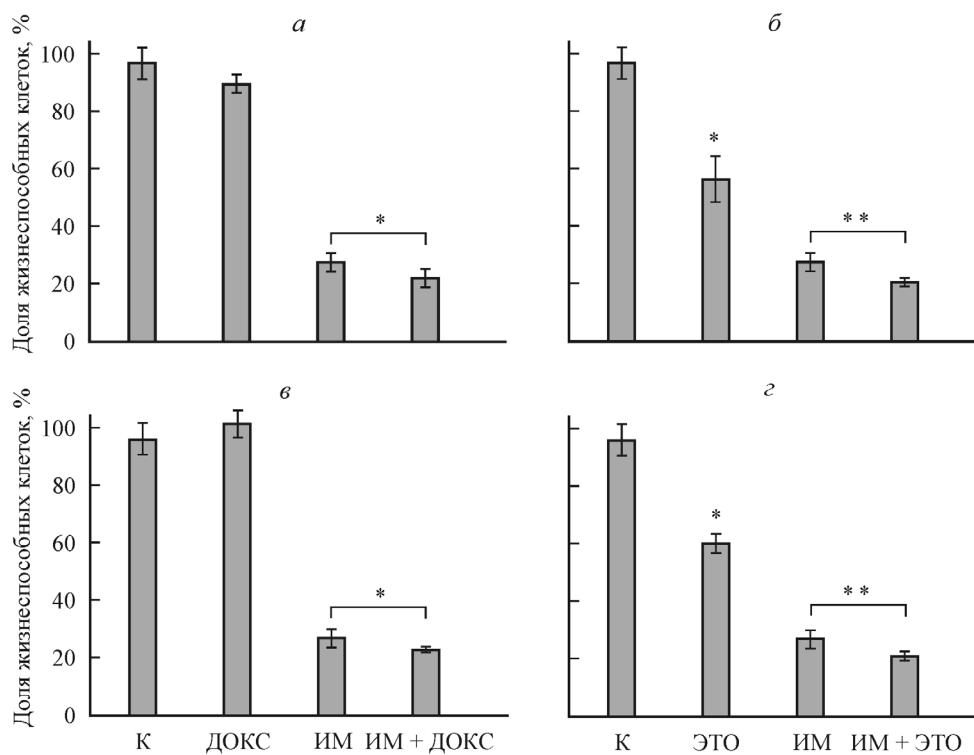


Рис. 1. Цитотоксическая активность доксорубицина (ДОКС; *а, в*) и этопозида (ЭТО; *б, г*) в отсутствие иматиниба мезилата (ИМ, 1 мкМ) и на фоне его действия на клетки линии ГИСТ882.

Дозы: 0.25 (*а*) и 0.12 (*в*) мкг/мл ДОКС, 40 (*б*) и 20 (*г*) мМ ЭТО. К — контроль. Цитотоксичность определяли по MTS-тесту. Звездочка указывает достоверность отличия от контроля при  $P < 0.05$ .

клеточную линию DR-U-2-OS индуцировала данный тип повреждений ДНК, репарируемый по механизму гомологичной рекомбинации, о чем свидетельствовало увеличение количества GFP-позитивных клеток по сравнению с контролем. (рис. 3, *а, б*). В то же время предобработка клеток ИМ приводила почти к 3-кратному снижению количества GFP-позитивных клеток (рис. 3, *г*), что служит доказательством снижения эффективности репарации Scel-индуцируемых разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации под действием ИМ.

Таким образом, обнаруженный нами феномен усиления цитотоксического эффекта ингибиторов ДНК-топоизомеразы II препаратом ИМ в отношении клеток ГИСТ может быть следствием ингибирования репаративных процессов, а именно гомологичной рекомбинации ДНК, под влиянием ИМ.

Результатом ИМ-индуцированной несостоительности процессов репарации повреждений ДНК явилось усиление гибели клеток ГИСТ по механизму апоптоза после последующего воздействия на них ингибиторов ДНК-топоизомеразы II. Об этом свидетельствовало увеличение уровней экспрессии расщепленных форм поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы-3 на фоне сочетанного действия препаратов по сравнению с культурами клеток ГИСТ882 и Т-1, культивированных только с препаратом ИМ или одним из ингибиторов ДНК-топоизомеразы II (рис. 4).

Примечательно, что способность ИМ вызывать чувствительность опухолевых клеток ГИСТ к использованной группе химиопрепараторов была также обнаружена и на ИМ-резистентной клеточной линии ГИСТ430 (рис. 5). Это также могло являться следствием способности ИМ снижать в клетках ГИСТ430 уровень экспрессии белка

Rad51 (рис. 6) и тем самым влиять на эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК.

В то же время предобработка клеток лейомиосаркомы (линия SK-LMS-1) ИМ не приводила к аналогичному эффекту: уровень экспрессии Rad51 не изменялся по сравнению с контролем. Как и предполагалось, опухолевые клетки линии SK-LMS-1 оставались резистентными к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II, несмотря на предварительное действие ИМ (рис. 7), что согласуется с результатами проведенных нами ранее исследований, показавшими незначительную чувствительность опухолевых клеток лейомиосаркомы SK-LMS-1 к доксорубицину (Boichuk et al., 2014).

## Обсуждение

Устойчивость ГИСТ к действию химиопрепараторов, а также развитие вторичной резистентности ГИСТ к препарату ИМ после начала проведения терапии являются стимулом для поиска новых молекулярных терапевтических мишений ГИСТ и поиска путей для повышения чувствительности опухолевых клеток к уже имеющимся лекарственным препаратам. Например, исследования, проведенные нами ранее, показали, что некоторые компоненты DREAM-комплекса, регулирующего активность факторов транскрипции, а также клеточного цикла, могут рассматриваться в качестве новых перспективных молекулярных мишений для повышения чувствительности клеток ГИСТ к действию таргетных препаратов, например ИМ (Boichuk et al., 2013).

В настоящей работе были представлены новые экспериментальные данные о том, что препарат ИМ способен

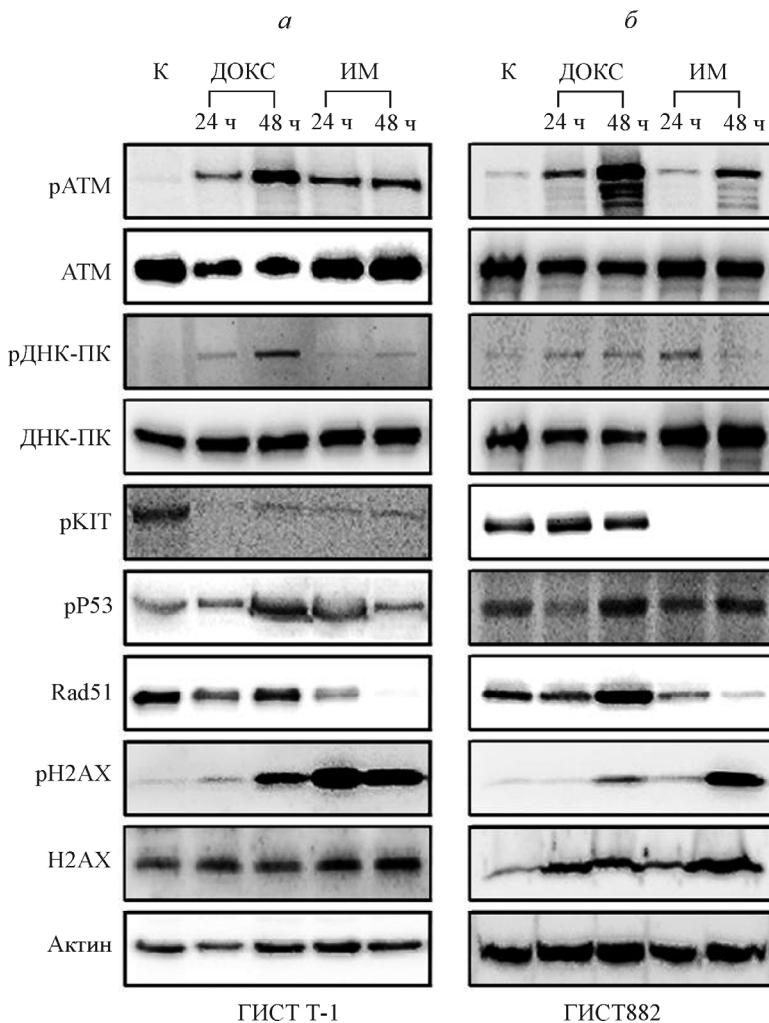


Рис. 2. Доксорубицин (ДОКС) и иматиниб (ИМ) индуцируют изменение уровней экспрессии фосфорилированных форм белков (рATM, ATM, рДНК-ПК, ДНК-ПК, рKIT и рP53) и рекомбиназы Rad51 в результате индукции двухнитевых разрывов ДНК в клетках ГИСТ-T1 (*a*) и ГИСТ882 (*b*).

Здесь и на рис. 4: маркер индукции двухнитевых разрывов ДНК — повышение уровня экспрессии γ-H2AX. К — контроль.

вызывать чувствительность клеток ГИСТ к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II этопозиду и доксорубицину. Примечательно, что низкие дозы этих химиопрепараторов также оказались весьма эффективными на фоне действия ИМ в отношении клеток ГИСТ (рис. 1, *в*, *г*). Изучение молекулярных механизмов этого феномена позволило нам выявить молекулярные механизмы ИМ-индуцированной чувствительности клеток ГИСТ к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II типа. Обнаруженный феномен может быть обусловлен способностью ИМ ингибировать процессы гомологичной рекомбинации ДНК и, следовательно, нарушать репарацию повреждений ДНК (например, одно- и двухнитевых разрывов), вызываемых ингибиторами ДНК-токоизомеразы II типа. В пользу справедливости этого положения свидетельствуют как значительное снижение экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСТ, подвергнутых воздействию ИМ (рис. 3), так и почти 3-кратное ИМ-индуцированное снижение количества GFP-позитивных клеток в экспериментах с использованием репортерной клеточной линии DR-U-2-OS (рис. 4), содержащей интегрированную в клеточный геном копию гена GFP, «обретающего» свою функциональность только после репарации SceI-индуцированных разрывов

ДНК по механизму гомологичной рекомбинации (Pierce et al., 1999).

Известно, что несостоятельность процессов репарации повреждений ДНК является предпосылкой для последующей активации процессов апоптоза. Этот механизм является частью программы, направленной на поддержание генетической стабильности, и считается одним из эффективных механизмов устраниния клеток с потенциально опасными мутациями. С другой стороны, целенаправленное подавление активности ряда отдельных белков, участвующих в репарации повреждений ДНК, в настоящее время рассматривается в качестве одного из перспективных направлений в индукции химио- и радиочувствительности опухолевых клеток (Golding et al., 2012; Huntoon et al., 2013; Woods et al., 2013).

Результаты нашего исследования согласуются с описанной выше концепцией и показывают, что преинкубация клеток ГИСТ с ИМ ингибирует процессы гомологичной рекомбинации ДНК, вследствие чего повреждения ДНК, индуцированные химиопрепараторами, становятся нерепарируемыми, а это в свою очередь индуцирует запуск программы апоптоза в опухолевых клетках. Об этом свидетельствует повышение уровней экспрессии расщеп-

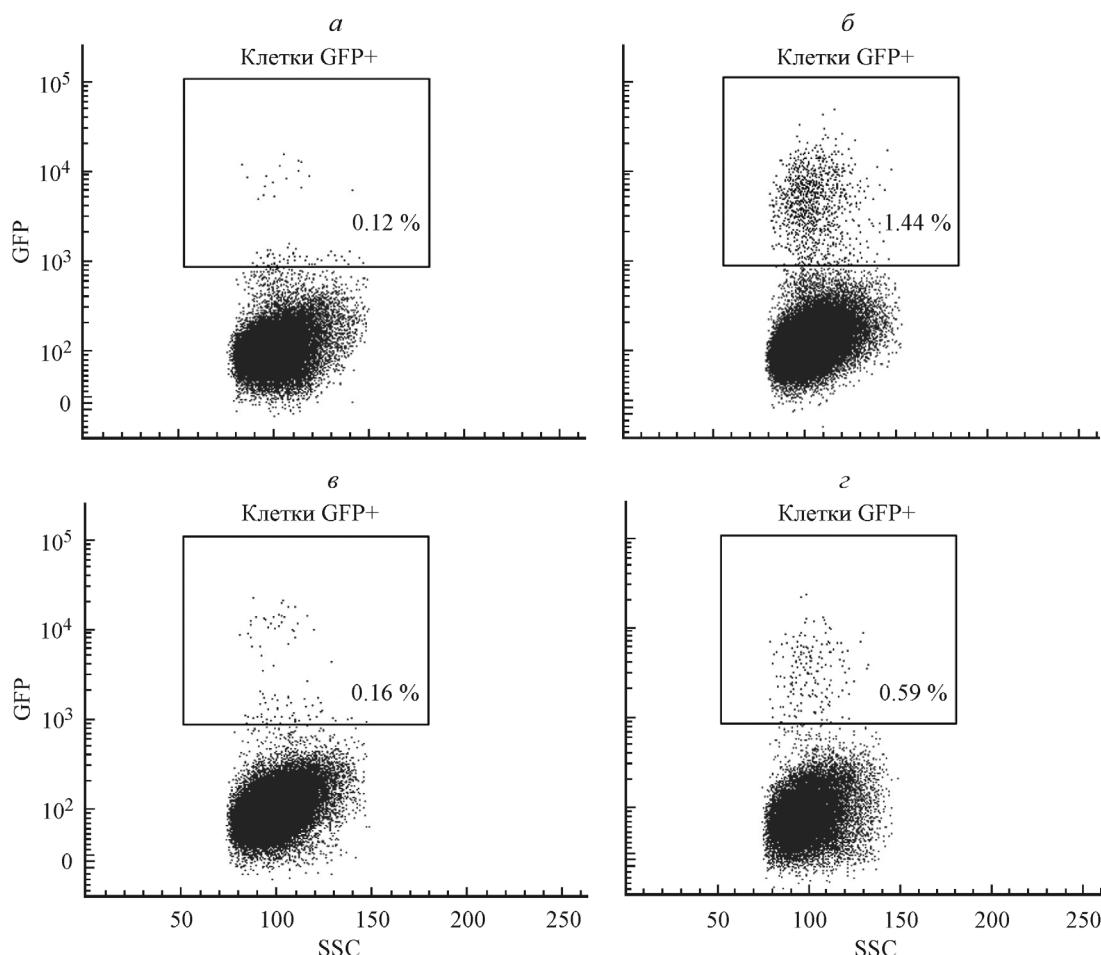


Рис. 3. Точечная (dot-plot) гистограмма клеток линии DR-U-2-OS.

По горизонтали — параметр бокового светорассеяния (side scattering или SSC); по вертикали — интенсивность флуоресценции GFP, отражающая долю GFP-позитивных клеток (указано в % и выделено квадратом). Клетки подвергали трансфекции SceI-содержащей (б, г) или контрольной (а, в) плазмидой и спустя 12 ч культивировали с иматинибом (ИМ) в течение 48 ч (б, в, г).

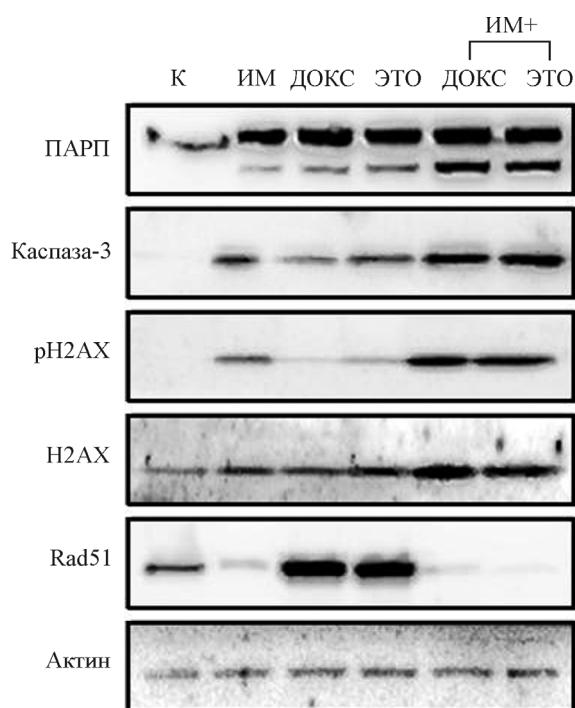


Рис. 4. Изменение уровней экспрессии расщепленных форм поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы-3 в клетках ГИСТ-T1 под действием 0.12 мкг/мл ДОКС или 20 мМ ЭТО, а также их комбинации с 1 мкМ ИМ (преинкубация с ИМ в течение 12 ч).

К — контроль.

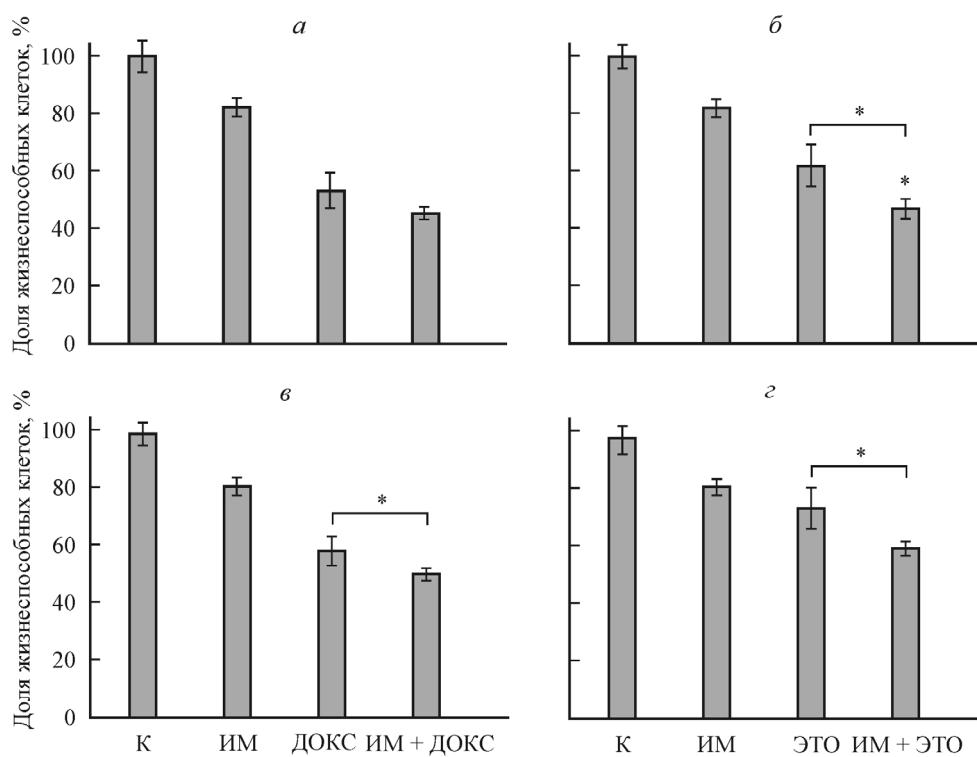


Рис. 5. Цитотоксическая активность ДОКС в концентрациях 0.25 (а) или 0.12 (в) мкг/мл, 20 (б) и 40 мМ (в) ЭТО и 1 мкМ ИМ по отношению к клеткам ГИСТ430.

Звездочка указывает достоверность различия от контроля  $P < 0.05$ . К — контроль.

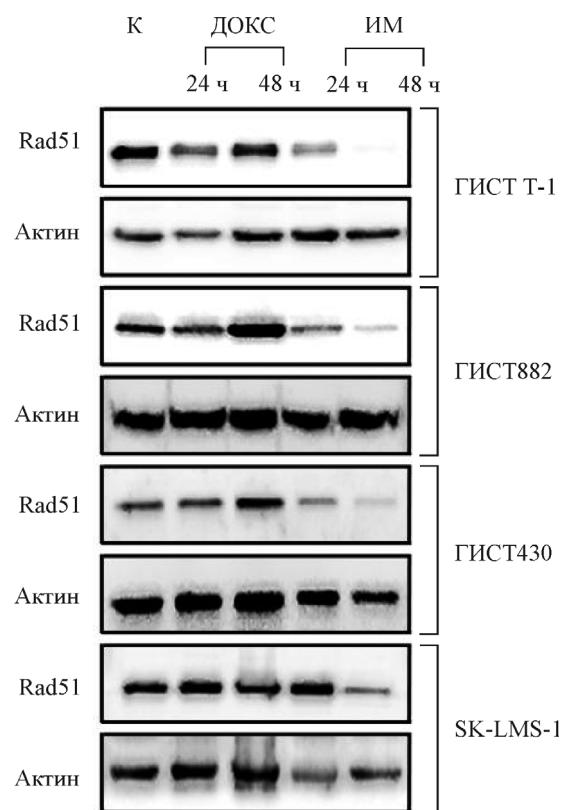


Рис. 6. Экспрессия рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСТ разных линий и клетках SK-LMS-1 до и после действия ИМ (1 мкМ) и ДОКС (0.25 мкг/мл) в течение 24 и 48 ч.

К — контроль.

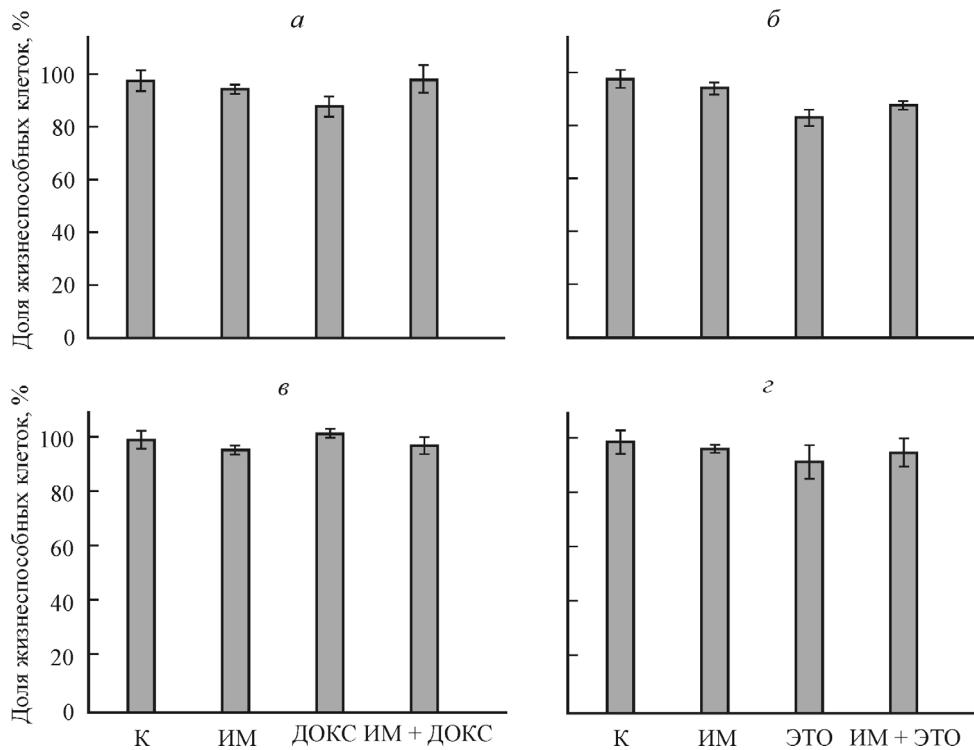


Рис. 7. Цитотоксическая активность ДОКС, ЭТО и ИМ по отношению к клеткам SK-LMS-1.

Дозы препаратов: 0.25 (а) и 0.12 (в) мкг/мл ДОКС, 40 (б) и 20 (г) мМ ЭТО, 1 мкМ ИМ. К — контроль.

ленных форм поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы-3 на фоне комбинированного воздействия препаратов на клетки линии ГИСТ882 и Т-1 по сравнению с клетками этих же линий, инкубированных только с ИМ или с одним из химиопрепараторов (рис. 5).

Примечательно, что эффект ИМ-индуцированной чувствительности к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II был также обнаружен в опухолевых клетках линии ГИСТ430, резистентной к ИМ (рис. 6), в то время как на клеточной линии лейомиосаркомы SK-LMS-1 (контроль) аналогичного эффекта не было. Несмотря на резистентность клеток ГИСТ430 к ИМ, этот препарат обладал незначительной способностью подавлять их пролиферацию (< 15 %), но при этом вызывал чувствительность клеток ГИСТ430 к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II (рис. 5).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности повышения чувствительности клеток ГИСТ к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II посредством ИМ-индуцированного снижения активности процессов гомологичной рекомбинации ДНК. Обнаруженный нами феномен имеет важное научно-практическое значение, так как распространяется на клетки ГИСТ с уже развившейся резистентностью к ИМ. Этот факт открывает дополнительные возможности для терапии больных с ГИСТ на фоне уже развившейся резистентности опухоли к ИМ. Наши экспериментальные данные соглашаются с данными зарубежной научной литературы. Например, способность ИМ вызывать сенсибилизацию опухолевых клеток к доксорубицину и индуцировать в дальнейшем их апоптоз *in vitro* была ранее показана на опухолевых клеточных линиях саркомы Юинга с гиперэкспрессией с-KIT (Gonzalez et al., 2004). Единичные клинические наблюдения также свидетельствуют в пользу

ИМ-индуцированной чувствительности ГИСТ к ингибиторам ДНК-токоизомеразы II (например, доксорубицину) у больных с неоперабельными, метастатическими, а также резистентными к ИМ формами ГИСТ (Maurel et al., 2010).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00342) с использованием оборудования Кафедры общей патологии и Центра коллективного пользования Казанского государственного медицинского университета.

### Список литературы

- Бойчук С. В., Галембикова А. Р., Рамазанов Б. Р., Дусинг А. 2015. Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам токоизомеразы II типа. Успехи молекуляр. онкол. 1 : 76—81. (Boichuk S., Galembikova A., Ramazanov B., Duesing A. 2015. Imatinib enhances the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to the topoisomerase II inhibitors. Success Mol. Oncol. 1 : 76—81.)  
 Boichuk S., Hu L., Makielski K., Pandolfi P.P., Gjoerup O.V. 2011. Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair. PLoS ONE. 6 : e25814.  
 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. 2014. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res. 74 : 1200—1213.  
 Boichuk S., Parry J. A., Makielski K. R., Litovchick L., Baron J. L., Zewe J. P., Wozniak A., Mehalek K. R., Korzeniewski N., Seneviratne D. S., Schöffski P., Debiec-Rychter M., DeCaprio J. A., Duensing A. 2013. The DREAM complex mediates GIST

cell quiescence and is a novel therapeutic target to enhance imatinib-induced apoptosis. *Cancer Res.* 73 : 5120—5129.

Golding S., Rosenberg E., Adams B. R., Wignarajah S., Beckta J. M., O'Connor M. J., Valerie K. 2012. Dynamic inhibition of ATM kinase provides a strategy for glioblastoma multiform radiosensitization and growth control. *Cell Cycle.* 11 : 1167—1173.

Gonzalez I., Andreu E. J., Panizo A., Fontalba A., Fernández-Luna J. L., Gaboli M., Sierrasesúmaga L., Martín-Algarra S., Pardo J., Prósper F., de Alava E. 2004. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 10 : 751—761.

Gramza A. W., Corless C. L., Heinrich M. C. 2009. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 15 : 7510—7518.

Huntoon C. J., Flatten K. S., Wahner Hendrickson A. E., Huehls A. M., Sutor S. L., Kaufmann S. H., Karnitz L. M. 2013. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res.* 73 : 3683—3691.

Maurel J., Martins A. S., Poveda A., López-Guerrero J. A., Cubedo R., Casado A., Martínez-Trufero J., Ramón Ayuso J., López-Pousa A., García-Albeniz X., García del Muro X., de Alava E. 2010. 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.* 116 : 3692—3701.

Pierce A. J., Johnson R. D., Thompson L. H., Jasin M. 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Develop.* 13 : 2633—2638.

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. 2004. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomized trial. *Lancet.* 364 : 1127—1132.

Woods D., Turchi J. J. 2013. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol. Ther.* 14 : 379—389.

Поступила 18 IX 2015

## IMATINIB EFFECTIVELY INHIBITS HOMOLOGOUS RECOMBINATION AND SENSITIZES GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR CELLS TO THE TOPOISOMERASE TYPE II INHIBITORS

S. V. Boichuk,<sup>1,\*</sup> A. R. Galembikova,<sup>1</sup> E. V. Martinova,<sup>2</sup> B. R. Ramazanov,<sup>1</sup> A. Duensing<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kazan State Medical University, Kazan, 420012, <sup>2</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420000,  
and <sup>3</sup> University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, 15232, USA;  
e-mail: boichuksergei@mail.ru

Imatinib mesylate (IM) sensitizes gastrointestinal stromal tumor (GISTS) cell lines to the topoisomerase type II inhibitors — doxorubicin and etoposide. IM substantially inhibited the cellular viability and induced apoptosis of etoposide-treated GIST cells, whereas GIST cells showed lower etoposide cytotoxicity when treated with etoposide alone. Similar effect was found in doxorubicin-treated GIST cells. These effects might be due to the substantial down-regulation of Rad51 protein expression and inhibition of Rad51-mediated homologous recombination DNA repair pathway. Of note, IM's effect indicated above was observed in both imatinib-sensitive (GIST882 and T-1) and resistant (GIST430) cell lines, and was not found in leiomyosarcoma SK-LMS-1 cell line.

**К e y w o r d s:** homologous recombination, Rad51, sensitization, apoptosis, imatinib, topoisomerase type II inhibitors, gastrointestinal stromal tumors (GISTS).