

УДК 577.2:615.27

©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НИКЛОЗАМИДА

Е.Ю. Москалева*, В.Г. Перевозчикова, А.С. Жирник, С.Е. Северин

НИЦ Курчатовский институт, НБИКС-центр,
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1; тел.: +7 (499)1969539; факс: +7(499)1961704;
эл. почта: nrcki@nrcki.ru; moskalevaey@mail.ru

Представлены данные о противоопухолевой активности никлозамида и о молекулярных механизмах его противоопухолевой активности. Ранее никлозамид использовался для лечения кишечных паразитарных инфекций. В последние годы при скрининге различных лекарственных препаратов и химических соединений, направленном на выявление веществ с высокой противоопухолевой активностью, было обнаружено, что никлозамид обладает такой активностью. Он не только ингибирует сигнальные пути Wnt/ β -катенин, mTORC1, Stat3, NF- κ B и Notch, но также повреждает митохондрии в опухолевых клетках, вызывает ингибирование пролиферации и апоптоз. Эффективность этого препарата продемонстрирована как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* в моделях с использованием ксенотрансплантации опухолей человека иммунодефицитным мышам. Никлозамид активен не только в отношении опухолевых клеток, но и опухолевых стволовых клеток. Нормальные клетки устойчивы к действию никлозамида. Накопленные экспериментальные данные позволяют считать никлозамид перспективным препаратом для лечения различных типов рака.

Ключевые слова: никлозамид, противоопухолевые препараты, сигнальные пути, повреждение митохондрий, опухолевые стволовые клетки

DOI: 10.18097/PBMC20156106680

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время поиск новых противоопухолевых препаратов часто осуществляется путём скрининга большого количества как новых соединений, так и уже известных ранее лекарственных средств с разной терапевтической активностью. Одним из таких новых препаратов, судя по последним данным, стал никлозамид – лекарственный препарат, использовавшийся на протяжении 50 лет как противоглистное средство при лечении тениоза и для обеззараживания воды в зонах с высокой зараженностью шистосомами. Его противоопухолевая активность была обнаружена в нескольких скрининговых исследованиях, проводившихся в последние годы, и привлекла большое внимание исследователей из различных научных центров. Создание современных противоопухолевых препаратов и новых методов лечения опухолей направлены не только на обеспечение эффективной элиминации основной массы опухолевых клеток, но, в значительно большей степени, на удаление опухолевых стволовых клеток (ОСК) при максимальном сохранении нормальных стволовых клеток (СК) и клеток критических органов. Появившиеся недавно

публикации свидетельствуют о том, что никлозамид не повреждает нормальные ткани, но обладает активностью как в отношении опухолевых клеток, так и ОСК. Анализ новых данных, касающихся изучения противоопухолевой активности этого препарата и молекулярных механизмов его действия, посвящён настоящий обзор.

1. НИКЛОЗАМИД И ЕГО СВОЙСТВА

Никлозамид (систематическое название: 5-хлор-N-(2-хлор-4-нитрофенил)-2-оксibenзамид, рис. 1) хорошо известен, как противоглистное средство, принимаемое перорально в виде таблеток. В России известен под названием фенасал [1]. Показано, что никлозамид является разобщителем дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях ленточных гельминтов [2], улиток [3] и опухолевых клеток [4].

Фармакокинетика никлозамида была изучена на крысах при его внутривенном (в дозе 2 мг/кг) и пероральном (в дозе 5 мг/кг) введении [5]. Поскольку никлозамид плохо растворим в воде, для введения животным его растворяли в смеси растворителей

* - адресат для переписки

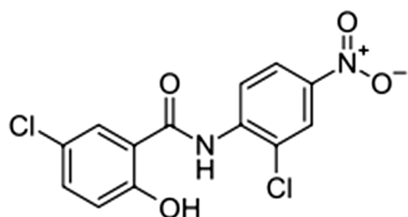


Рисунок 1. Структурная формула никлозамида.

следующего состава: диметилсульфоксид (ДМСО) /кремофор EL/вода в соотношении 3/15/82 по объёму. В этих условиях приготовления получали истинный раствор никлозамида, что имеет большое значение, так как растворимость никлозамида в воде очень низка (особенно в кислой среде, несколько возрастает в щелочных условиях). Биодоступность никлозамида при пероральном введении составила 10%, что коррелирует с его биодоступностью у человека. При изучении острой токсичности никлозамида было показано, что значение LD_{50} для крыс при пероральном введении было выше 5000 мг/кг, а при изучении его подострой токсичности при введении в дозе 2000 мг/кг/день в течение 4 недель проявлений токсичности не наблюдали [5]. Хорошая переносимость указанных высоких доз свидетельствует о хорошем терапевтическом индексе и широких границах безопасного диапазона концентраций никлозамида.

Согласно литературным данным, мишенью противоопухолевого действия никлозамида являются сигнальные пути Wnt, NF- κ B, Stat3, Notch, и mTORC1, которые играют важную роль в СК и ОСК [6]. Действие никлозамида на опухолевые клетки различных типов анализируется ниже.

2. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НИКЛОЗАМИДА И ЕЕ МЕХАНИЗМЫ

2.1. Миелобластный лейкоз

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) является наиболее часто встречающимся типом злокачественных гематологических заболеваний, а ведущим методом его лечения является химиотерапия. За последние десятилетия в этой области не было достигнуто значительных успехов, и основными используемыми препаратами остаются цитарабин (Ara-C), этопозид (VP-16), и даунорубин (DNR) [7]. Поэтому поиск новых более эффективных препаратов для лечения ОМЛ продолжается.

ОСК с фенотипом $CD34^+CD38^-$ играют центральную роль в патогенезе, развитии и рецидивировании острого лейкоза [8]. При ОМЛ клетки $CD34^+$ активно экспрессируют ядерный фактор NF- κ B, в то время как в нормальных нестимулированных $CD34^+$ клетках человека его экспрессия не обнаружена. Важно отметить, что в активной форме NF- κ B обладает антиапоптотической активностью, и для некоторых типов рака он считается ключевым фактором выживания опухолевых клеток. Это позволило

рассматривать фактор NF- κ B в качестве одной из перспективных мишеней для избирательной элиминации ОСК при лейкозах [9].

При изучении действия никлозамида на лейкозные клетки обнаружено два независимых механизма: торможение формирования активного NF- κ B и образование активных метаболитов кислорода (АМК) [10]. Этот препарат ингибировал пролиферацию клеток различных линий лейкоза человека *in vitro* и *in vivo* в экспериментах с использованием модели ксенотрансплантации перевиваемых опухолей человека иммунодефицитным мышам nude. Водорастворимый аналог (фосфониклозамид [6]) вводили внутривенно в суточной дозе 40 мг/кг в течение 15 дней; это приводило к ингибированию роста опухоли HL-60 и снижению уровня NF- κ B. В клетках различных линий миелолейкоза никлозамид избирательно индуцировал апоптоз; значение IC_{50} для разных линий находилось в пределах 0,4-0,9 мкМ при определении выживаемости клеток с использованием МТТ-теста, и в пределах 60-75 нМ при анализе клоногенной активности. В случае первичных бластных клеток, стволовых и ранних прогениторных клеток больных ОМЛ значение IC_{50} для разных больных находилось в пределах 8,5-718 нМ при определении выживаемости клеток с использованием МТТ-теста. Нормальные клетки были устойчивы к никлозамиду. В лейкозных клетках линии HL-60 действие никлозамида приводило к снижению уровня антиапоптотических факторов MCL-1 и XIAP и повышению уровня цитохрома c в цитоплазме, а также к деполаризации мембраны митохондрий.

При совместном использовании никлозамида и классических химиотерапевтических препаратов обнаружен его синергизм с Ara-C, VP-16 и DNR. При пероральном введении никлозамида крысам (5 мг/кг) максимальная концентрация в плазме составила около 1 мкМ [5, 10]. Эта концентрация, как следует из приведенных выше данных, достаточна для гибели лейкозных клеток. Полученные в этих исследованиях результаты позволяют заключить, что никлозамид является эффективным препаратом не только для избирательной элиминации опухолевых клеток, но и опухолевых стволовых клеток миелолейкоза с фенотипом $CD34^+CD38^-$.

2.2. Эритролейкоз

В опухолях человека разных типов часто обнаруживают нарушения трансдукции сигнала Notch [11].

У млекопитающих известна экспрессия 4-х генов лигандов Notch (NOTCH 1-4). После связывания лиганда (Delta или Serrate), с рецептором Notch на поверхности клетки происходит высвобождение внутриклеточной части рецептора (Notch-IC) и его транслокация в ядро, где Notch-IC изменяет функцию ДНК-связывающего фактора транскрипции RBP-J, связываясь с ним и рядом других белков (рис. 2). В результате фактор RBP-J преобразуется из репрессора в активатор транскрипции

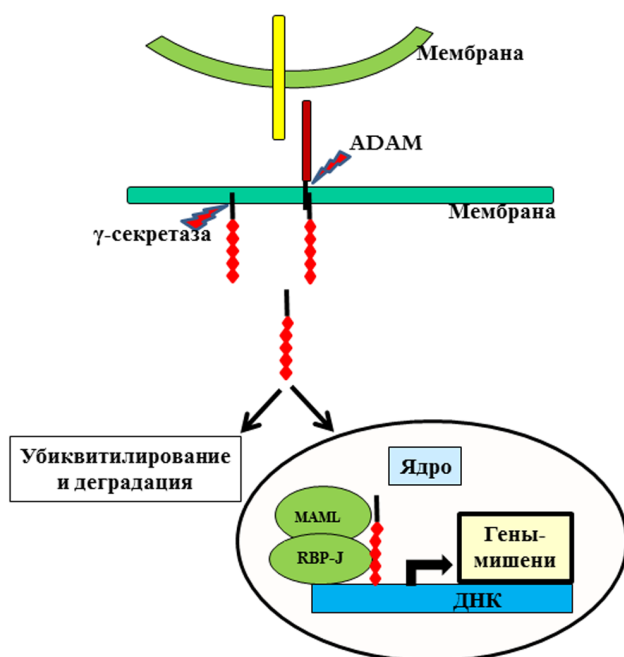


Рисунок 2. Сигнальный путь Notch (адаптировано из [12, 13]). Лиганды и рецепторы Notch - трансмембранные белки, которые локализуются на поверхности клеток, расположенных рядом друг с другом. Рецепторы Notch - гетеродимеры с одним трансмембранным доменом. Экстраклеточные домены рецептора связывают специфические лиганды, представленные на поверхности соседних клеток, а цитоплазматические домены участвуют в формировании сигнала, передаваемого в ядро клетки. При связывании с лигандом рецептор Notch разрезается металлопротеиназами ADAM10 и ADAM1 и γ -секретазой в области трансмембранного домена. Внутриклеточный домен транслируется в ядро, где он связывается с фактором транскрипции RBP-J и другими белками и активирует соответствующие гены-мишени, или убиквитилируется и подвергается протеасомной деградации.

генов-мишеней Notch. Notch-IC чрезвычайно трудно обнаружить в нормальных клетках, хотя даже в очень небольших количествах он вызывает биологические эффекты [12, 13].

В основе стимуляции роста опухолей при активации сигнального пути Notch лежит повышение экспрессии лигандов и рецепторов Notch и активация других сигнальных путей, стимулирующих рост опухолевых клеток [11].

Для скрининга препаратов, способных регулировать активность сигнального пути Notch, была создана репортерная система, основанная на использовании люциферазы. С помощью этой системы в клетках эритролейкоза линии K562 было обнаружено пропорциональное дозе и времени подавление активности Notch-зависимого репортерного гена при действии никлозамидом, что позволило авторам сделать заключение об участии этого препарата в регуляции активности сигнального пути Notch [14].

2.3. Множественная миелома

Множественная миелома (генерализованная плазмочитома) – злокачественная опухоль из плазматических клеток (дифференцированных В-лимфоцитов, продуцирующих антитела). Это заболевание системы крови относится к парапротеинемическим лейкозам. Своё название заболевание и опухолевая клетка получили в связи с преимущественной локализацией процесса в костном мозге. Наиболее часто поражаются зоны костного мозга в позвоночнике и костях таза, а также в рёбрах и черепе [15]. Множественная миелома – злокачественное заболевание, которое характеризуется присутствием в костном мозге около 10% опухолевых плазматических клеток, накоплением моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке крови и моче, высокой частотой переломов, анемией и инфекциями, связанными с иммунологической недостаточностью. У большинства больных развивается почечная недостаточность [16]. Для поиска новых препаратов, которые были бы эффективны для лечения миеломной болезни, Khanim и соавт. провели скрининг более 100 известных препаратов с разной терапевтической специфичностью для выявления соединений, обладающих цитотоксической активностью в той концентрации, которая достигается в сыворотке крови при их клиническом применении, в отношении трёх линий клеток миеломы человека [17]. В результате такого скрининга высокая активность в отношении клеток миеломы была обнаружена у никлозамидом. В концентрации 1-4 мкМ он вызывал апоптоз и снижение образования свободных лёгких цепей иммуноглобулинов как в клетках различных линий миеломы, так и в клетках миеломы, полученных от больных, при их инкубации с препаратом *in vitro*.

Исследуя механизм действия никлозамидом, авторы показали, что он способен индуцировать образование АМК, в том числе, супероксидного аниона (СОК) в митохондриях клеток множественной миеломы человека [17].

Никлозамид индуцировал в митохондриях образование СОК, которое зависело как от концентрации препарата, так и от времени его инкубации с клетками. Во всех исследованных линиях клеток при концентрациях около 1 мкМ никлозамид индуцировал в митохондриях значительное увеличение количества СОК. Динамика увеличения СОК в клетках разных линий была разной. Так, в клетках линий JJN3 и H929 это увеличение продолжалось в течение 18 ч, тогда как в клетках линии U266, которая характеризуется низкой скоростью пролиферации, увеличение митохондриального СОК продолжалось значительно дольше.

При анализе уровня других АМК с помощью *carboxy-H₂DCFDA* значительного увеличения АМК ни при одной из используемых концентраций никлозамидом на протяжении всего эксперимента обнаружено не было. В этих экспериментах одновременно исследовали жизнеспособность клеток,

и была обнаружена обратная корреляция выживаемости клеток с образованием митохондриального СОКС. Из этого авторы заключили, что цитотоксическое действие никлозамида на клетки миеломы опосредовано избыточным образованием СОКС в митохондриях.

Разобщители окислительного фосфорилирования и дыхания нарушают сопряжение функционирования цепи переноса электронов и синтеза АТР [18]. Как правило, это происходит в результате увеличения проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов и уменьшения, вследствие этого, разности электрохимического потенциала. Никлозамид быстро, в течение 1 мин, приводит к снижению митохондриального мембранного потенциала и разобщению окислительного фосфорилирования и дыхания в клетках миеломы линии H929 и JJN3 [17]. Эти данные позволяют полагать, что основной мишенью действия никлозамида в клетках являются митохондрии. Снижение мембранного потенциала митохондрий приводит к увеличению образования АМК, уменьшению уровня АТР и высвобождению из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму таких проапоптотических факторов, как цитохром *c*, Smac и апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), что в конечном счёте приводит к каспазоопосредованному апоптозу [17].

В той же работе было показано, что существует и второй механизм действия никлозамида на клетки миеломы, связанный с ингибированием активации NF-κB и STAT3, который не зависит от увеличения уровня АМК [17].

2.4. Глиобластома

Глиобластома – самая злокачественная опухоль, которая развивается в головном мозге. Новообразование образуется из астроцитов, которые, в отличие от нейронов, способны к размножению. При нарушении регуляции этого процесса происходит их неконтролируемое деление и активный рост ткани. В результате скрининга препаратов по их противоопухолевой активности среди 160 соединений из библиотеки природных и токсических веществ в качестве кандидата для клинических исследований был отобран никлозамид [19]. Wieland и соавторами было показано, что никлозамид оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие, подавляет миграцию опухолевых клеток и снижает их злокачественный потенциал *in vivo* [19]. Механизм действия никлозамида на клетки глиобластом связан с ингибированием сигнальных каскадов WNT/β-катенин, NOTCH, mTOR и NF-κB. Обнаружено усиление действия темозоломида при его совместном использовании с никлозамидом. Авторы считают, что в ближайшем будущем никлозамид будет внедрён в клинику для лечения глиобластом [19].

2.5. Гепатома

Сигнальный путь Wnt (рис. 3) выполняет важную роль в эмбриогенезе и развитии злокачественных новообразований, включая гепатоканцерогенез [20, 21].

Белки Wnt, а их у млекопитающих 19, взаимодействуют со своим рецептором, получившим

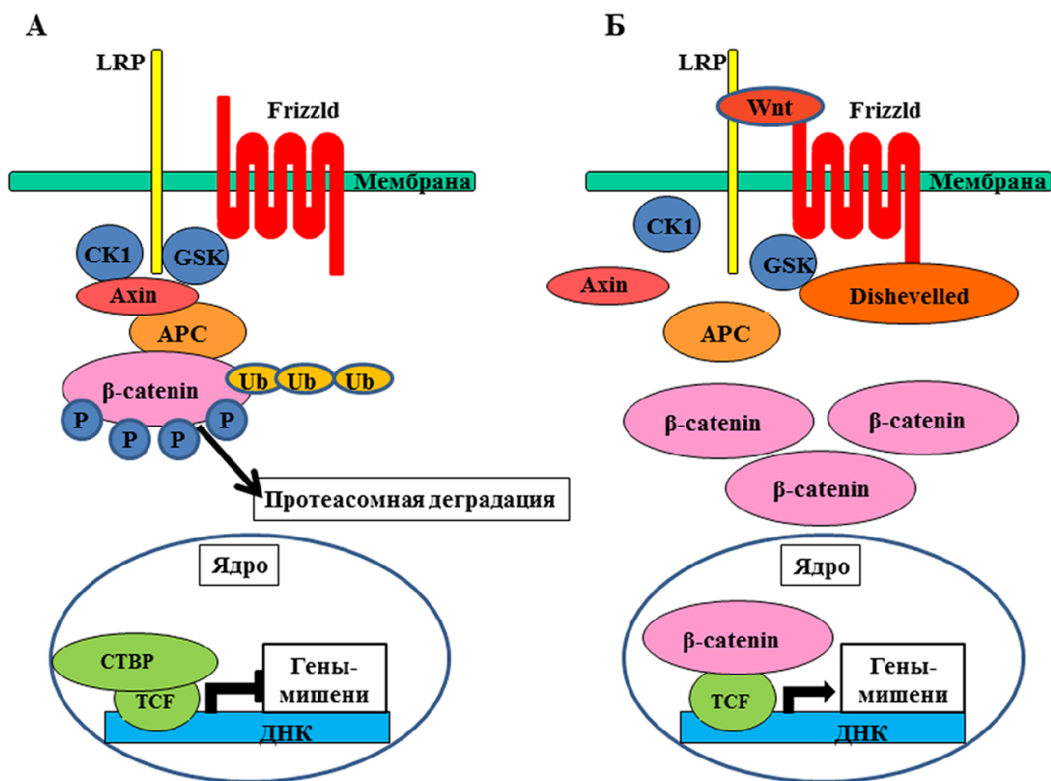


Рисунок 3. Сигнальный путь Wnt (адаптировано из [20, 21]). Пояснения в тексте.

название Frizzled, и ко-рецептором LRP 5/6 [22]. Frizzled – трансмембранный белок, пронизывающий мембрану клетки 7 раз, ко-рецептор LRP 5/6 – трансмембранные белки с одним трансмембранным доменом. При взаимодействии Wnt с рецептором происходит образование сложного рецепторного комплекса, что в свою очередь приводит к активации канонического сигнала-передающего пути β -катенин/TCF.

В отсутствие белков Wnt (рис. 3А) уровень β -катенина в цитоплазме поддерживается на очень низком уровне благодаря действию комплекса белков, которые его фосфорилируют и подготавливают тем самым к убиквитилированию и последующей деградации в протеасомах. В этот комплекс входят две регуляторные протеинкиназы – киназа гликогенсинтазы 3β (GSK- 3β) и казеинкиназа, и белки, связывающие β -катенин: Axin1 или Axin2 и белок аденоматозного полипоза кишечника APC (adenomatous polyposis coli). При связывании белка Wnt с рецептором происходит (рис. 3Б) разрушение комплекса белков, обеспечивающих деградацию β -катенина, что приводит к его накоплению в цитоплазме и транслокации в ядро, где он связывается с факторами транскрипции семейства TCF/LEF (Т-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор), и активирует экспрессию других, более отдаленных мишеней сигнального пути Wnt, включая циклины, С-мус и костные морфогенетические белки.

В передаче сигнала при связывании Wnt с рецептором участвует белок Dishevelled (Dvl). Он перемещается к мембране, взаимодействует с рецептором Frizzled, образует полимерный комплекс с другими молекулами Dishevelled. Фосфорилирование цитоплазматического домена ко-рецептора LRP5 или LRP6 и образование полимерного комплекса Dishevelled служит сигналом для транслокации белка Axin к плазматической мембране и инактивации комплекса, разрушающего β -катенин.

Активация сигнального пути, индуцируемого Wnt, обнаружена в опухолевых клетках различных типов. Мутации в белках дестабилизирующего комплекса также приводят к повышению уровня β -катенина и развитию рака [23, 24].

Tomizawa с соавт. оценивали эффект белка Wnt3A и никлозамида на пролиферацию клеток гепатомы линий Huh-6 и Hep3B [25]. Результаты проведенных исследований показали, что белок Wnt3A стимулирует пролиферацию клеток гепатом Huh-6 и Hep3B, увеличивает количество циклина D1, β -катенина, белка Dishevelled-2, повышает активность промотора Т-клеточного фактора. Полученные данные свидетельствуют о том, что регуляция пролиферации изученных гепатом осуществляется под контролем сигнального пути Wnt. При действии никлозамида в концентрации 1 мкМ обнаружено подавление как спонтанной пролиферации клеток Huh-6 и Hep3B, так и пролиферации клеток, стимулированной при действии Wnt3A [25]. Полученные результаты

свидетельствуют о способности никлозамида ингибировать пролиферацию клеток гепатом путём подавления сигнального пути Wnt.

2.6. Рак предстательной железы

Рак предстательной железы (РПЖ) – злокачественное новообразование, возникающее из эпителия альвеолярно-клеточных элементов предстательной железы, которое встречается с высокой частотой – в России наблюдается около 14000 новых случаев заболеваний в год [26]. РПЖ является причиной почти 10% смертей от рака у мужчин. Показано, что никлозамид ингибирует пролиферацию клеток РПЖ *in vitro* и рост опухолей в экспериментальных моделях *in vivo* [27].

В схеме лечения РПЖ важное место занимают антиандрогенные препараты.

Энзалутамид – антиандрогенный препарат второго поколения. Он используется для лечения резистентных форм рака РПЖ у пациентов, которые не отвечают на доцетаксел ((2R,3S)-N-Карбокси-3-фенилизосерин-N-трет-бутил-13-5 β ,20-эпоксид-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -гексагидрокситакс-11-ен-9-он-4-ацетат-2-бензоата тригидрат, полусинтетическое противоопухолевое средство растительного происхождения, получаемое путём химического синтеза из природного сырья – игл тиса европейского; используется для лечения онкологических заболеваний разных типов, в том числе для лечения метастатического РПЖ). При этом часто и к энзалутамиду развивалась устойчивость, которая была связана с присутствием сплайсингового варианта рецептора андрогенов AR-V7. В процессе скрининга около 1120 препаратов было обнаружено, что никлозамид является мощным ингибитором активности AR-V7, так как вызывает снижение количества этого белка из-за его усиленной протеасомной деградации и ингибирования транскрипции [27]. При совместном действии никлозамида и энзалутамида опухолевые клетки теряли устойчивость к энзалутамиду [27].

Таким образом, никлозамид является ингибитором сплайсинговых вариантов рецептора андрогенов и может оказаться перспективным препаратом для лечения прогрессирующего РПЖ как в виде самостоятельного препарата, так и в комбинации с антиандрогенными препаратами, в том числе и в комбинации с энзалутамидом для преодоления устойчивости опухолевых клеток к этому препарату [27].

2.7. Рак толстой кишки

Рак толстой кишки является одной из самых частых причин смерти от рака во всём мире. Прогрессирование заболевания сопряжено с образованием метастазов. Выживаемость пациентов с неметастазирующей опухолью на 1 стадии составляет 90% в течение 5 лет, и только 10%, когда на момент постановки диагноза обнаруживаются отдалённые метастазы [30]. Поэтому продолжается

активный поиск препаратов для лечения этого заболевания и прилагаются значительные усилия для изучения молекулярных механизмов, регулирующих гены-мишени, способствующие образованию метастазов.

Osada с соавт. [31] изучали действие никлозамида на пролиферацию опухолевых клеток ободочной и прямой кишки (линии клеток HT29, HCT116, Caco-2) и показали, что никлозамид ингибирует сигнальный путь Wnt, который активирован примерно в 80% случаев рака толстой кишки из-за наличия мутаций в гене APC или (реже) активирующих мутаций в гене β -катенина [31]. Оказалось, что лиганды и ингибиторы сигнального пути Wnt могут влиять на рост и выживаемость опухолевых клеток, несмотря на присутствие таких мутаций.

Показано [32], что при действии никлозамида ускоряется эндоцитоз рецепторов Frizzled1, снижается количество белка Dishevelled-2 и происходит блокирование вызываемой Wnt3A стабилизации β -катенина и ингибирование дальнейших этапов активации транскрипции с участием факторов LEF/TCF (см. рис. 3). Кроме того, никлозамид увеличивал противоопухолевый эффект оксалиплатина. Важно отметить, что антипролиферативный эффект никлозамида проявлялся и в отношении клеток, полученных из метастазов опухолей толстой кишки человека в печень [31].

В этом же исследовании при изучении фармакокинетики никлозамид вводили мышам NOD/SCID перорально в дозе 200 мг/кг. Кроме того, было исследовано накопление этого препарата в привитой мышам опухоли HTC116 после перорального введения препарата с помощью зонда в дозе 200 мг/кг в течение трёх недель, начиная с четвертого дня после прививки опухоли. Osada и соавт. показали [31], что максимальная концентрация никлозамида в плазме наблюдалась через 15 мин после введения (893,7 нг/мл), а через 30-45 мин она составляла уже только 50-40 нг/мл, через 1,5 ч – 78 нг/мл, период полувыведения был равен 3,5 ч. К концу эксперимента его концентрация в опухоли составляла 37 нг/г ткани, а в плазме – 38 нг/мл.

Ингибирование роста опухолей при действии никлозамида наблюдали при пероральном введении никлозамида в дозах 100-200 мг/кг (в зависимости от чувствительности опухолевых клеток) в течение 2-3 недель 6 дней в неделю, начиная с 4-го дня после прививки опухоли. При этом в опухолевой ткани было обнаружено снижение уровня белков Dishevelled-2 и β -катенина, что свидетельствует о длительном подавлении сигнальной системы Wnt при лечении никлозамидом (см. рис. 3). При этих условиях у контрольных животных никаких признаков токсичности обнаружено не было.

Нарушения канонического сигнального пути WNT/ β -катенин присутствует почти в 90% опухолей толстой кишки, что приводит к постоянной активной экспрессии соответствующих генов-мишеней [29], в том числе с образованием метастазов связан

белок S100 – кальций-связывающий белок A4 (S100A4), с молекулярной массой 11 кДа [30].

Повышенный уровень экспрессии S100A4 обнаружен при многих типах рака: при раке желчного пузыря, мочевого пузыря, молочной железы, пищевода, желудка, поджелудочной железы, при гепатоцеллюлярном раке, немелкоклеточном раке лёгкого и, особенно, при раке толстой кишки. Высокая экспрессия S100A4 тесно связана с агрессивностью опухоли, её способностью к метастазированию и низкой выживаемостью пациентов [33].

S100A4 играет важную роль в таких клеточных процессах, как миграция, инвазия, адгезия и ангиогенез, которые лежат в основе образования метастазов. Показано, что при раке толстой кишки экспрессия S100A4 в опухолях позволяет прогнозировать развитие метастазов [34]. Ингибиторы экспрессии S100A4, которые угнетали бы S100A4-опосредованное метастазирование, не известны. Sack и соавт. [35] в результате проведения скрининга 1280 соединений для обнаружения ингибиторов экспрессии S100A4 показали, что никлозамид является ингибитором взаимодействия β -катенина с T-клеточным фактором TCF, что приводит к нарушению экспрессии S100A4 и S100A4-зависимого метастазирования. При обработке разных линий опухолевых клеток толстой кишки человека (HCT116, SW620, LS174T, SW480, DLD-1) никлозамидом *in vitro* было обнаружено снижение экспрессии S100A4 на уровне мРНК и белка, а также ингибирование миграции, инвазивности, пролиферации клеток и колониеобразования. В экспериментах *in vivo* после лечения никлозамидом (20 мг/кг/день) обнаружено ингибирование образования метастазов и увеличение продолжительности жизни мышей с привитыми опухолями.

Полагают, что обнаруженная антиметастатическая активность никлозамида позволит создать новый метод лечения и предупреждения развития метастазов при раке толстой кишки.

2.8. Рак яичника

Рак яичника остается наиболее частой причиной смерти при онкологических заболеваниях женской половой сферы и находится на пятом месте среди причин смертности у женщин.

Yoshioka и соавт. в модельных экспериментах на мышах показали [36], что рост опухоли рака яичников регулируется уровнем белка WNT7A, и что злокачественная трансформация эпителиальных клеток яичника происходит под контролем сигнального пути WNT. В экспериментах на культурах клеток было показано, что пролиферация клеток рака яичников, адгезия и инвазия регулируются белком WNT7A. Гиперэкспрессия WNT7A стимулировала активность фактора транскрипции TCF/LEF. В следующей работе этих авторов было показано, что под контролем сигнальной системы WNT7A/ β -катенин находится экспрессия гена FGF1, кодирующего фактор роста фибробластов [37]. Уровень этого белка является фактором риска при

раке яичника и коррелирует с низкой выживаемостью больных [37]. Никлозамид эффективно блокировал сигнальный путь WNT7A/ β -катенин, ингибировал активность β -катенина как фактора транскрипции, снижал выживаемость и миграцию клеток. Действие никлозамида было более эффективным в клетках с гиперэкспрессией WNT7A. При пероральном введении никлозамида мышам этот препарат ингибировал рост опухоли, растущей внутрибрюшинно (репрезентативная модель рака яичника) [37].

В исследовании, проведенном Arend с соавт., исследована противоопухолевая активность никлозамида в отношении клеток рака яичника линии SKOV3.ip1. Показано, что никлозамид в диапазоне концентраций от 1 мкМ до 8 мкМ ингибирует сигнальный путь Wnt. При его действии обнаружено значительное уменьшение количества дефосфорилированного белка-корцептора LRP6 и его фосфорилированной формы, белка Axin2, циклина D1, сурвивина, β -катенина, а также гибель клеток линии SKOV3.ip1 [38].

Юо и соавт. [39] исследовали действие никлозамида на ОСК яичника человека; по их данным никлозамид в концентрации 3 мкМ снижает выживаемость ОСК до 10-60%. В экспериментах на животных никлозамид при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг ежедневно, начиная со следующего дня после прививки опухолевых клеток, снижал способность ОСК индуцировать опухоли при их введении животным. Введение никлозамида приводило в опухолевых клетках к изменению профиля экспрессии 2928 генов, в том числе к снижению экспрессии генов белков, формирующих комплексы цепи переноса электронов в митохондриях. В экспериментах на клетках показано, что никлозамид на 20% увеличивал образование АМК в ОСК, вызывал повреждение митохондрий, сопровождавшееся высвобождением цитохрома с и апоптозиндуцирующего фактора и фрагментацией ДНК в результате апоптоза ОСК.

2.9. Рак головы и шеи

Более 90% случаев рака головы и шеи приходится на плоскоклеточную карциному верхних отделов желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, включая ротовую полость, глотку, гортань и придаточные пазухи. Несмотря на успехи хирургии, лучевой терапии и химиотерапии, достигнутые в последние годы, выживаемость больных при плоскоклеточной карциноме головы и шеи (ПКК) остается низкой [40, 41]. В опухолевых клетках ПКК обнаружен высокий уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), и поэтому была исследована возможность использования для лечения ПКК эрлотиниба – противоопухолевого препарата, ингибитора тирозинкиназы EGFR человека, которая после активации осуществляет аутофосфорилирование EGFR и инициирует сигнальный каскад, приводящий к стимуляции пролиферации клеток. Ингибирование этого процесса тормозит рост опухолевых клеток и/или

приводит к их гибели. Однако эффективность эрлотиниба при ПКК оказалась низкой [42], что может быть связано с активацией ряда сигнальных путей, повышающих жизнеспособность опухолевых клеток и снижающих эффективность действия эрлотиниба в отношении ПКК. Действительно, в клетках ПКК был обнаружен высокий уровень белка STAT3 по сравнению с нормальными клетками [43].

STAT3 – член семейства факторов транскрипции STAT, активность которого часто бывает повышена во многих типах опухолевых клеток [43]. STAT3 локализуется в цитоплазме клетки и активируется при фосфорилировании по аминокислотному остатку Тир705 Янус-киназой (Janus associated kinase, JAK) или тирозинкиназой, связанной с рецепторами факторов роста (Scr) [43]. После фосфорилирования происходит димеризация pSTAT3 и транслокация димера в ядро, где он активирует транскрипцию большого количества генов, включая Bcl2/Bcl-XL, циклин D1, c-Мус и другие гены, активация которых способствует повышению выживаемости клеток [44]. Активность STAT3 также регулируется путём дефосфорилирования, которое происходит под действием недавно открытой тирозинфосфатазы белков PTPMeg2, дефосфорилирующей аминокислотный остаток Тир705 в pSTAT3 [45]. В модели с использованием ксенотрансплантированных опухолей иммунодефицитным мышам было показано, что блокирование STAT3 приводит к ингибированию роста опухолей ПКК *in vivo*. В последнее время ведется активный поиск таких низкомолекулярных ингибиторов STAT3, которые можно было бы использовать в клинике.

Li и соавт. показали [46], что никлозамид *in vitro* и *in vivo* ингибирует образование фосфорилированного pSTAT3 в опухолевых клетках, а при совместном действии эрлотиниба и никлозамида обнаружено блокирование образования pSTAT3, которое происходит под действием эрлотиниба, и полное отсутствие белков Bcl2 и Bcl-XL в лизатах клеток, что обеспечивало синергизм действия этих препаратов и приводило к практически полному подавлению роста ПКК при их совместном использовании.

2.10. Немелкоклеточный рак лёгкого

При немелкоклеточном раке лёгкого (NSCLC), EGFR, также как и при ПКК, является молекулярной мишенью при лечении этого заболевания так как до 20% больных имеют соматические мутации в области тирозинкиназного домена в гене EGFR, которые способствуют росту опухолевых клеток, и поэтому большие надежды также возлагались на использование в терапии ингибиторов тирозинкиназной активности EGFR, таких как эрлотиниб и gefитиниб. Однако оказалось, что после 6-12 месяцев терапии у больных развивается резистентность к данным препаратам, что является ограничением этого метода лечения.

Механизмы развития резистентности клеток NSCLC к ингибиторам тирозинкиназы EGFR

также были связаны с активацией сигнального пути STAT3 – фактора транскрипции для Bcl2 и Bcl-XL, а активация STAT3 эрлотинибом, как было показано выше, приводит к положительной регуляции генов Bcl2 и Bcl-XL, тем самым способствуя развитию резистентности к эрлотинибу у опухолевых клеток. В исследовании, проведенном Li и соавторами [46], показано, что в клетках NSCLC эрлотиниб также повышает количество фосфорилированного STAT3 путём подавления фосфатазы PTPMeg2, которое приводит к повышению уровня Bcl2 и Bcl-XL и последующей потере чувствительности к эрлотинибу, а никлозамид блокирует вызванную эрлотинибом активацию сигнального пути STAT3/Bcl2/Bcl-XL в опухолевых клетках немелкоклеточного рака лёгких, приводя к отмене резистентности к эрлотинибу *in vitro* и *in vivo* [47].

С помощью никлозамида оказалось возможным преодолеть приобретенную резистентность клеточной линии немелкоклеточного рака лёгкого HCC827/ER к эрлотинибу, в том числе и *in vivo* у мышей с ксенотрансплантированными опухолями (никлозамид в дозе 20 мг/кг/день + эрлотиниб в дозе 40 мг/кг/день в течение 32 дней наблюдения). Авторы полагают, что комбинированная терапия никлозамидом и эрлотинибом может представлять собой новую и эффективную стратегию лечения NSCLC, в том числе и у тех пациентов, у которых уже развилась резистентность к стандартной терапии ингибиторами тирозинкиназной активности EGFR.

2.11. Рак молочной железы

Рак молочной железы – наиболее частая форма рака у женщин. Но, несмотря на значительный прогресс в диагностике и лечении, это заболевание занимает второе место в смертности женщин от рака, что во многом связано с высокой частотой метастазирования. Поэтому продолжается поиск новых терапевтических подходов для лечения этой формы рака.

Эффективность никлозамида в отношении опухолевых клеток молочной железы была исследована *in vitro* и *in vivo* Ye и соавт. [48], которые показали, что никлозамид ингибирует пролиферацию опухолевых клеток линий MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 и 4T1. По данным МТТ-теста, через 72 ч инкубации с препаратом значение IC₅₀ для линий MDA-MB-231, MCF-7 и MDA-MB-468 составило 0,95 мкМ, 1,05 мкМ и 1,88 мкМ соответственно. При анализе ингибирования колониеобразующей активности через 12 суток после добавления препарата значение IC₅₀ для линии 4T1 составило 0,2 мкМ. Никлозамид также индуцировал апоптоз клеток линии 4T1, который сопровождался появлением активированной каспазы на фоне снижения антиапоптотических белков Bcl-2, Mcl-1 и сурвивина. Обнаружено также, что этот препарат ингибирует в опухолевых клетках сигнальный путь STAT3, снижает уровень фосфорилированного по остатку Tyr705 белка STAT3, фосфорилированного по остатку Tyr495 киназы FAK и фосфорилированного по остатку

Tyr416 белка Src. Никлозамид ингибировал миграцию и инвазию опухолевых клеток молочной железы.

В экспериментах на мышах с использованием модели ксенотрансплантации опухолевых клеток человека линии 4T1 было продемонстрировано, что никлозамид при внутрибрюшинном введении в дозах 10 и 20 мг/кг/день в течение трёх недель, начиная с 7-го дня после прививки опухолевых клеток ингибировал рост опухолей и образование метастазов в лёгких, а также ангиогенез. Никлозамид снижал уровень миелоидных клеток-супрессоров в ткани опухоли [48]. При этом в токсикологических исследованиях по гематологическим, гистологическим и общим данным было показано отсутствие токсического действия никлозамида при данных условиях введения.

Никлозамид проявлял высокую противоопухолевую активность в отношении ОСК рака молочной железы [49]. Используя фракцию SP клеток линии MCF-7, культивируемых в виде сфероидов, как репрезентативную модель для оценки ОСК рака молочной железы, Wang и соавт. показали, что при введении никлозамида (10 мг/кг/день, внутрибрюшинно, 5 дней в неделю, 8 недель, начиная со следующего после прививки клеток SP дня) мышам NOD/SCID с трансплантированными клетками SP из сфероидов линии MCF-7 у животных вырастали опухоли меньшего размера, чем в контрольной группе. В опухолях, извлеченных у леченных никлозамидом животных обнаружено снижение уровня экспрессии генов циклина D1, Hes1 и PTCH, контролируемых сигнальными системами Wnt, Notch и Hedgehog соответственно. Это свидетельствует о подавлении ОСК в условиях данного эксперимента.

2.12. Опухолевые стволовые клетки как мишень действия никлозамида

Исследования последнего десятилетия в области СК изменили представления о механизмах канцерогенеза, которые в настоящее время связывают с возникновением и существованием ОСК [50]. Результаты, накопленные в процессе изучения СК и особенностей развития опухолей, позволяют считать, что опухоль развивается из ОСК, которые возникают, скорее всего, в результате накопления мутаций в соматических СК [50]. Анализ биологии и свойств ОСК посвящено большое количество обзоров [50-56], поэтому далее будут приведены ссылки только на отдельные работы в этой области.

Первые доказательства существования ОСК были получены Dick и соавторами в 1997 году при исследовании ОМЛ [8]. Ими было обнаружено, что миелолейкоз человека переносит лишь небольшая часть клеток со свойствами ОСК с фенотипом CD34⁺CD38⁻. В общей популяции опухолевых клеток их доля составляла лишь 0,1%, но именно эти клетки при введении иммунодефицитным мышам NOD/SCID размножались и дифференцировались с образованием лейкозных клеток разных типов.

В 2003 году при использовании той же методологии Al-Hajj и соавт впервые, на примере рака

молочной железы, было доказано существование ОСК в солидных опухолях [57] и показано, что только клетки с определённым фенотипом – CD44⁺CD24^{low}ESA⁺ (ESA – epithelial-specific antigen – специфический для эпителиальных клеток антиген) – были способны индуцировать рак молочной железы человека у иммунодефицитных мышей. С использованием этого подхода были получены убедительные доказательства присутствия ОСК для большого числа солидных опухолей человека [58, 59]. ОСК разного происхождения при исследовании с флуоресцентными красителями Хехст 33342 и родамин-123, как и нормальные СК, обладают способностью исключать эти липофильные красители из клеток и образовывать побочную, или боковую, популяцию SP – от английского side population [59].

ОСК характеризуются высокой устойчивостью к повреждающим воздействиям благодаря экспрессии генов таких ABC-транспортёров, как ABCG2, ABCB1 и ABCC1; они кодируют белки, которые осуществляют транспорт как гидрофобных, так и гидрофильных соединений из клеток в среду [60, 61], и обеспечивают выброс красителей Хехста и родамина, что и позволяет идентифицировать клетки, составляющие SP. Кроме того, ОСК характеризуются высоким уровнем репарации ДНК и высоким содержанием антиоксидантов, что делает их устойчивыми и к ионизирующему излучению [62, 63]. Поэтому высокая чувствительность ОСК к действию никлозамида позволяет надеяться на создание на его основе эффективного противоопухолевого препарата.

Совокупность результатов экспериментального изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе стимуляции, пролиферации и дифференцировки СК, позволяет полагать, что регуляция этих процессов в ОСК, находится под контролем тех же сигнальных путей, что и в нормальных СК – Wnt, Notch и Hedgehog [38, 39, 64].

Нарушение регуляции активности СК в результате мутаций может лежать и в основе развития доброкачественных опухолей. Лейомиома матки – часто встречающаяся доброкачественная эстроген- и прогестерон-зависимая опухоль миометрия, которая может вызывать маточные кровотечения, тяжёлую анемию и невынашивание беременности. Опухоль возникает из мутантных СК гладких мышц миометрия. Показано, что зрелые клетки миометрия и лейомиомы в ответ на действие эстрогена и прогестерона секретируют белки семейства WNT, которые вызывают β -катенин-зависимую стимуляцию СК лейомиомы, определяя тем самым рост опухоли [65]. Обнаружено, что никлозамид ингибирует сигнальный каскад WNT и пролиферацию клеток лейомиомы [66], что позволило авторам рекомендовать проведение клинических испытаний для исследования возможности использования никлозамида для лечения лейомиомы матки.

Обобщая полученные в разных исследованиях результаты необходимо отметить, что никлозамид

обладает высокой противоопухолевой активностью не только в отношении широкого спектра опухолей, но и, что особенно важно, и в отношении ОСК. Эффективность его действия на ОСК убедительно доказана при миелолейкозе [10], при раке яичника [39] и раке молочной железы [49]. При других опухолях о действии никлозамида на ОСК можно судить по его способности ингибировать сигнальные пути, специфичные для ОСК. Ингибирование сигнальных путей Wnt, Notch и Hedgehog при действии никлозамида показано при многих формах рака.

3. РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НИКЛОЗАМИДА

В процессе скринингового исследования радиосенсибилизирующей активности более чем тысячи соединений обнаружена способность никлозамида эффективно сенсибилизировать опухолевые клетки (клетки немелкоклеточного рака лёгкого линии H1299) к действию ионизирующего излучения. Предварительная обработка клеток никлозамидом повышала уровень апоптоза клеток H1299, индуцируемого действием гамма-излучения, до более высоких значений, чем в случае использования каждого из этих факторов по отдельности. Совместное использование также индуцировало значительно больший уровень фосфорилирования p38 и c-Jun в клетках H1299. Результаты исследования позволяют рассматривать никлозамид в качестве перспективного радиосенсибилизатора для быстрого внедрения в клиническую практику при лечении больных раком лёгкого, так как этот препарат уже около 50 лет используется при лечении тениоза и не вызывает побочных эффектов [67].

4. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИКЛОЗАМИДА - ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ НЕОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

4.1. Разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания

Противоглистную активность никлозамида связывают с его способностью вызывать разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях паразитов. В настоящее время показано, что производное никлозамида – значительно более растворимый препарат никлозамидэтанолламин – в наномолярных концентрациях вызывает разобщение и в клетках млекопитающих [68]. Пероральный приём никлозамидэтанолламина приводит к увеличению расхода энергии и повышению активности обмена липидов у мышей. Этот препарат, кроме того, оказался эффективным в профилактике и лечении стеатоза печени и резистентности к инсулину, вызванных диетой с высоким содержанием жиров [68].

Авторы полагают, что никлозамидэтаноламин может использоваться для лечения диабета 2-го типа.

4.2. Ингибирование активности mTORC1 и стимуляция аутофагии

Для лечения некоторых заболеваний необходим поиск активных соединений, способных регулировать аутофагию; этот процесс “поедания клеткой самой себя” активируется при недостатке питательных веществ и часто рассматривается как один из вариантов программируемой гибели клеток [69].

В клетках млекопитающих этот процесс находится под контролем белкового комплекса, получившего название мишень рапамицина комплекс 1 млекопитающих (mTORC1), который включает серин/треонин киназу mTOR, передающую сигналы о доступности питательных веществ, и контролирует ряд клеточных процессов. mTORC1 регулирует стадию инициации синтеза белка путём фосфорилирования белков, связывающих эукариотический фактор инициации 4E (4E-BPS), и фосфорилирования рибосомальных S6 киназ. В условиях достаточного количества питательных веществ комплекс mTORC1 активен, усиливает биогенез рибосом и синтез белка и тормозит аутофагию. При индукции аутофагии происходит перемещение цитозольного белка LC3 (называемого также Atg8) в мембрану растущих аутофагосом, и он контролирует увеличение последних [70].

Для направленной регуляции сигналов mTORC1 и аутофагии необходим поиск активных соединений с заданными фармакологическими свойствами.

В связи с этим для поиска препаратов, регулирующих активность аутофагии, была создана скрининговая система на основе клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 [71].

В процессе скрининга 3500 соединений Balgi и соавт. [71] обнаружили четыре препарата с требуемыми свойствами, одним из них оказался никлозамид. Он обладал способностью быстро увеличивать содержание аутофагосом. Индуцированное никлозамидом ингибирование mTORC1 и накопление аутофагосом было обратимо и быстро восстанавливалось после удаления этого препарата. При изучении механизма ингибирования сигнального пути mTORC1 при действии никлозамида было показано, что этот препарат не влияет на активность сигнальной системы PI3K/Akt, не ингибирует активность киназы mTORC1 и не влияет на структуру комплекса mTORC1, но обладает протонофорной активностью в опухолевых клетках и в бесклеточных лизатах *in vitro* [71]. В клетках рака молочной железы под действием никлозамида снижался градиент протонов между лизосомами и цитоплазмой, что приводило к закислению среды в цитоплазме клеток. Однако связь этого механизма действия никлозамида с его влиянием на активность mTORC1 пока не ясна.

Авторы полагают, что благодаря тому, что никлозамид уже применялся в клинической практике и активен в тех же концентрациях, которые уже используются для лечения других заболеваний, его доклинические и клинические испытания могут быть ускорены. Использование этого препарата может оказаться перспективным при лечении таких заболеваний, как туберозный склероз, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания, обусловленные неправильным сворачиванием белка, и онкологические заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных в разных исследованиях результатов свидетельствует о высокой противоопухолевой активности никлозамида, в том числе и в отношении ОСК, и о способности этого препарата подавлять метастазирование. В таблице приведены сводные количественные данные об активности никлозамида в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток человека. Они позволяют заключить, что наибольшей чувствительностью к этому препарату обладают клетки лейкозов: значения IC₅₀ составляли от 0,4 мкМ до 1 мкМ. Для солидных опухолей разных типов значения IC₅₀ составляли от 0,5 мкМ до 12 мкМ, а для разных типов нормальных клеток – от 4,5 мкМ до 9 мкМ, для мононуклеарных лейкоцитов периферической крови – более 1 мкМ. Эти данные с учётом низкой токсичности препарата, позволяют рассматривать никлозамид в качестве перспективного противоопухолевого лекарственного средства для лечения широкого круга онкологических заболеваний, в том числе прогрессирующих форм рака. Доказанный синергизм действия никлозамида и многих традиционно используемых противоопухолевых препаратов и его радиосенсибилизирующая активность расширяют перспективы использования никлозамида в лечении онкологических заболеваний. В то же время следует отметить, что пока основная часть данных получена на опухолевых клетках *in vitro* и в модельных экспериментах с ксенотрансплантированными опухолевыми клетками человека иммунодефицитным мышам *in vivo*. Кроме того, до сих пор окончательно не выяснен механизм противоопухолевого действия никлозамида. Препятствием в изучении этого препарата является его чрезвычайно низкая растворимость. Но уже синтезированы его более растворимые производные [6, 73], разрабатываются способы включения никлозамида в полимерные носители [74] и их свойства активно изучаются. По-видимому, мишенью действия никлозамида являются митохондрии, и пока не ясно, по каким механизмам развивается блокирование сигнальных путей, специфичных для опухолевых и опухолевых стволовых клеток при взаимодействии с препаратом. Это позволяет ожидать появления новых сведений о механизмах противоопухолевого действия никлозамида и его эффективных аналогов в ближайшем будущем.

Таблица. Противоопухолевая активность никлозамида в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток человека, оцениваемая по значению IC₅₀ **.

Вид опухоли		Линия клеток	Значение IC ₅₀ , мкМ	Ссылка
Рак лёгкого	Аденокарцинома	HCC827	> 0,50 **	47
	Аденокарцинома	HCC827/ER ¹	> 0,50 **	47
	Карцинома	A549	3,00	6
Рак молочной железы	Аденокарцинома	MCF-7	1,05	48
			7,30**	49
			0,80 **	72
			1,06	73
	Аденокарцинома	MDA-MB-231	0,95	48
			4,77 **	49
	Аденокарцинома	MDA-MB-468	0,79	73
			1,88	48
Рак поджелудочной железы	Аденокарцинома	AsPC1	1,47	73
	Эпителиоидная карцинома	Panc-1	1,73	73
Злокачественные опухоли яичников	Карцинома	CP70 ²	4,41 **	74
			> 3,00 **	39
	Аденокарцинома	CP70sps ³	1,95 **	39
			> 12,00 **	74
		SKOV-3	1,20	37
		SKOV3.ip1 ⁴	1,00	38
		ОКП ⁵	1,29	38
		ОСК из ОКП ⁶	< 3,00 **	39
Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей	Промиелоцитарный лейкоз	HL-60	0,48	10
	Гистиоцитарная лимфома	U937	0,41	10
	Миелоидный лейкоз	OCI-AML3	0,79	10
	Миелоидный лейкоз	Molm13	0,72	10
	Миеломоноцитарный лейкоз	MV4-11	1,00	10
Колоректальный рак	Карцинома толстой кишки	HTC116	2,20	34
	Карцинома толстой кишки	HT-29	< 2,00 **	31
			7,20	6
			4,84 **	31
Аденокарцинома ободочной кишки	Caco-2	0,85 **	31	
Рак предстательной железы	Карцинома	Du145	0,70	6
	Аденокарцинома	PC3	11,70	6
	Карцинома	CWR22Rv1	0,50	27
Рак шейки матки	Аденокарцинома	HeLa	1,40	6
Плоскоклеточный рак кожи	Карцинома	A431	8,80	6
Множественная миелома	Миелома	JJN3	1,41 **	17
	Плазмоцитома	H929	0,77 **	17
	Плазмоцитома	U266	1,21 **	17
	Плазмоцитома	RPMI 8226	1,05 **	17
		ОКП ⁷	0,60-1,60 **	17
Глиобластома	Глиобластома	LN229	2,53	19
	Мультиформная глиобластома	T98G	2,35	19
	Глиобластома	U87	1,59	19
	Астроцитома	U138	2,78	19
	Глиобластома	U373	2,05	19
		ОКП ⁸	0,66	19
Гепатома	Гепатобластома	Huh-6	0,22	25
	Карцинома	Hep3B	0,37	25
Плоскоклеточный рак головы и шеи		Tu212 ⁹	> 0,50 **	46
		Tu686 ⁹	> 0,50 **	46
Лейомиома матки		ОКП ¹⁰	0,21 **	66
Нормальные клетки		ЭФМ	5,78	10
		НФЧ	4,54	10
		МККМ	9,00	10
		МЛПК	> 1,00	17

Примечание. * - IC_{50} - концентрация препарата, при которой погибает 50% клеток. ** - значение вычислено на основе графических данных авторов. Сокращения: ОКП - опухолевые клетки пациентов; ОСК - опухолевые стволовые клетки; ЭФМ - эмбриональные фибробласты мыши; НФЧ - нормальные фибробласты человека; МККМ - мононуклеарные клетки костного мозга практически здоровых добровольцев; МЛПК - мононуклеарные лейкоциты периферической крови здоровых добровольцев. 1 - линия клеток HCC827/ER, устойчива к эрлотинибу, получена из клеток линии HCC827; 2 - линия клеток CP70, устойчива к цисплатину, получена из клеток линии A2780; 3 - клетки CP70sps (side population spheroid) в виде сфероидов, полученных из фракции SP (side population) клеток линии CP70; 4 - линия клеток SKOV3.ip1 получена из асцитной жидкости бестимусных мышей nude, которым внутрибрюшинно вводили клетки линии SKOV3; 5 - опухолевые клетки яичников, полученные из асцитной жидкости пациенток с раком яичников при операции, после неoadъювантной химиотерапии или во время рецидива болезни; 6 - опухолевые стволовые клетки, растущие в виде сфероидов, получены от пациенток с первичными злокачественными опухолями яичников; 7 - мононуклеарные клетки пациентов с первичной множественной миеломой; 8 - клетки, полученные в ходе операции, от пациентов с первичной глиобластомой; 9 - линия клеток Tu212 получена из первичной опухоли подглоточного пространства; линия Tu686 получена из метастаза лимфатического узла пациента с первичным плоскоклеточным раком языка; 10 - образцы от пациенток с лейомиомой матки, не получавших гормональные препараты и не имевших злокачественных опухолей матки. Получены при гистерэктомии или миомэктомии.

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. Машковский М.Д. (1993) Лекарственные средства. В двух частях. Ч. II. – 12-е изд., перераб. И доп. – М.: Медицина, 688с.
2. Park J.P., Fioravanti C.F. (2006) Parasitol. Res., **98**, 200-206.
3. Dai J.R., Coles G.C., Wang W., Liang Y.S. (2010) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **104**, 304-306.
4. Park S.J., Shin J.H., Kang H., Hwang J.J., Cho D.H. (2001) BMB Rep., **44**, 517-522.
5. Chang Y.W., Yeh T.K., Lin K.T., Chen W.C., Yao H.T., Lan S.J., Wu Y.S., Hsieh H.P., Chen C.M., Chen C.T. (2006) J. Food Drug Anal., **14**, 329-333.
6. Pan J.X., Ding K., Wang C.Y. (2012) Chin. J. Cancer, **31**, 178-184.
7. Shipley J.L., Butera J.N. (2009) Exp. Hematol., **37**, 649-658.
8. Bonnet D., Dick J.E. (1997) Nat. Med., **3**, 730-737.
9. Guzman M.L., Neering S.J., Upchurch D., Grimes B., Howard D.S., Rizzieri D.A., Luger S.M., Jordan C.T. (2001) Blood, **98**, 2301-2307.
10. Jin Y., Lu Z., Ding K., Li J., Du X., Chen C., Sun X., Wu Y., Zhou J., Pan J. (2010) Cancer Res., **70**, 2516-2527.
11. Chikara Sh., Reindl K.M. (2013) Transl Lung Cancer Res., **2**, 449-451.
12. Musse A.A., Meloty-Kapella L., Weinmaster G. (2012) Semin. Cell Dev Biol., **23**, 429-436.
13. Borggreffe T., Liefje R. (2012) Cell Cycle, **11**(2), 264-276.
14. Wang A.M., Ku H.H., Liang Y.C., Chen Y.C., Hwu Y.M., Yeh T.S. (2009) J. Cell Biochem., **106**, 682-692.
15. Kyle R.A., Rajkumar S.V. (2014) Expert Rev Hematol., **7**, 5-7.
16. Kyle R.A. (2005) Leukemia, **19**, 910-912.
17. 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.
18. Park J.P., Fioravanti C.F. (2006) Parasitol. Res., **98**, 200-206.
19. Wieland A., Trageser D., Gogolok S., Reinartz R., Höfer H., Keller M., Leinhaas A., Schelle R., Normann S., Klaas L. et al. (2013) Clin. Cancer Res., **19**, 4124-4136.
20. Bengochea A., de Souza M.M., Lefrançois L., Le Roux E., Galy O., Chemin I., Kim M., Wands J.R., Trepo C., Hainaut P. et al. (2008) Br J Cancer, **99**, 143-50.
21. Giakoustidis A., Giakoustidis D., Mudan S., Sklavos A., Williams R. (2015) Can. J. Gastroenterol. Hepatol., **29**, 212-221.
22. Kharashvili G., Simkova D., Makharoblidze E., Trtkova K., Kolar Z., Bouchal J. (2011) Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Republ., **155**, 11-18.
23. Reya T., Clevers H. (2005) Nature, **434**, 843-850.
24. Luis T.C., Ichii M., Brugman M.H., Kincade P., Staal F.J. (2012) Leukemia, **26**, 414-421.
25. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi Y., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M., Yoshida T. (2013) Onco Targets Ther., **6**, 1685-1693.
26. Чуссов В.И., Пусаков И.Г. (2011) Экспериментальная и клиническая урология, №2-3, 6-7.
27. Liu C., Lou W., Zhu Y., Nadiminty N., Schwartz C.T., Evans C.P., Gao A.C. (2014) Clin. Cancer Res., **20**, 3198-3210.
28. Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. (2010) CA Cancer J. Clin., **60**, 277-300.
29. Giles R.H., van Es J.H., Clevers H. (2003) Biochim. Biophys. Acta, **1653**, 1-24.
30. Stein U., Arlt F., Walther W., Smith J., Waldman T., Harris E.D., Mertins S.D., Heizmann C.W., Allard D., Birchmeier W., Schlag P.M., Shoemaker R.H. (2006) Gastroenterology, **131**, 1486-1500.
31. Osada T., Chen M., Yang X.Y. (2011) Cancer Res., **71**, 4172-4182.
32. Chen M., Wang J., Lu J., Bond M.C., Ren X.R., Lyerly H.K., Barak L.S., Chen W. (2009) Biochemistry, **48**, 10267-10274.
33. Kim J.H., Kim C.N., Kim S.Y., Lee J.S., Cho D., Kim J.W., Yoon S.Y. (2009) Oncol. Rep., **22**, 41-47.
34. Sack U., Walther W., Scudiero D., Selby M., Aumann J., Lemos C., Fichtner I., Schlag P.M., Shoemaker R.H., Stein U. (2011) Mol. Biol. Cell., **22**, 3344-3354.
35. Helfman D.M., Kim E.J., Lukanidin E., Grigorian M. (2005) Br. J. Cancer, **92**, 1955-1958.
36. Yoshioka S., King M.L., Ran S., Okuda H., MacLean J.A. 2nd, McAsey M.E., Sugino N., Brard L., Watabe K., Hayashi K. (2012) Mol. Cancer Res., **10**, 469-482.

37. King M.L., Lindberg M.E., Stodden G.R., Okuda H., Ebers S.D., Johnson A., Montag A., Lengyel E., MacLean J.A. 2nd, Hayashi K. (2015) *Oncogene*, **34**, 3452-3462.
38. Arend R.C., Londoño-Joshi A.I., Samant R.S., Li Y., Conner M., Hidalgo B., Alvarez R.D., Landen C.N., Straughn J.M., Buchsbaum D.J. (2014) *Gynecologic Oncology*, **134**, 112-120.
39. Yo Y.T., Lin Y.W., Wang Y.C., Balch C., Huang R.L., Chan M.W., Sytwu H.K., Chen C.K., Chang C.C., Nephew K.P. et al. (2012) *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 1703-1712.
40. Marur S., Forastiere A.A. (2008) *Mayo Clin. Proc.*, **83**, 489-501.
41. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T. et al. (2008) *CA Cancer J. Clin.*, **58**, 71-96.
42. Quesnelle K.M., Wheeler S.E., Ratay M.K., Grandis J.R. (2012) *Cancer Biol. Ther.*, **13**, 935-945.
43. Lai S.Y., Johnson F.M. (2010) *Drug Resist Update*, **13**, 67-78.
44. Inghirami G., Chiarle R., Simmons W.J., Piva R., Schlessinger K., Levy D.E. (2005) *Cell Cycle*, **4**, 1131-1133.
45. Su F., Ren F., Rong Y., Wang Y., Geng Y., Wang Y., Feng M., Ju Y., Li Y., Zhao Z.J., Meng K., Chang Z. (2012) *Breast Cancer Res.*, **14**, R38.
46. Li R., You S., Hu Z., Chen Z.G., Sica G.L., Khuri F.R., Curran W.J., Shin D.M., Deng X. (2013) *PLoS One*, **8**, e74670.
47. Li R., Hu Z., Sun S.Y., Chen Z.G., Owonikoko T.K., Sica G.L., Ramalingam S.S., Curran W.J., Khuri F.R., Deng X. (2013) *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 2200-2212.
48. Ye T., Xiong Y., Yan Y., Xia Y., Song X., Liu L., Li D., Wang N., Zhang L., Zhu Y., Zeng J., Wei Y., Yu L. (2014) *PLoS One*, **9**, e85887.
49. Wang Y.C., Chao T.K., Chang C.C., Yo Y.T., Yu M.H., Lai H.C. (2013) *PLoS One*, **8**, e74538.
50. Москалева Е.Ю., Северин С.Е. (2009) в: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Т.1. Под ред. М.А. Пальцева. – М.: Издательство “Медицина”, “Шико”, с. 206-232.
51. Wilson B.J., Schatton T., Frank M.H., Frank N.Y. (2011) *Curr. Colorectal Cancer Rep.*, **7**, 128-135.
52. Frank N.Y., Schatton T., Frank M.H. (2010) *J. Clin. Invest.*, **120**, 41-50.
53. Bao B., Ahmad A., Azmi A.S., Ali S., Sarkar F.H. (2013) *Curr. Protoc. Pharmacol.*; Chapter **14**, Unit 14.25.
54. Kemper K., Grandela C., Medem J.P. (2010) *Oncotarget*, **1**(6), 387-395.
55. Pannuti A., Foreman K., Rizzo P., Osipo C., Golde T., Osborne B., Miele L. (2010) *Clin. Cancer Res.*, **16**(12), 3141-3152.
56. Takebe N., Ivy S.P. (2010) *Clin. Cancer Res.*, **16**(12), 3106-3112.
57. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3983-3988.
58. Al-Hajj M., Clarke M.F. (2004) *Oncogene*, **23**, 7274-7282.
59. Hirschmann-Jax C., Foster A.E., Wulf G.G., Nuchtern J.G., Jax T.W., Gobel U., Goodell M.A., Brenner M.K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14228-14233.
60. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 48-58.
61. Choi C.H. (2005) *Cancer Cell Int.*, **4**, 5-30.
62. Baumann M., Krause M., Hill R. (2008) *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 545-554.
63. Кондрашева И.Г., Замулаева И.А., Саенко А.С., Смирнова С.Г., Орлова Н.В., Селиванова Е.И., Москалева Е.Ю., Северин С.Е. (2011) *Молекул. Мед.*, **6**, 25-32.
64. Kemper K., Grandela C., Medem J.P. (2010) *Oncotarget*, **1**(6), 387-395.
65. Ono M., Yin P., Navarro A., Moravek M.B., Coon J.S. 5th, Druschitz S.A., Serna V.A., Qiang W., Brooks D.C., Malpani S.S. et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 17053-17058.
66. Ono M., Yin P., Navarro A., Moravek M.B., Coon J.S. 5th, Druschitz S.A., Gottardi C.J., Bulun S.E. (2014) *Fertil Steril.*, **101**(5), 1441-1449.
67. Lee S.L., Son A.R., Ahn J., Song J.Y. (2014) *Biomed Pharmacother.*, **68**(5), 619-624.
68. Tao H., Zhang Y., Zeng X., Shulman G.I., Jin S. (2014) *Nat. Med.*, **20**, 1263-1269.
69. Meijer A.J., Codogno P. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2445-2462.
70. Xie Z., Nair U., Klionsky D.J. (2008) *Mol Biol Cell.*, **19**, 3290-3298.
71. Balgi A.D., Fonseca B.D., Donohue E., Tsang T.C., Lajoie P., Proud C.G., Nabi I.R., Roberge M. (2009) *PLoS One*, **4**, e7124.
72. Fonseca B.D., Diering G.H., Bidinosti M.A., Dalal K., Alain T., Balgi A.D., Forestieri R., Nodwell M., Rajadurai C.V., Gunaratnam C. et al. (2012) *Biol. Chem.*, **287**(21), 17530-17545.
73. Chen H., Yang Z., Ding C., Chu L., Zhang Y., Terry K., Liu H., Shen Q., Zhou J. (2013) *ACS Med Chem Lett.*, **4**(2), 180-185.
74. Bai M.-Y., Yang H.-Ch. (2013) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **419**, 248-256.

Поступила: 27. 01. 2015.

MOLECULAR MECHANISMS OF NICLOSAMIDE ANTITUMOR ACTIVITY

E.Yu. Moskaleva, V.G. Perevozchikova, A.S. Zhirnik, S.E. Severin

National Research Centre “Kurchatov Institute”, NBICS-Centre,
1 Kurchatov's sq., Moscow, 123182 Russia; tel.: +7 (499)1969539; fax: +7(499)1961704;
e-mail: nrcki@nrcki.ru; moskalevaey@mail.ru

In this review the recent data regarding the antitumor activity of niclosamide and the molecular mechanisms of its antitumor activity are presented. Niclosamide has been used in the clinic for the treatment of intestinal parasite infections. In recent years in several screening investigations of various drugs and chemical compounds niclosamide was identified as a potential anticancer agent. Niclosamide not only inhibits the Wnt/ β -catenin, mTORC1, STAT3, NF- κ B and Notch signaling pathways, but also targets mitochondria in cancer cells to induce growth inhibition and apoptosis. A number of studies have established the anticancer activity of niclosamide in both *in vitro* and *in vivo* in xenotransplantation models using human tumors and immunodeficient mice. It is important that niclosamide is active not only against tumor cells but also cancer stem cells. Normal cells are resistant to niclosamide. The accumulated experimental data suggest niclosamide is a promising drug for the treatment of various types of cancer.

Key words: niclosamide, antitumor drugs, signaling pathways, mitochondria damage, cancer stem cells