

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ НИКЛОЗАМИДА В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

*А.С. Жирник\*, Ю.П. Семочкина, Е.Ю. Москалева, Н.И. Крылов, И.А. Тубашева, С.Л. Кузнецов, Е.А. Воронцов*

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, НБИКС-центр  
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1; эл. почта: as.zhirnik@mail.ru

На основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) получена полимерная форма никлозамида (ПФН) и исследована её противоопухолевая активность в отношении клеток колоректального рака человека линий SW837, Caco-2, COLO 320 HSR в сравнении с никлозамидом. Показана более высокая по сравнению с никлозамидом цитотоксическая активность ПФН в отношении опухолевых клеток и менее высокая – в отношении нормальных (легочных эмбриональных фибробластов). Механизм цитотоксического действия ПФН и никлозамида одинаков и связан с повреждением митохондрий опухолевых клеток, регистрируемым по снижению накопления родамина-123, повышением уровня активных форм кислорода, в особенности митохондриального супероксидного аниона, и повреждением внутриклеточных мишеней под действием этих метаболитов. Действие никлозамида и ПФН сопровождалось блоком клеточного цикла в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе.

**Ключевые слова:** никлозамид, полимерная форма никлозамида, сополимер молочной и гликолевой кислот, активные метаболиты формы кислорода, клеточный цикл, колоректальный рак

DOI 10.18097/PBMC20176302132

## ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях последних лет накапливаются данные, позволяющие рассматривать митохондрии в качестве перспективной мишени действия новых противоопухолевых препаратов, поскольку повреждение митохондрий может приводить к нарушению энергетического обмена и индукции гибели опухолевых клеток [1]. Наряду с созданием новых веществ с оригинальной химической структурой значительное внимание уделяется выявлению противоопухолевой активности у уже применяющихся в клинической практике лекарственных препаратов. К числу последних относится никлозамид – препарат, который на протяжении 50 лет использовали как противогельминтное средство [2]. Помимо блокирования ряда сигнальных путей, играющих важную роль в жизнедеятельности опухолевых клеток, никлозамид вызывает повреждение митохондрий, что проявляется в снижении мембранного потенциала, разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования, повышении уровня активных форм кислорода (АФК), в основном митохондриального супероксидного аниона (МСОАН), развитии апоптоза и гибели опухолевых клеток [3-5]. Серьезным препятствием для применения никлозамида в качестве противоопухолевого препарата для инъекций является его низкая растворимость в водных растворах. В связи с этим предпринимаются попытки создания новых форм препарата: нанокристаллов (наносuspензий) с использованием стабилизаторов [6, 7], нановолокон из полиэтиленмин-полиэтиленоксида с включёнными в них водорастворимыми комплексами никлозамида с разветвлённым полиэтиленмином [8], смешанных мицелл на основе цетилового эфира полиэтиленгликоля и амфифильного блок-сополимера полистирола и полиакриловой кислоты [9], углеродных наночастиц

с осаждёнными на них комплексами никлозамида с кукурбит[6]урилом [10], а также конъюгированных с биотинном смешанных мицелл на основе полоксамеров [11]. В качестве перспективного носителя никлозамида может быть использован сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA); этот препарат, разрешённый для клинического использования, обладает такими свойствами, как биосовместимость, биodeградируемость, низкая токсичность, низкая иммуногенность [12].

Целью настоящей работы было получение и характеристика противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида (ПФН) на основе PLGA в сравнении с никлозамидом в отношении трёх линий клеток колоректального рака человека и изучение молекулярных механизмов противоопухолевой активности этих препаратов. Исследовали повреждение митохондрий опухолевых клеток, оцениваемое по снижению накопления флуоресцентного красителя родамина-123 (Rho-123), уровень АФК и параметры клеточного цикла после культивирования клеток в присутствии никлозамида и ПФН.

## МЕТОДИКА

Клетки линий колоректального рака человека SW837 (аденокарцинома прямой кишки), Caco-2 (аденокарцинома ободочной кишки), COLO 320 HSR (карцинома сигмовидной кишки), а также нормальные клетки человека (лёгочные эмбриональные фибробласты человека, ЛЭЧ) культивировали в полной культуральной среде DMEM, содержащей 10% сыворотку плодов крупного рогатого скота (СПК, “HyClone”, США) и 50 мкг/мл гентамицина (“ICN”, США), в пластиковых культуральных флаконах

## ДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ НИКЛОЗАМИДА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

(“Corning-Costar”, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Для получения полимерсодержащей композиции с никлозамидом (ПФН) использовали: никлозамид (“Sigma-Aldrich”, США); сополимер молочной и гликолевой кислот PLGA 50/50 (“PURAC Biochemicals”, Нидерланды); полимер EUDRAGIT RS PO (“EVONIK”, Германия); поливиниловый спирт (ПВС, молекулярная масса 30000-70000, “Sigma-Aldrich”); D-маннитол (“Sigma-Aldrich”); этилацетат (“Химмед Синтез”, Россия). Получение полимерных частиц с никлозамидом осуществляли методом эмульгирования в системе “масло/вода” [13]. К 1% водному раствору ПВС при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли раствор полимеров PLGA 50/50 и EUDRAGIT RS PO, взятых в массовом соотношении 3:2 соответственно, и никлозамида в этилацетате. Проводили эмульгирование смеси ультразвуковым гомогенизатором Labsonic U (“B. Braun”, Германия), после чего упаривали в вакууме органический растворитель. Смесь пропускали через стеклянный фильтр в колбу с водным раствором D-маннитола, фильтрат замораживали жидким азотом. Высушивание замороженного продукта проводили на лиофильной сушилке Christ® Alpha I-6 (Германия) в течение 20 ч. Полученный рыхлый лиофилизированный порошок бледно-жёлтого цвета после измельчения помещали в пластиковый контейнер с герметичной крышкой и хранили при 2-8°C. Содержание никлозамида в лиофилизированном препарате после растворения в ДМСО определяли методом ВЭЖХ (система Agilent 1100, “Agilent Technologies”, Германия; колонка Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 250×4,6 мм, 5 мкм; 30°C; изократический режим; элюент А – метанол, элюент В – 0,05% раствор муравьиной кислоты, скорость потока элюента 1,2 мл/мин; объём вводимой пробы 20 мкл; УФ детекция при 322±4 нм). Средний размер полимерных частиц определяли методом автокорреляционной спектроскопии на субмикронном лазерном спектрометре Coulter N4MD (“Beckman Coulter”, США).

Исследование выживаемости клеток проводили с помощью МТТ-теста [14]. Перед добавлением препаратов клетки высевали в 96-луночные планшеты (“Corning-Costar”) по 10 тысяч клеток на лунку и культивировали в присутствии препаратов в течение 72 ч. За 4 ч до окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, “Sigma-Aldrich”) в концентрации 1 мг/мл в среде для культивирования клеток. После развития окраски среду удаляли, выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО и измеряли интенсивность окраски по поглощению при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра iMark Microplate Absorbance Reader (“Bio-Rad”, США). Выживаемость клеток оценивали в процентах от необработанного контроля и по кривым выживаемости рассчитывали значение IC<sub>50</sub> – концентрацию препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток.

Для исследования накопления флуоресцентного красителя Rho-123 клетки центрифугировали и осадок ресуспендировали в тёплой бессывороточной среде в концентрации 1 млн/мл. К суспензии клеток добавляли флуоресцентный краситель Rho-123 (концентрированный маточный раствор в ДМСО, 100 мкг/мл) до конечной концентрации 0,1 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при +37°C на водяной бане, периодически помешивая. Для контроля аутофлуоресценции 1 мл суспензии клеток оставляли в среде без Rho-123. Для исключения популяции мёртвых и погибающих клеток в пробу добавляли раствор йодистого пропидия до конечной концентрации 2 мкг/мл непосредственно перед цитофлуориметрией. Флуоресценцию клеток измеряли с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur (“BD Biosciences”, США) при двух длинах волн в красной и зелёной области спектра, при длине волны возбуждения 488 нм и полосой пропускания для зелёной области спектра – 525 нм (FL1), а для красной – 620 нм (FL3), анализировали по 50 тыс. клеток на пробу.

Определение уровня АФК с carboxy-H2DCFDA проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. В культуре клеток культуральную среду заменяли на фосфатно-солевой буфер (ФСБ), содержащий реагент для определения уровня внутриклеточных АФК carboxy-H2DCFDA (“Thermo Fischer”, США) в концентрации 10 мкМ, и инкубировали 30 мин в стандартных условиях. Маточный раствор carboxy-H2DCFDA в концентрации 20 мМ (10 мкг/мл) в стерильном ДМСО готовили непосредственно перед использованием (“Sigma-Aldrich”). По окончании инкубации клетки дважды промывали ФСБ с 2% бычьим сывороточным альбумином (БСА) и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (“BD Biosciences”).

Определение уровня МСОАН с MitoSOX Red проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Маточный раствор MitoSOX Red (“Thermo Fischer”) в концентрации 5 мМ готовили путём растворения содержимого одной ампулы (50 мкг) в 13 мкл стерильного ДМСО (“Sigma-Aldrich”) и хранили не более 1 месяца при -20°C. Рабочий раствор MitoSOX Red в ФСБ (5 мкМ) готовили непосредственно перед использованием. Клетки дважды промывали ФСБ и инкубировали в рабочем растворе в течение 10 мин в стандартных условиях. По окончании инкубации клетки дважды промывали ФСБ с 2% БСА и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (“BD Biosciences”).

Исследование клеточного цикла проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. После инкубации с препаратами клетки собирали, промывали ФСБ, фиксировали 70% этанолом (1 млн клеток/мл этанола) при +4°C в течение 1-2 ч и хранили до исследования при -20°C. Фиксированные клетки осаждали центрифугированием при 400 g, промывали 1 раз ФСБ перед использованием. Осадок ресуспендировали в растворе для окрашивания ДНК (ФСБ, pH 7,4, содержащий 0,1% Тритон X-100, 0,1 мМ ЭДТА, 0,05 мг/мл рибонуклеазы А

(“Sigma-Aldrich”), 50 мкг/мл йодистого пропидия (“Sigma-Aldrich”) с концентрацией 1 млн клеток/мл раствора и инкубировали 1-1,5 ч при комнатной температуре. Исходный раствор рибонуклеазы А предварительно кипятили на водяной бане в течение 10 мин, чтобы избавиться от возможной примеси дезоксирибонуклеаз. Анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur (“BD Biosciences”) при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 620-700 нм. Анализ клеточного цикла проводили в соответствии с рекомендациями фирмы Becton Dickinson с использованием программы CellQuestPro (“BDIS”, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы OriginPro (“OriginLab”, США), используя t-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

В работе использованы приборы ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии: Agilent 1100, Coulter N4MD, BD FACSCalibur.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ПФН была получена на основе PLGA 50/50 и охарактеризована по таким показателям как содержание никлозамида и средний размер полимерных частиц (табл. 1). Доля никлозамида в составе полимерных частиц составляла  $5,2 \pm 0,4\%$ , а их размер –  $240,9 \pm 3,1$  нм. Ранее нами была показана значительно более высокая цитотоксическая активность (ЦТА) никлозамида в отношении опухолевых клеток человека различных типов, в том числе клеток колоректального рака, чем в отношении нормальных клеток человека [15]. На рисунке 1А-Г представлена зависимость выживаемости клеток трёх линий колоректального рака и линии нормальных клеток человека – ЛЭЧ – от концентрации никлозамида в свободном виде и в виде ПФН. Средние значения  $IC_{50}$  никлозамида и ПФН для изученных линий приведены в таблице 2.

Таблица 1. Характеристика препарата ПФН

Состав препарата ПФН		Размер частиц, нм
Вещество	Содержание, %	
Никлозамид	$5,2 \pm 0,4$	240,9±3,1
PLGA 50/50	$35,1 \pm 2,0$	
EUDRAGIT RS PO	$24,3 \pm 1,1$	
ПВС	$29,0 \pm 1,5$	
D-маннитол	$6,4 \pm 0,3$	

Таблица 2. Цитотоксическая активность никлозамида и ПФН в отношении клеток колоректального рака и нормальных клеток человека, оцениваемая по значению  $IC_{50}$

Линия клеток	$IC_{50}$ , мкМ	
	Никлозамид	ПФН
Аденокарцинома прямой кишки линия SW837	$2,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1^*$
Аденокарцинома ободочной кишки линия Caco-2	$1,0 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1^*$
Карцинома сигмовидной кишки линия COLO 320 HSR	$2,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1^*$
Лёгочные эмбриональные фибробласты человека ЛЭЧ	$20,0 \pm 0,6^{\#}$	$>60,0^{\#}$

Примечание. Данные представлены в виде средней величины  $\pm$  ошибка среднего; \* - отличия достоверны по сравнению с никлозамидом ( $p < 0,05$ ); # - отличия достоверны по сравнению с опухолевыми клетками ( $p < 0,05$ ).

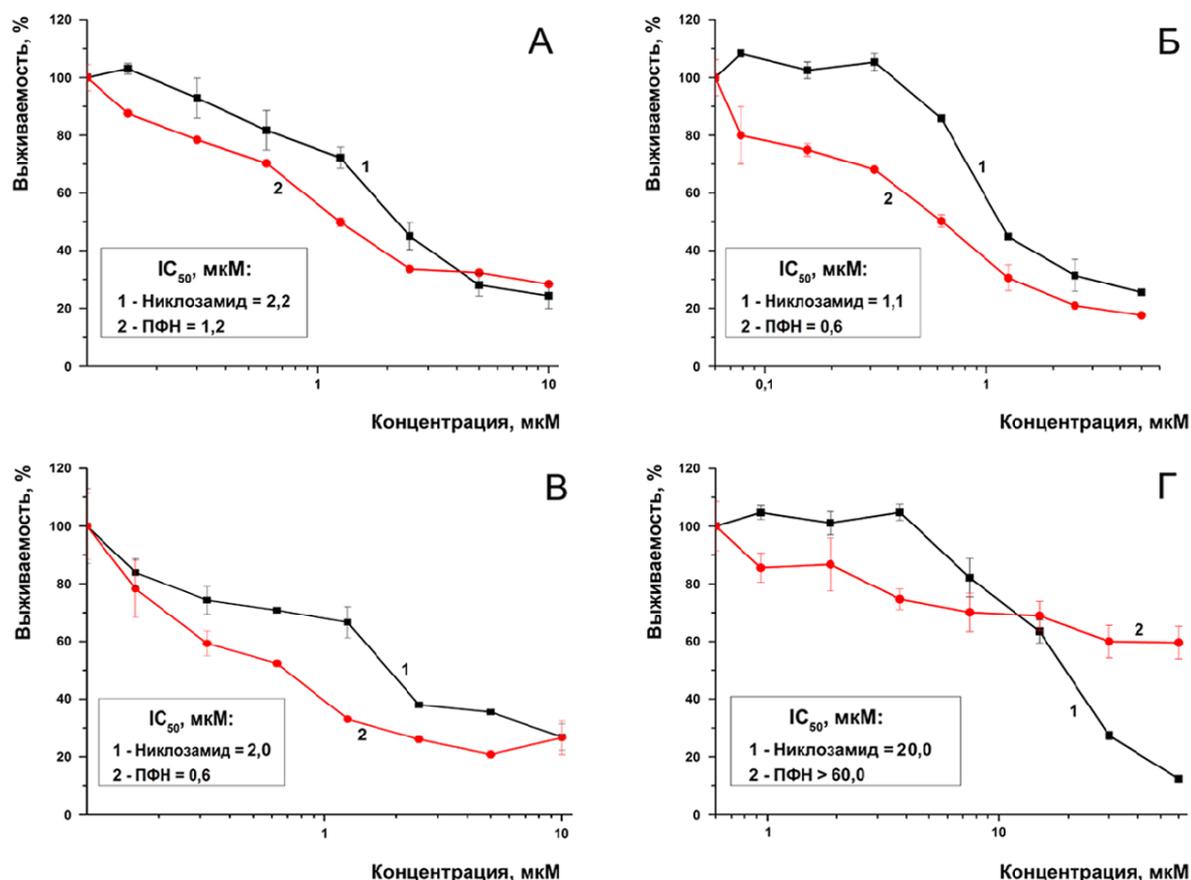
Обнаружено, что в отношении опухолевых клеток ПФН более активна, чем свободный никлозамид (рис. 1А-В, табл. 2). В то же время нормальные клетки человека (ЛЭЧ) (рис. 1Г, табл. 2) были намного менее чувствительны, чем опухолевые как к действию никлозамида (что было показано ранее [15]), так и к действию ПФН. Полимерные наночастицы, не содержащие никлозамид (“пустые частицы”), практически не влияли на выживаемость клеток в диапазоне концентраций, соответствующих диапазону используемых концентраций ПФН: выживаемость клеток при концентрации “пустых частиц”, равной даже 10 мкМ по никлозамиду, составляла не менее  $85,2 \pm 8,4\%$  от контроля.

Известно, что накопление витального флуоресцентного красителя Rho-123 в митохондриях происходит в результате взаимодействия с их внутренней мембраной, и при повреждении митохондрий оно снижается [16]. После культивирования клеток колоректального рака различных линий в присутствии никлозамида обнаружено (рис. 2А), что через 1 ч и 4 ч наблюдается умеренное (линии SW837 и Caco-2) или значительное (линия COLO 320 HSR) снижение накопления Rho-123. Через 24 ч культивирования клеток в присутствии никлозамида происходило полное (линии SW837 и Caco-2) или только частичное (линия COLO 320 HSR) восстановление накопления красителя в клетках (рис. 2А). Инкубация клеток с ПФН в равной с никлозамидом концентрации приводила к более глубокому снижению накопления Rho-123 через 1 ч и 4 ч, а восстановление способности клеток накапливать краситель через 24 ч культивирования в присутствии ПФН было неполным у клеток линий SW837 и Caco-2 и полностью отсутствовало у клеток линии COLO 320 HSR (рис. 2Б). Таким образом, ПФН оказывает близкое по степени или даже более сильное повреждающее действие на митохондрии опухолевых клеток в сравнении с никлозамидом, что может быть связано с проникновением частиц через клеточную мембрану и созданием более высокой внутриклеточной концентрации никлозамида, благодаря его высвобождению в цитоплазме клеток.

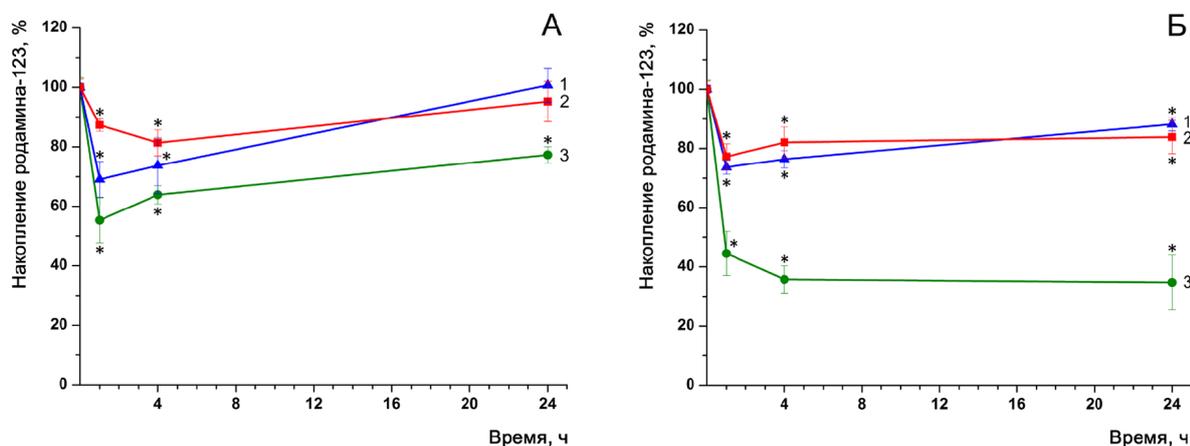
Наиболее глубокое повреждение митохондрий, регистрируемое по снижению накопления Rho-123, при действии препаратов обнаружено в клетках карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR.

Известно, что действие никлозамида может приводить к развитию окислительного стресса в клетках и повышению уровня АФК, в том числе МСОАН [4].

## ДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ НИКЛОЗАМИДА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ



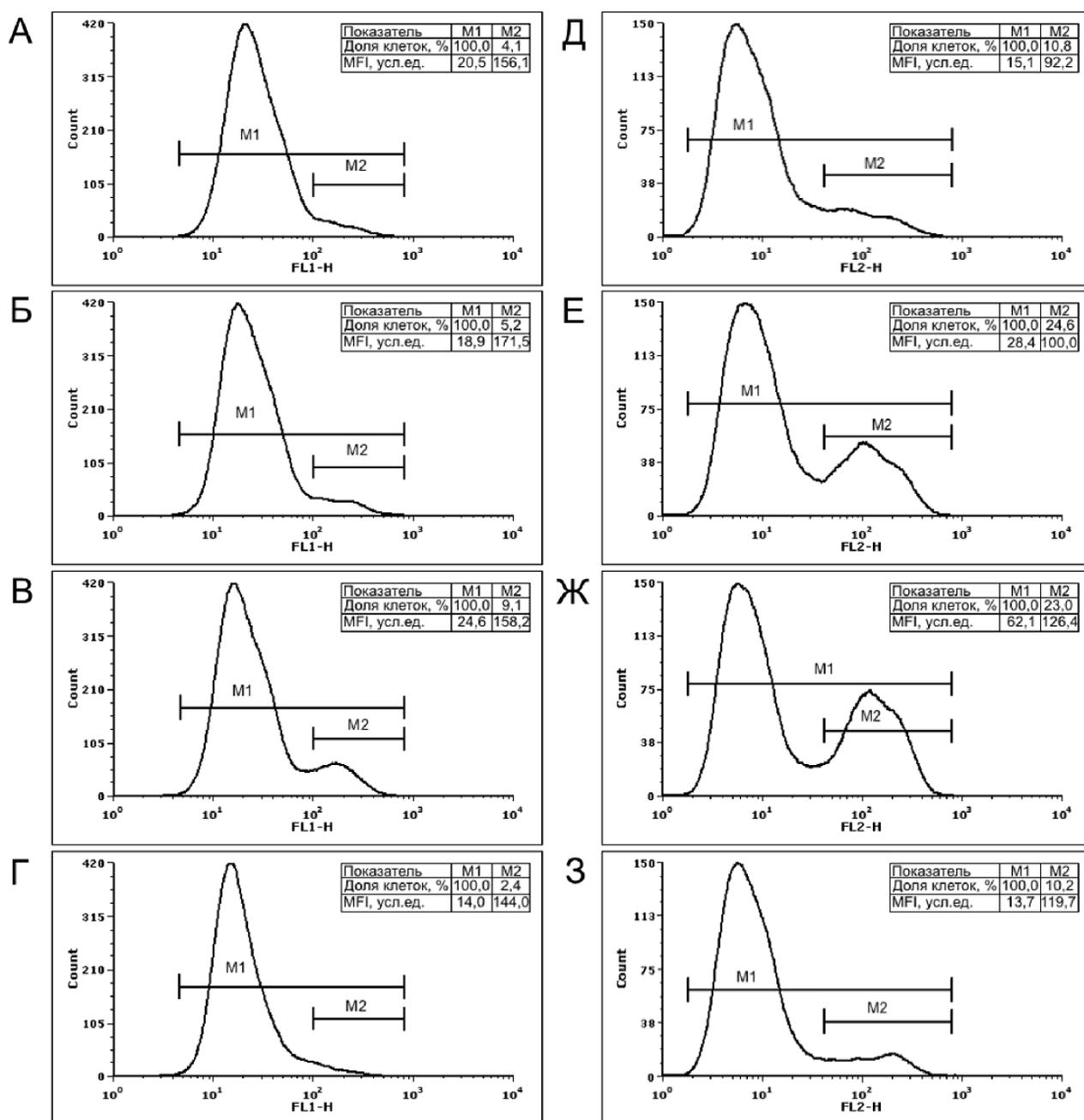
**Рисунок 1.** Влияние никлозамида (1) и ПФН (2) на выживаемость клеток аденокарциномы прямой кишки линии SW837 (А), аденокарциномы ободочной кишки линии Сасо-2 (Б), карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR (В) и лёгочных эмбриональных фибробластов человека (Г).



**Рисунок 2.** Динамика изменения уровня накопления флуоресцентного красителя родамина-123 в клетках аденокарциномы прямой кишки линии SW837 (1), аденокарциномы ободочной кишки линии Сасо-2 (2) и карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR (3) после инкубации клеток с никлозамидом (А) и с ПФН (Б) в концентрации 1 мкМ. \* - отличия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05).

Влияние ПФН в сравнении с никлозамидом на уровень этих метаболитов исследовали на клетках линии COLO 320 HSR. Полученные результаты представлены на рисунке 3. Показано, что при определении общего количества АФК по уровню накопления красителя carboxy-H2DCFDA, увеличение средней интенсивности флуоресценции (MFI) всей популяции клеток (M1) обнаружено только при действии ПФН (рис. 3А-Г).

При определении же содержания МСОАН по уровню накопления красителя MitoSOX Red, увеличение MFI всей популяции клеток (M1) обнаружено как при действии никлозамида – до 28,4 усл. ед., так и при действии ПФН – до 62,1 усл. ед. при значении MFI для контрольных клеток и клеток, инкубированных с пустыми частицами, 15,1 и 13,7 усл. ед. соответственно (рис. 3Д-З).



**Рисунок 3.** Изменение общего уровня АФК, оцениваемого по накоплению флуоресцентного красителя carboxy-H2DCFDA (А-Г), и уровня МСОАН, оцениваемого по накоплению флуоресцентного красителя MitoSOX Red (Д-З), в клетках линии COLO 320 HSR после инкубации в течение 1 ч с никлзамидом, ПФН и “пустыми частицами”. А, Д - контрольные клетки; Б, Е - клетки после инкубации с никлзамидом (1 мкМ), В, Ж - после инкубации с ПФН (1 мкМ), Г, З - после инкубации с “пустыми частицами”. M1 - вся популяция клеток, M2 - фракция клеток, интенсивно накапливающих красители, указана доля этих клеток в процентах и их средняя интенсивность флуоресценции - MFI, усл. ед. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

Следует отметить, что клетки линии COLO 320 HSR гетерогенны по уровню накопления красителей carboxy-H2DCFDA и MitoSOX Red и содержат небольшую популяцию M2 более интенсивно окрашенных клеток, которая составила для этих красителей 4,1 и 10,8% соответственно (рис. 3А, 3Д). При инкубации клеток с исследуемыми препаратами в течение 1 ч обнаружено увеличение этой фракции клеток с высоким уровнем АФК с 4,1% до 5,2 и 9,1% при действии никлзамидом и ПФН соответственно

при использовании красителя carboxy-H2DCFDA (рис. 3Б, 3В), и она не увеличивалась при действии “пустых частиц” (рис. 3Г). Значение MFI фракции клеток M2 в контроле составило 156,1 усл. ед. и было более высоким – 171,5 усл. ед. – при действии никлзамидом. Действие “пустых частиц” не приводило к увеличению размера фракции M2, а накопление красителя carboxy-H2DCFDA в клетках этой фракции составило 144,0 усл. ед. (рис. 3Г), и оно возросло до 158,2 усл. ед. при действии ПФН.

## ДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕРНОЙ ФОРМЫ НИКЛОЗАМИДА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

При действии никлозамида и ПФН увеличение фракции клеток M2 с высоким уровнем образования МСОАН, регистрируемым по накоплению красителя MitoSOX Red, было аналогичным (рис. 3Е, 3Ж) – оно возрастало с 10,8 до 24,6% при действии никлозамида и до 23,0% при действии ПФН. Значение MFI фракции клеток M2 в контроле составило 92,2 усл. ед. и было более высоким – 126,4 усл. ед. – при действии ПФН, чем при действии никлозамида – 100,0 усл. ед. Действие “пустых частиц” не приводило к увеличению размера фракции M2, но накопление красителя MitoSOX Red в клетках этой фракции возрастало до 119,7 усл. ед. (рис. 33).

Таким образом, при действии ПФН обнаружен более высокий, чем при действии никлозамида, уровень образования и общего количества АФК и МСОАН уже при относительно невысокой концентрации препаратов, равной 1 мкМ.

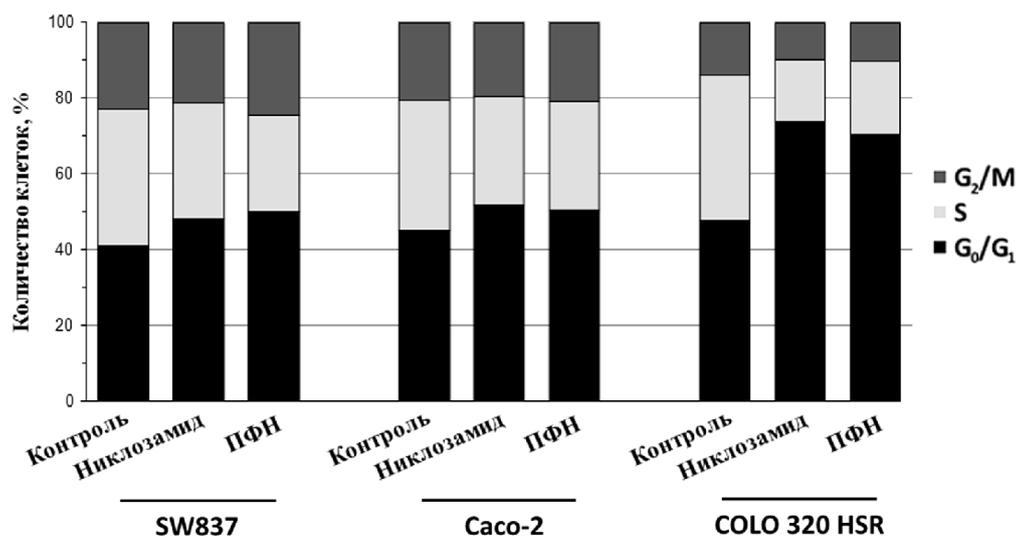
Повышение уровня АФК, обнаруженное в опухолевых клетках при действии никлозамида и ПФН, может приводить к появлению повреждений ДНК клеток, что в свою очередь вызовет нарушения в прохождении клеточного цикла. Действительно, при анализе клеточного цикла клеток всех исследованных линий колоректального рака через 24 ч после внесения препаратов в культуральную среду в концентрации 1 мкМ было обнаружено увеличение доли клеток, находящихся в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе. Наиболее глубокие нарушения клеточного цикла, также как и снижение накопления родамина-123, обнаружены в клетках карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR. В этих клетках доля клеток в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе возросла с 48% в контроле до 74 и 71% при действии свободного никлозамида и ПФН соответственно, а доля клеток в S-фазе клеточного цикла снижалась с 39% в контроле до 17 и 19% соответственно (рис. 4). Таким образом, действие и никлозамида, и ПФН уже при этой невысокой концентрации приводит к блоку клеточного цикла в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При исследовании чувствительности культивируемых клеток колоректального рака человека – клеток аденокарциномы прямой кишки линии SW837, аденокарциномы ободочной кишки линии Caco-2 и карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR – показано, что ПФН обладает более высокой ЦТА в отношении исследуемых опухолевых клеток по сравнению с никлозамидом (рис. 1, табл. 2). В то же время нормальные клетки – лёгочные эмбриональные фибробласты человека – оказались значительно менее чувствительными к действию и никлозамида, и ПФН, чем клетки колоректального рака.

Обнаруженное снижение накопления опухолевыми клетками красителя Rho-123 при инкубации с никлозамидом свидетельствует о повреждении их митохондрий, которое было сравнимым или более сильным и продолжительным при применении ПФН. Повреждение митохондрий, как правило, сопровождается усиленным образованием АФК. Действительно, и при действии никлозамида, и при действии ПФН обнаружено повышение АФК в клетках карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR, более интенсивное при культивировании клеток в присутствии ПФН. Обнаруженный через 24 ч после действия никлозамида и ПФН блок клеточного цикла может, при отсутствии процессов репарации, приводить к гибели клеток в более поздние сроки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что никлозамид и в виде ПФН, и в свободной форме вызывает повреждение митохондрий клеток разных линий колоректального рака человека, которое сопровождается накоплением АФК и в том числе МСОАН. Окислительный стресс приводит к повреждению чувствительных к действию АФК внутриклеточных мишеней и блоку клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Все обнаруженные изменения



**Рисунок 4.** Гистограммы распределения клеток аденокарциномы прямой кишки линии SW837, аденокарциномы ободочной кишки линии Caco-2 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR по фазам клеточного цикла через 24 ч культивирования в присутствии никлозамида и ПФН в концентрации 1 мкМ.

были более интенсивными при использовании ПФН, что, по-видимому, связано с транспортом частиц ПФН внутрь клеток и последующим высвобождением никлозамида непосредственно в цитоплазме.

*Выводы:*

1. Получена и охарактеризована полимерная форма никлозамида на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA).

2. Показано, что ПФН обладает более высокой ЦТА, чем свободный никлозамид, в отношении клеток колоректального рака человека линий SW837, Caco-2 и COLO 320 HSR, но она менее токсична в отношении лёгочных эмбриональных фибробластов – нормальных клеток человека.

3. ПФН, также как и свободный никлозамид, вызывает повреждение митохондрий в клетках колоректального рака, регистрируемое по снижению накопления родамина-123.

4. Повреждение митохондрий клеток карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR при действии никлозамида и ПФН сопровождается повышением общего уровня АФК и МСОАН.

5. Действие и никлозамида, и ПФН на клетки колоректального рака человека линий SW837, Caco-2 и COLO 320 HSR приводит к блоку клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

6. Молекулярный механизм противоопухолевого действия ПФН и свободного никлозамида одинаков и связан с развитием окислительного стресса, вызванного повреждением митохондрий.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии № 14.604.21.0072 по проекту: “Разработка технологии получения полимерных форм препаратов для лечения онкологических заболеваний” в рамках реализации ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России

на 2014-2020 годы”. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0072.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Wen S., Zhu D., Huang P. (2013) *Future Med. Chem.*, **5**, 53-67.
2. Москалева Е.Ю., Перевозчикова В.Г., Жирник А.С., Северин С.Е. (2015) *Биомед. химия*, **61**, 680-693. DOI: 10.18097/pbmc20156106680.
3. Jin Y., Lu Z., Ding K., Li J., Du X., Chen C., Sun X., Wu Y., Zhou J., Pan J. (2010) *Cancer Res.*, **70**(6), 2516-2527.
4. Khanim F.L., Merrick B.A., Giles H.V., Jankute M., Jackson J.B., Giles L.J., Birtwistle J., Bunce C.M., Drayson M.T. (2011) *Blood Cancer J.*, **1**(10), e39.
5. Zhao J., He Q., Gong Z., Chen S., Cui L. (2016) *SpringerPlus*, **5**(1), 1436.
6. Ye Y., Zhang X., Zhang T., Wang H., Wu B. (2015) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **41**(9), 1416-1424.
7. Lin C.K., Bai M.Y., Hu T.M., Wang Y.C., Chao T.K., Weng S.J., Huang R.L., Su P.H., Lai H.C. (2016) *Oncotarget*, **7**(8), 8993-9006.
8. Kumar S.U., Gopinath P. (2015) *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **131**, 170-181.
9. Misra S.K., Jensen T.W., Pan D. (2015) *Nanoscale*, **7**(16), 7127-7132.
10. Ostadhossein F., Misra S.K., Mukherjee P., Ostadhossein A., Daza E., Tiwari S., Mittal S., Gryka M.C., Bhargava R., Pan D. (2016) *Small*, DOI:10.1002/sml.201601161.
11. Russo A., Pelloso D.S., Pagliara V., Milone M.R., Pucci B., Caetano W., Hioka N., Budillon A., Ungaro F., Russo G., Quaglia F. (2016) *Int. J. Pharm.*, **511**(1), 127-139.
12. Кузнецова И.Г., Северин С.Е. (2013) Разработка и регистрация лекарственных средств, **5**(5), 30-36.
13. Lu J.M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P.H., Yao Q., Chen C. (2009) *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **9**(4), 325-341.
14. Mosmann T. (1983) *J. Immunol. Methods*, **65**(1-2), 55-63.
15. Жирник А.С., Семочкина Ю.П., Москалева Е.Ю., Перевозчикова В.Г., Родина А.В., Северин С.Е. (2016) *Хим.-фарм. ж.*, **50**(7), 40-43.
16. Kim M., Cooper D.D., Hayes S.F., Spangrude G.J. (1998) *Blood*, **91**(11), 4106-4117.

Поступила: 21. 10. 2016.  
Принята к печати: 31. 03. 2017.

**ANTINEOPLASTIC MECHANISMS OF NICLOSAMIDE-LOADED NANOPARTICLES IN HUMAN COLORECTAL CANCER CELLS**

*A.S. Zhirnik, Y.P. Semochkina, E.Yu. Moskaleva, N.I. Krylov, I.A. Tubasheva, S.L. Kuznetsov, E.A. Vorontsov*

National Research Centre “Kurchatov Institute”, NBICS Centre,  
1 Akad. Kurchatova sq., Moscow, 123182 Russia; e-mail: as.zhirnik@mail.ru

Using poly(lactic-co-glycolic) acid we developed a polymeric form of niclosamide (PFN) and investigated molecular mechanisms underlying its antitumor activity against human colorectal cancer cell lines (SW837, Caco-2, COLO 320 HSR). PFN was shown to be more cytotoxic against cancer cells and less cytotoxic against normal cells (human embryonic lung fibroblasts) as compared to niclosamide. Both niclosamide and its polymeric form caused mitochondrial damage (evaluated as a decrease in rhodamine 123 accumulation) and increased the levels of reactive oxygen species, particularly mitochondrial superoxide, resulting in the oxidative damage to biomolecules. Furthermore, niclosamide and PFN induced G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest.

**Key words:** niclosamide, polymeric form of niclosamide, poly(lactic-co-glycolic) acid, reactive oxygen species, cell cycle, colorectal cancer