

На правах рукописи

Жирник Александр Сергеевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ
НИКЛОЗАМИДА И КОМБИНИРОВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ
С ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Москалёва Елизавета Юрьевна

Официальные оппоненты: **Гроздова Ирина Дмитриевна**
доктор биологических наук, МГУ имени М.В. Ломоносова
Химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений, ведущий научный сотрудник

Позднякова Наталья Владимировна
кандидат биологических наук, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт (МНИОИ) имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

Защита состоится «23» мая 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: Россия, Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте <http://www.ibmc.msk.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рост заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний обуславливает необходимость поиска способов повышения эффективности химиотерапии и лучевой терапии злокачественных новообразований. Наряду с созданием новых веществ с оригинальной химической структурой актуальным является поиск противоопухолевой активности у используемых в клинической практике лекарственных препаратов (Mudduluru et al., 2016). При проведении нескольких скрининговых исследований было обнаружено, что к числу таких препаратов относится никлозамид – антигельминтное средство, применяемое в медицине на протяжении более 50 лет (Khanim et al., 2011; Park et al., 2011; Sack et al., 2011). В последние годы показано, что никлозамид обладает высокой противоопухолевой активностью в отношении различных видов злокачественных новообразований (Chen W. et al., 2017). Обнаружено эффективное действие препарата на культивируемые клетки различных опухолевых линий и опухолевые клетки, полученные от пациентов. В основе противоопухолевой активности никлозамида может лежать повреждение митохондрий и ингибирование ряда сигнальных путей (Li Y. et al., 2014), однако молекулярные механизмы действия препарата остаются недостаточно изученными. Эффективность действия никлозамида при его использовании в качестве противоопухолевого средства может быть ограничена низкой растворимостью (Chen B. et al., 2017). Поэтому ведётся поиск способов повышения растворимости никлозамида и повышения эффективности его действия путём модификации химической структуры (Chen et al., 2013) и получения дисперсных систем никлозамида (Ye et al., 2015; Zhang et al., 2015), в том числе никлозамидсодержащих полимерных частиц субмикронных размеров (Bhushan et al., 2015). При этом, важным условием является возможность интернализации частиц в опухолевые клетки. Перспективным подходом может оказаться комбинированное использование никлозамида с известными химиотерапевтическими препаратами (Liu et al., 2016; Chen L. et al., 2017; Jin et al., 2018). Кроме того, возрастает интерес к использованию никлозамида для повышения чувствительности опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения (Шуватова и соавт., 2017; Li J. et al., 2018). Исходя из этого, были сформулированы цель и задачи исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение противоопухолевой активности никлозамида в свободной и полимерной форме на культурах клеток человека и мыши и изучение его комбинированного и радиосенсибилизирующего действия.

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие **задачи**:

1) изучение цитотоксической активности никлозамида в отношении опухолевых клеток, в том числе с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, и нормальных клеток человека;

- 2) изучение цитотоксической активности полимерной формы никлозамида (ПФН) в отношении опухолевых и нормальных клеток человека;
- 3) изучение цитотоксической активности никлозамида и ПФН в комбинации с цисплатином в отношении опухолевых клеток;
- 4) изучение закономерностей накопления биосовместимых биodeградируемых полимерных частиц опухолевыми клетками человека;
- 5) изучение молекулярных механизмов действия никлозамида в свободной и полимерной форме в отношении клеток колоректального рака (КРР) человека;
- 6) изучение механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток КРР человека.

Научная новизна работы. Впервые показано, что клетки меланомы и КРР человека с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, обусловленным высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2, чувствительны к действию никлозамида. Впервые показана более высокая по сравнению с никлозамидом цитотоксическая активность ПФН в отношении опухолевых клеток человека. Впервые показаны аддитивность действия никлозамида и цисплатина и синергизм действия ПФН и цисплатина в отношении клеток меланомы мыши. Показана активная интернализация полимерных частиц опухолевыми клетками. Впервые установлено, что молекулярный механизм противоопухолевого действия никлозамида в свободной и полимерной форме в отношении клеток КРР человека одинаков и связан с повреждением митохондрий и последующим развитием окислительного стресса. Впервые обнаружено, что никлозамид проявляет радиосенсибилизирующее действие в отношении клеток КРР человека, в основе которого лежит ингибирование репарации двунитевых разрывов ДНК (ДР ДНК).

Теоретическая и практическая значимость работы. Важное теоретическое значение имеют данные о новом механизме радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении опухолевых клеток, заключающемся в ингибировании репарации ДР ДНК. Важное практическое значение имеют новые данные о высокой противоопухолевой активности никлозамида в полимерной форме в отношении различных линий опухолевых клеток при более низкой цитотоксической активности в отношении нормальных клеток. Показана эффективность никлозамида в качестве радиосенсибилизатора. Полученные результаты являются основой для проведения доклинических исследований противоопухолевой и радиосенсибилизирующей активности никлозамида.

Методология и методы исследования. Объектами исследования являлись культуры опухолевых и нормальных клеток человека и мыши. Теоретическую и методологическую основу диссертационной работы составляли труды отечественных и зарубежных учёных по

исследованию противоопухолевой активности лекарственных препаратов и молекулярных механизмов их действия, получению полимерсодержащих композиций противоопухолевых препаратов в виде субмикронных и наноразмерных частиц и изучению их свойств. При проведении исследования были использованы современные клеточные, биохимические и иммунохимические методы. При анализе результатов применяли методы статистической обработки.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) никлозамид обладает цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека, значительно меньшей в отношении нормальных клеток;
- 2) никлозамид эффективно действует на опухолевые клетки человека, экспрессирующие белки MDR1 и Bcl-2, определяющие множественную лекарственную устойчивость;
- 3) использование никлозамида в полимерной форме позволяет повысить его активность в отношении опухолевых клеток без изменения токсичности в отношении нормальных клеток;
- 4) комбинированное использование никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина повышает эффективность действия препаратов в отношении клеток меланомы мыши;
- 5) уровень накопления биосовместимых биodeградируемых полимерных частиц в клетках КРР человека зависит от концентрации частиц и продолжительности инкубации и достигает максимальных значений через 1–4 часа в зависимости от типа клеток;
- 6) механизм цитотоксического действия ПФН и никлозамида в отношении клеток КРР человека одинаков и связан с повреждением митохондрий и последующим развитием окислительного стресса;
- 7) никлозамид обладает радиосенсибилизирующей активностью в отношении клеток КРР человека, в основе которой лежит ингибирование репарации ДР ДНК.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы обеспечивается проведением экспериментов с достаточной воспроизводимостью; статистической обработкой полученных данных с заданной вероятностью и необходимым количеством повторных испытаний; сопоставлением полученных результатов с аналогичными результатами, полученными другими авторами. Результаты исследований были доложены на XIII, XIV и XV Курчатовской междисциплинарной молодёжной научной школе (Москва, 2015, 2016, 2017), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2016» (Москва, 2016), Международном научно-практическом форуме «Ядерные технологии на страже здоровья» (Москва, 2016),

Международной конференции «Проблемы химической защиты и репарации при радиационных воздействиях» (Дубна, 2018).

Публикации по теме диссертации. Основное содержание диссертации представлено в 12 публикациях, в том числе в 4 статьях в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведён сбор и анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме. Автор принимал непосредственное участие в планировании и постановке экспериментов, лично проводил необходимые расчёты и выполнял статистическую обработку и анализ полученных экспериментальных данных. Автор благодарит коллег за предоставление полимерной формы никлозамида и флуоресцентно меченных полимерных частиц.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3-х глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 255 источников, и содержит 22 рисунка и 5 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культивирование клеток различных перевиваемых линий. Клетки меланомы человека линий Mel-8 (MDR1⁺), Mel-10, MS, аденокарциномы ободочной кишки линии Caco-2, карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR, аденокарциномы прямой кишки линии SW837, мелкоклеточного рака лёгкого линии H69, клетки меланомы мыши линии B16, а также нормальные клетки – клетки почки эмбриона человека, трансформированные с использованием ДНК аденовируса типа 5, линии HEK293 и лёгочные эмбриональные фибробласты человека линии ЛЭЧ – культивировали в полной культуральной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco), содержащей 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота (СПК, HyClone) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco), в пластиковых культуральных флаконах (Corning Costar) в CO₂-инкубаторе при 37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Анализ выживаемости клеток с помощью МТТ-теста. Выживаемость опухолевых и нормальных клеток после инкубации с препаратами в течение 72 часов оценивали с помощью МТТ-теста по методу (Mosmann T., 1983) с использованием раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, Sigma-Aldrich) в концентрации 1 мг/мл в среде для культивирования клеток. После развития окраски (через 2–4 часа инкубации) среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО и измеряли интенсивность окраски по поглощению при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра

iMark (Bio-Rad). Выживаемость клеток оценивали в процентах от необработанного контроля и по кривым выживаемости рассчитывали значение IC_{50} – концентрацию препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток.

Анализ содержания белка MDR1 на мембране клеток. Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7.4, Gibco), суспендировали в ФСБ, содержащем 3% СПК, в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали с моноклональными антителами (МКАТ) мыши к CD243 (MDR1), конъюгированными с фикоэритрином (1:20, BioLegend) в течение 60 мин при 4°C в темноте. Затем клетки отмывали ФСБ, содержащем 3% СПК. Долю окрашенных клеток и интенсивность флуоресценции фикоэритрина анализировали при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 620 нм на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences). Для измерения использовали не менее 20 тыс. клеток на пробу. Изотипические МКАТ мыши, конъюгированные с фикоэритрином (1:20, BioLegend), использовали для получения отрицательного контроля.

Анализ содержания белка Bcl-2. Клетки промывали ФСБ, фиксировали в 2% растворе параформальдегида (Panreac) в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы хранили в ФСБ, содержащем 0,02% NaN_3 , при 4°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки пермеабилizировали с помощью ФСБ, содержащего 0,25% тритон X-100 и 2% бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma-Aldrich), в течение 30 мин при комнатной температуре, отмывали в ФСБ, содержащем 0,1% тритон X-100 и 10% СПК, инкубировали с первичными МКАТ мыши к Bcl-2 (1:20, Sigma-Aldrich) в течение 60 мин при комнатной температуре, отмывали и инкубировали со вторичными поликлональными антителами козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:200, BioLegend) в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем отмывали в ФСБ, содержащем 0,1% тритон X-100 и 10% СПК, и измеряли флуоресценцию с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали не менее 20 тыс. клеток на пробу. Вторичные антитела использовали для получения отрицательного контроля.

Получение и характеристика ПФН. Получение и характеристику полимерсодержащей композиции с никлозамидом проводил коллектив химиков лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины НИЦ «Курчатовский институт» под руководством к.х.н. Е.А. Воронцова. Получение препарата ПФН на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA 50/50, PURAC Biochemicals) с добавлением вспомогательных компонентов осуществляли методом эмульгирования в системе «масло/вода» по разработанному в лаборатории методу. Содержание никлозамида в ПФН, определённое методом ВЭЖХ, составило $5,2 \pm 0,4\%$. Средний размер полимерных частиц, определённый

методом динамического рассеяния света с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments), составил $240,9 \pm 3,1$ нм.

Анализ выживаемости опухолевых клеток при действии никлозамида и ПФН в комбинации с цисплатином. Выживаемость клеток меланомы мыши линии B16 после инкубации с никлозамидом, ПФН, цисплатином и комбинациями препаратов в течение 72 часов оценивали с помощью МТТ-теста. Раствор цисплатина готовили путём разбавления готового 0,5 мг/мл концентрата для приготовления раствора для инфузий «Цисплатин-ЛЭНС®» (ЛЭНС-Фарм) полной культуральной средой до нужной концентрации. Характер взаимодействия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина при их комбинированном применении определяли при непостоянном и постоянном соотношении концентраций препаратов методом Chou-Talalay (Chou T., 2006). С помощью программы «CompuSyn» (ComboSyn) рассчитывали показатель аддитивности (combination index, CI) и по его величине судили о характере взаимодействия препаратов при их комбинированном применении (синергизм при $CI < 0,9$; аддитивное действие при $0,9 < CI < 1,1$; антагонизм при $CI > 1,1$).

Получение и характеристика флуоресцентно меченных полимерных наночастиц (ФПН). Получение и характеристику ФПН проводил коллектив химиков лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины НИЦ «Курчатовский институт» под руководством к.х.н. Е.А. Воронцова. Получение препарата ФПН на основе предварительно синтезированного блок-сополимера поли(D,L-лактид-ко-гликолида) (PLGA-COOH 50/50, LACTEL® Absorbable Polymers) и полиэтиленгликоля (PEG, IRIS Biotech GmbH) с добавлением вспомогательных компонентов осуществляли стандартным методом нанопреципитации по разработанному в лаборатории методу; в качестве флуоресцентной метки использовали флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ, FITC, Sigma-Aldrich). Определение количественного содержания ФИТЦ в полученных частицах проводили спектрофотометрическим методом; распределение частиц по размерам и дзета-потенциал определяли методом динамического рассеяния света. Характеристика полученных ФПН приведена в табл. 1.

Таблица 1.

Основные физико-химические характеристики ФПН.

Наименование наноформы	Содержание ФИТЦ, %	Средний диаметр, нм	Дзета- потенциал, мВ	Индекс полидисперсности
PLGA-PEG-FITC	0,078	$94,22 \pm 0,70$	$-15,50 \pm 0,14$	$0,21 \pm 0,02$

Анализ накопления ФПН опухолевыми клетками. Способность опухолевых клеток накапливать ФПН оценивали по интенсивности флуоресценции ФИТЦ, входящего в состав частиц. Клетки высевали в 12-луночные планшеты (Corning Costar) по 400 тыс. кл/луночка, добавляли суспензию ФПН в концентрации 2,5 и 5 мкМ по ФИТЦ и инкубировали при 37°C в течение 1, 4 или 24 часов. По окончании инкубации клетки снимали с подложки, центрифугировали 5 мин при 300 g, клеточный осадок дважды отмывали холодным ФСБ, ресуспендировали в изотоническом 0,013 М цитратном буфере (pH 4.0), инкубировали в течение 30 с на льду и измеряли интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 520 нм, анализировали по 10 тыс. клеток на пробу. При этом, интенсивность флуоресценции клеток определяется флуоресценцией как тех частиц, которые адсорбировались на клеточной поверхности, так и тех частиц, которые оказались внутри клеток в результате эндоцитоза. Для количественного анализа фракции наночастиц, локализованных внутри клеток, использовали метод «гашения» флуоресценции адсорбированных на клеточной мембране ФПН (Sahlin et al., 1983). Для этого к суспензии клеток в цитратном буфере добавляли трипановый синий (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 0,2 мг/мл, инкубировали в течение 30 с на льду и анализировали интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре в тех же условиях.

Исследование уровня повреждений митохондрий по снижению накопления родамина-123. Для исследования накопления флуоресцентного красителя родамина-123 клетки центрифугировали и осадок ресуспендировали в тёплой бессывороточной среде в концентрации 1×10^6 клеток/мл. К суспензии клеток добавляли флуоресцентный краситель родамин-123 (Sigma-Aldrich) 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 родамина-123. Для исключения популяции мёртвых и погибающих клеток в пробу добавляли раствор йодистого пропидия до конечной концентрации 2 мкг/мл непосредственно перед измерением. Флуоресценцию клеток измеряли с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при двух длинах волн в красной и зелёной области спектра, при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания для зелёной области спектра – 525 нм, а для красной – 620 нм, анализировали по 50 тыс. клеток на пробу.

Определение уровня активных форм кислорода (АФК). Определение уровня АФК с carboxy-H₂DCFDA проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. В культуре клеток культуральную среду заменяли на ФСБ, содержащий реагент для определения уровня внутриклеточных АФК carboxy-H₂DCFDA (Thermo Fischer) в концентрации 10 мкМ, и инкубировали 30 мин в стандартных условиях. Маточный раствор carboxy-H₂DCFDA в

концентрации 20 мМ (10 мкг/мл) в ДМСО готовили непосредственно перед использованием. По окончании инкубации клетки дважды промывали ФСБ, содержащим 2% БСА, и измеряли их флуоресценцию с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали по 50 тыс. клеток на пробу.

Определение уровня митохондриального супероксиданион-радикала (МСОАН).

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 ДМСО и хранили не более 1 месяца при -20°C. Рабочий раствор реагента для определения уровня МСОАН 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, содержащим 2% БСА, и измеряли их флуоресценцию с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 585 нм, анализировали по 50 тыс. клеток на пробу.

Анализ клеточного цикла с использованием йодистого пропидия. После инкубации с препаратами клетки собирали, промывали ФСБ, фиксировали 70% этанолом в концентрации 1×10^6 клеток/мл при 4°C в течение 1–2 часов и хранили до исследования при -20°C. Фиксированные клетки осаждали центрифугированием при 400 g, промывали ФСБ перед использованием, 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, 50 мкг/мл йодистого пропидия) в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали 1–1,5 часа при комнатной температуре. Исходный раствор рибонуклеазы А (Sigma-Aldrich) предварительно кипятили на водяной бане в течение 10 мин, чтобы избавиться от возможной примеси дезоксирибонуклеаз. Анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 620 нм. Анализ клеточного цикла проводили в соответствии с рекомендациями фирмы Becton Dickinson с использованием программы BD CellQuest Pro (BDIS).

Облучение клеток. Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR в культуральной среде подвергали действию γ -излучения в дозе 2 Гр на установке «ГУТ-200М» (^{60}Co , 0,75 Гр/мин) при комнатной температуре. Клетки облучали либо прикреплёнными в культуральных планшетах (линия SW837), либо в суспензии в плотно закрытых пробирках (линия COLO 320 HSR). После облучения клетки помещали в CO_2 -инкубатор и инкубировали необходимое время.

Анализ чувствительности опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения в комбинации с никлозамидом. Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR высевали в 12-луночные культуральные планшеты по 40 тыс. кл/луночка за сутки до исследования,

инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкМ в течение 24 часов и подвергали действию γ -излучения в дозе 2 Гр при комнатной температуре. Через 1 час после облучения заменяли среду и продолжали культивирование клеток в течение 7 суток. Выживаемость определяли по количеству живых клеток в контрольных и опытных пробах с помощью камеры Горяева после окрашивания трипановым синим.

Анализ содержания β -катенина. Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR высевали в 6 см чашки Петри (Corning) в количестве 2×10^6 клеток/чашка за сутки до исследования, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкМ в течение 4 часов и подвергали действию γ -излучения в дозе 2 Гр. Через 24 часа после облучения эти клетки, а также контрольные клетки и клетки, обработанные никлозамидом в концентрации 2 мкМ, снимали с подложки, промывали ФСБ, фиксировали в 2% растворе параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы хранили в ФСБ, содержащем 0,02% NaN_3 , при 4°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки пермеабелизировали с помощью ФСБ, содержащего 0,25% тритон X-100 и 3% СПК, в течении 30 мин при комнатной температуре, отмывали и инкубировали с МКАТ мыши к β -катенину, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:100, eBioscience) в ФСБ, содержащем 3% СПК, в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем отмывали в ФСБ, содержащем 3% СПК, и измеряли флуоресценцию с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали не менее 20 тыс. клеток на пробу. Изотипические МКАТ мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1:100, BD Pharmingen), использовали для получения отрицательного контроля.

Анализ содержания гистона γH2AX . Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR за сутки до исследования высевали в 3,5 см чашки Петри (Corning) в количестве 700 и 500 тыс. кл/чашка соответственно, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкМ в течение 4 часов и подвергали действию γ -излучения в дозе 2 Гр. Через 1 и 24 часа после облучения эти клетки, а также контрольные клетки и клетки, обработанные никлозамидом в концентрации 2 мкМ, снимали с подложки, промывали ФСБ и фиксировали в абсолютном метаноле при 4°C в течение 20 мин. Образцы хранили в абсолютном метаноле при -20°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки отмывали от метанола, инкубировали с МКАТ мыши к гистону γH2AX , конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:100, BD Pharmingen) в ФСБ, содержащем 3% СПК, в течение 60 мин при комнатной температуре, отмывали в ФСБ, содержащем 3% СПК, и измеряли флуоресценцию с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали не менее 20 тыс. клеток на пробу. Изотипические МКАТ мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1:100, BD Pharmingen), использовали для получения отрицательного контроля.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «OriginPro» (OriginLab) с использованием t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа. Данные представляли в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Исследование цитотоксической активности никлозамида в отношении опухолевых и нормальных клеток

Анализ выживаемости опухолевых клеток различных линий и нормальных клеток человека при действии никлозамида проводили с использованием МТТ-теста. Согласно полученным результатам, никлозамид обладает выраженной цитотоксической активностью в отношении исследованных линий опухолевых клеток. В то же время его токсичность в отношении клеток почки эмбриона человека и лёгочных эмбриональных фибробластов человека была значительно ниже, чем при действии на опухолевые клетки (табл. 2). Избирательное цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток с меньшим влиянием на нормальные клетки организма человека является важной характеристикой никлозамида.

Таблица 2.
Характеристика цитотоксической активности никлозамида в отношении опухолевых и нормальных клеток человека. Приведены средние значения IC_{50} и стандартная ошибка среднего.

Линия клеток	Значение IC_{50} , мкМ
Меланома, линия Mel-8	$2,17 \pm 0,44^{* \#}$
Меланома, линия Mel-10	$0,94 \pm 0,26^{* \#}$
Меланома, линия MS	$1,20 \pm 0,36^{* \#}$
Аденокарцинома ободочной кишки, линия Caco-2	$0,89 \pm 0,16^{* \#}$
Карцинома сигмовидной кишки, линия COLO 320 HSR	$2,09 \pm 0,17^{* \#}$
Аденокарцинома прямой кишки, линия SW837	$2,14 \pm 0,20^{* \#}$
Мелкоклеточный рак лёгкого, линия H69	$6,70 \pm 0,74^{*}$
Клетки почки эмбриона человека, линия HEK293	$9,30 \pm 0,88$
Лёгочные эмбриональные фибробласты человека, линия ЛЭЧ	$20,00 \pm 0,87$

* – отличия от линии ЛЭЧ достоверны, $p < 0,05$; # – отличия от линии HEK293 достоверны, $p < 0,05$.

2. Исследование уровня белков MDR1 и Bcl-2 клетках КРР человека

Ввиду высокой гидрофобности никлозамид может быть субстратом ABC-транспортёров, и в первую очередь ABCB1 (MDR1), что в конечном итоге может привести к снижению эффективности его действия. В то же время известно, что высокий уровень экспрессии белка Bcl-2 препятствует гибели опухолевых клеток благодаря ингибированию развития апоптоза.

Поэтому клетки KPP линий SW837 и COLO 320 HSR были охарактеризованы по уровню экспрессии белков MDR1 и Bcl-2. В клетках обеих линий обнаружен высокий уровень и белка MDR1 (рис. 1А,Б), и белка Bcl-2 (рис. 1В,Г), что свидетельствует об их устойчивости к широкому спектру противоопухолевых препаратов. Тем не менее, клетки линий SW837, COLO 320 HSR и MDR1⁺ линии Mel-8 были чувствительны к действию никлозамида, также как и MDR1⁻ клетки линий Mel-10 и MS (табл. 2). Полученные результаты позволяют констатировать, что никлозамид эффективен в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2.

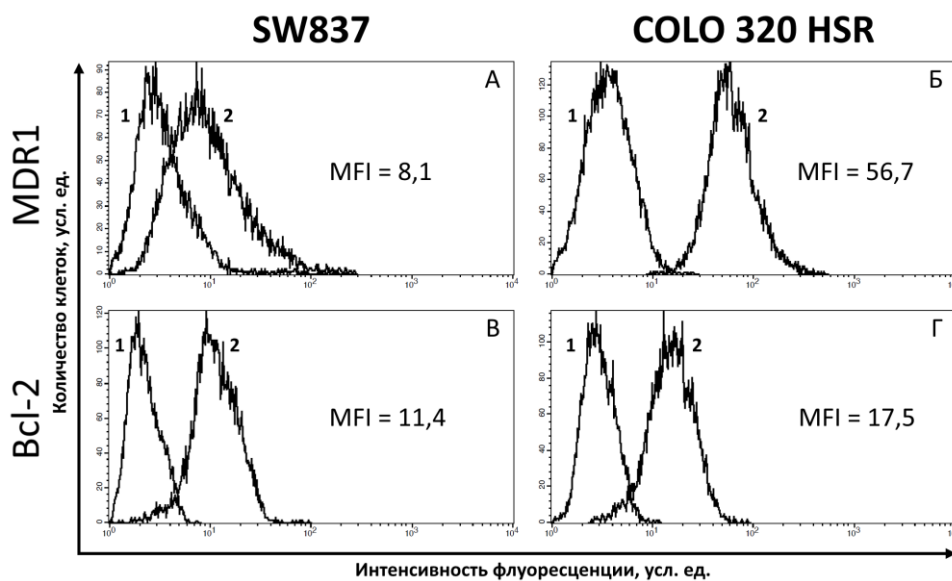


Рис. 1. Экспрессия белков MDR1 (А,Б) и Bcl-2 (В,Г) в клетках KPP человека линий SW837 (А,В) и COLO 320 HSR (Б,Г). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция клеток, окрашенных соответствующими антителами. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

3. Исследование цитотоксической активности ПФН в отношении опухолевых и нормальных клеток человека

Анализ чувствительности опухолевых и нормальных клеток к действию ПФН проводили также с использованием МТТ-теста. Обнаружено, что в отношении опухолевых клеток ПФН более активна (табл. 3), чем свободный никлозамид (рис. 2А–В, табл. 3). В то же время нормальные клетки человека (ЛЭЧ) (рис. 2Г, табл. 3) были намного менее чувствительны, чем опухолевые как к действию никлозамида, так и к действию ПФН. Важно отметить, что полимерные частицы, не содержащие никлозамид («пустые частицы»), практически не влияли на выживаемость клеток в диапазоне концентраций, соответствующих диапазону используемых концентраций ПФН. Принимая во внимание ранее полученные данные об уровне экспрессии MDR1 и Bcl-2 в клетках KPP человека линий SW837 и COLO 320 HSR, можно сделать вывод о том, что никлозамид и в свободной, и в полимерной форме эффективно действует на опухолевые клетки, экспрессирующие белки, определяющие множественную лекарственную устойчивость.

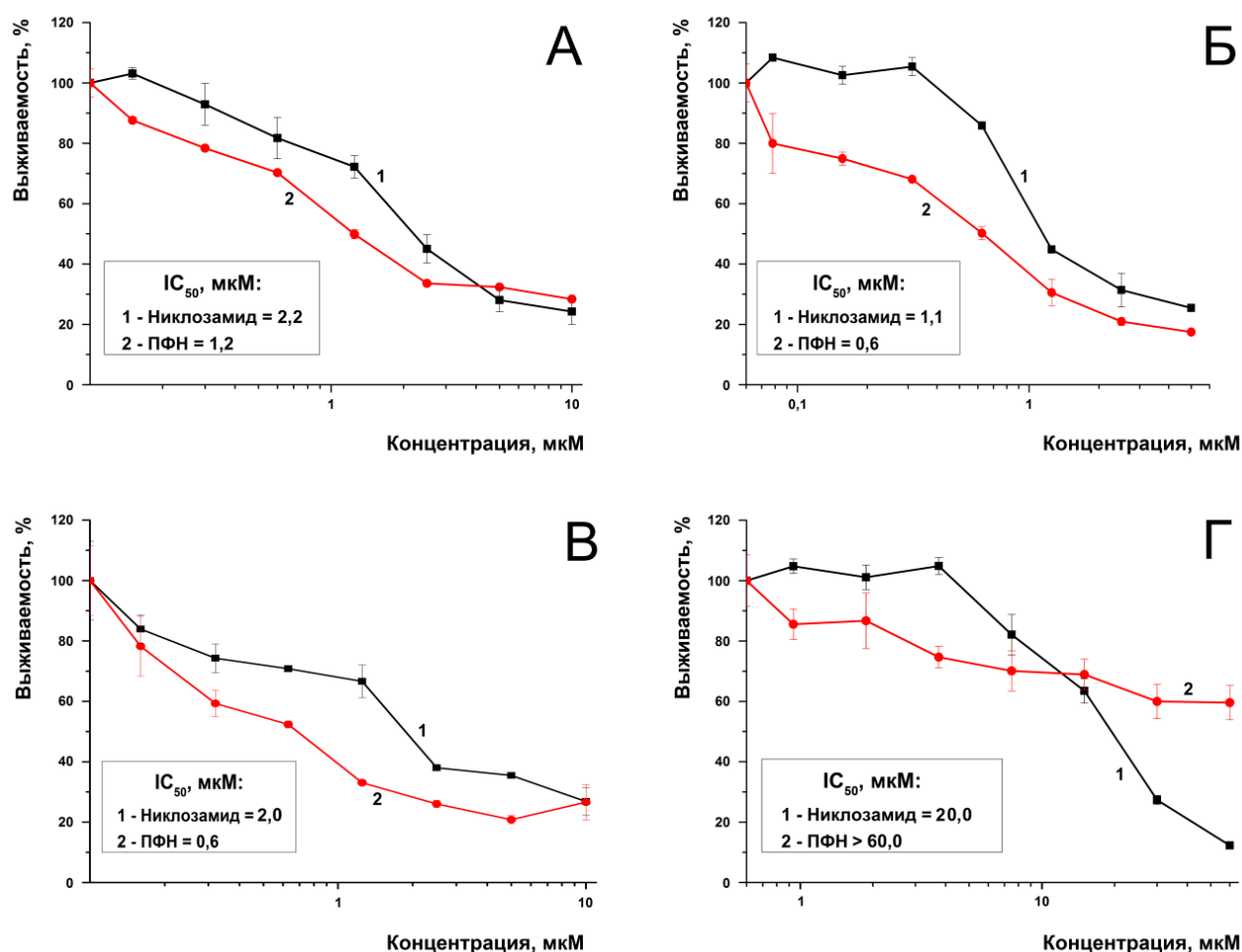


Рис. 2. Влияние никлозамида (1) и ПФН (2) на выживаемость клеток аденокарциномы прямой кишки линии SW837 (А), аденокарциномы ободочной кишки линии Caco-2 (Б), карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR (В) и лёгочных эмбриональных фибробластов человека (Г). Данные одного из трёх типичных экспериментов.

Таблица 3.

Цитотоксическая активность никлозамида и ПФН в отношении клеток КРР и нормальных клеток человека, оцениваемая по значению IC_{50} . 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, $p < 0,05$.

Линия клеток	Значение IC_{50} , мкМ	
	Никлозамид	ПФН
Аденокарцинома прямой кишки, линия SW837	$2,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1^*$
Аденокарцинома ободочной кишки, линия Caco-2	$0,9 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
Карцинома сигмовидной кишки, линия COLO 320 HSR	$2,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1^*$
Лёгочные эмбриональные фибробласты человека, линия ЛЭЧ	$20,0 \pm 0,9^{\#}$	$>60,0 \pm 5,7^{*\#}$

4. Исследование цитотоксической активности никлозамида и ПФН в комбинации с цисплатином в отношении клеток меланомы мыши

Перед изучением характера взаимодействия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина при их комбинированном применении была исследована чувствительность опухолевых клеток к действию каждого из этих препаратов по отдельности. На рис. 3А

представлена зависимость выживаемости клеток меланомы мыши линии B16 от концентрации препаратов. Средние значения IC_{50} цисплатина, никлозамида и ПФН составили $10,2 \pm 0,5$ мкМ, $1,6 \pm 0,2$ мкМ и $0,6 \pm 0,1$ мкМ соответственно. При использовании непостоянного соотношения концентраций препаратов в комбинации была обнаружена более высокая эффективность совместного действия никлозамида и ПФН с цисплатином в концентрации 5 мкМ в отношении клеток линии B16 в сравнении с действием только никлозамида и ПФН, о чём свидетельствует сдвиг кривых выживаемости в сторону меньших концентраций (рис. 3Б,В). При этом, увеличение концентрации цисплатина с 5 до 10 мкМ приводило к ещё большему повышению цитотоксической активности комбинаций препаратов и более интенсивной гибели опухолевых клеток. Для полуколичественного определения характера взаимодействия никлозамида и ПФН с цисплатином использовали постоянные соотношения концентраций препаратов в комбинации. Рассчитанные значения показателя аддитивности приведены в табл. 4.

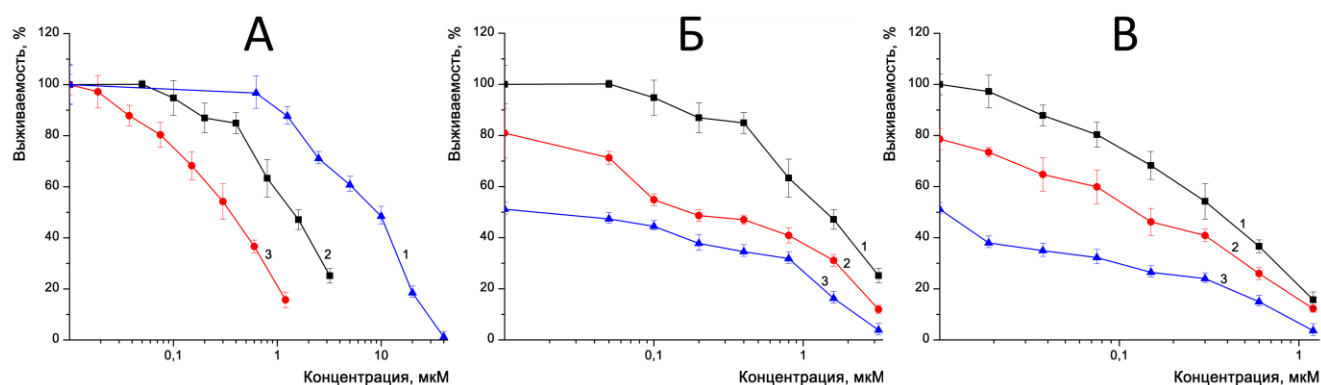


Рис. 3. Влияние никлозамида, ПФН, цисплатина и их комбинаций на выживаемость клеток меланомы мыши линии B16. А – влияние цисплатина (1), никлозамида (2) и ПФН (3) на выживаемость опухолевых клеток; Б, В – влияние никлозамида и ПФН соответственно на выживаемость опухолевых клеток при их отдельном (1) и комбинированном использовании с цисплатином в концентрации 5 мкМ (2) и 10 мкМ (3) (данные по выживаемости приведены в соответствии с концентрацией никлозамида в свободной и полимерной форме). Данные одного из трёх типичных экспериментов.

Таблица 4.

Характер взаимодействия никлозамида и ПФН при совместном действии с цисплатином на клетки меланомы мыши линии B16 при различных соотношениях концентраций препаратов, кратных соответствующим значениям IC_{50} , оцениваемый по величине показателя аддитивности (CI). Значения CI рассчитаны при $F_a = 0,9$ (F_a – доля опухолевых клеток, погибших при инкубации с комбинациями препаратов).

Исследуемый препарат	Соотношение концентраций исследуемого препарата и цисплатина, кратных значениям IC_{50}		
	1:1	1:2	2:1
Никлозамид	0,98	0,83	1,07
ПФН	0,62	0,90	0,49

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при комбинированном использовании никлозамида и ПФН с алкилирующим агентом из группы соединений платины цисплатином наблюдается соответственно аддитивность и синергизм цитотоксического действия препаратов в отношении клеток меланомы мыши линии B16, причём сила взаимодействия зависит от соотношения концентраций никлозамида, ПФН и цисплатина в комбинации.

5. Исследование накопления ФПН клетками КРР

Более высокая активность ПФН в сравнении с никлозамидом может быть связана с эффективным проникновением частиц через клеточную мембрану и созданием более высокой внутриклеточной концентрации никлозамида благодаря его высвобождению в цитоплазме клеток. Поэтому далее были изучены закономерности накопления ФПН в клетках КРР человека линий COLO 320 HSR и SW837. Пример раздельного анализа общей и внутриклеточной флуоресценции клеток через 4 часа инкубации частиц в концентрации 5 мкМ по ФИТЦ с клетками показан на рис. 4.

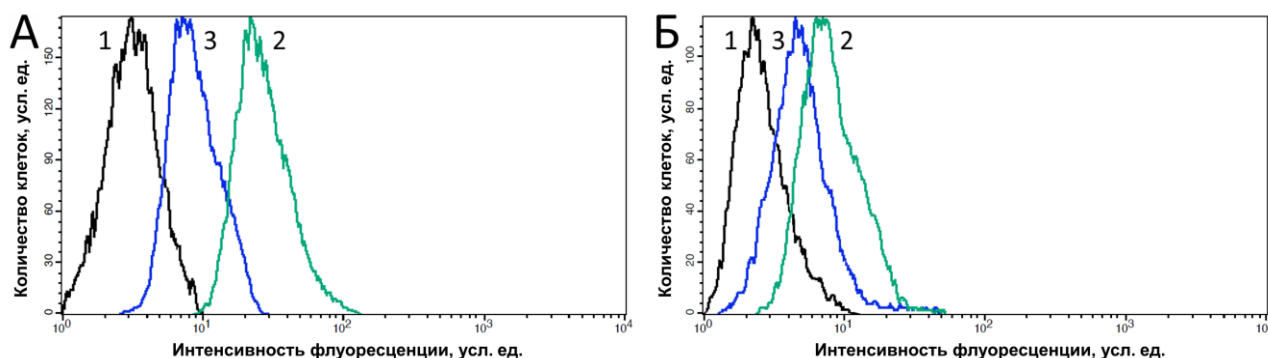


Рис. 4. Накопление ФПН опухолевыми клетками человека линий COLO 320 HSR (А) и SW837 (Б) через 4 часа культивирования в присутствии частиц (5 мкМ по ФИТЦ). 1 – аутофлуоресценция клеток; 2 – общая флуоресценция клеток; 3 – флуоресценция клеток после «гашения» флуоресценции ФПН, адсорбированных на клеточной мембране, трипановым синим. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

С помощью проточной цитофлуориметрии показано, что в течение 24 часов общее накопление ФПН пропорционально концентрации ФПН в среде и времени инкубации с опухолевыми клетками человека обеих исследованных линий (рис. 5). В то же время доля частиц внутри клеток, в отличие от их общего накопления, достигает максимума уже через 1 час (линия COLO 320 HSR) и через 4 часа (линия SW837) и остаётся постоянной при дальнейшей инкубации, что приводит к снижению эффективности транслокации ФПН во внутриклеточные компартменты (рис. 6) и указывает на насыщаемость процесса интернализации данных частиц опухолевыми клетками.

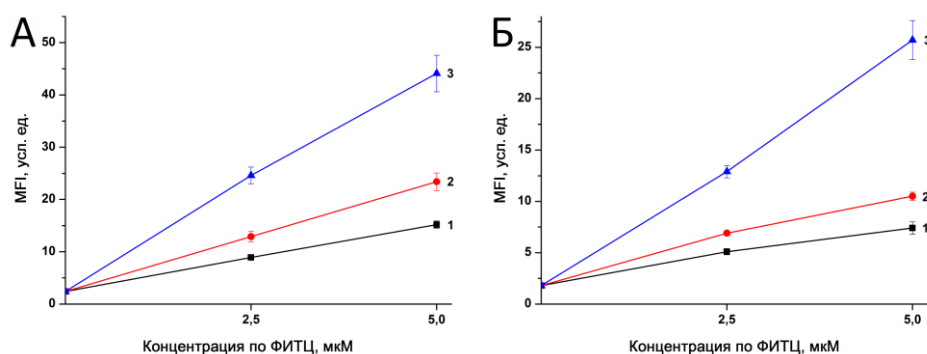


Рис. 5. Общее накопление частиц ФПН опухолевыми клетками человека линий COLO 320 HSR (А) и SW837 (Б) в зависимости от их концентрации через 1 час (1), 4 часа (2) и 24 часа (3). MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед.

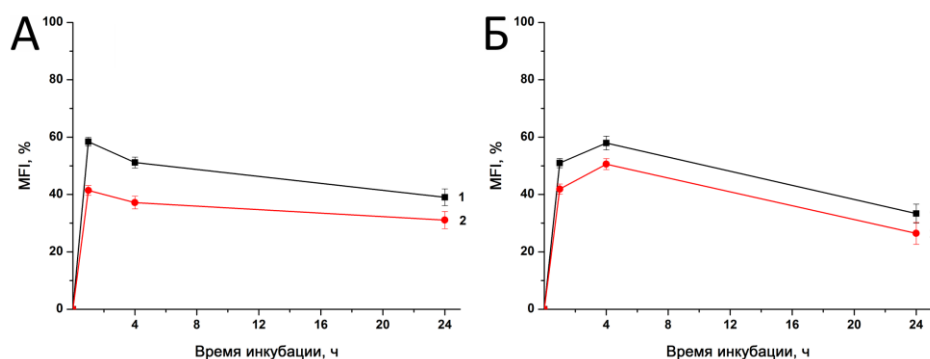


Рис. 6. Эффективность внутриклеточного накопления частиц ФПН в клетках линий COLO 320 HSR (А) и SW837 (Б) в зависимости от времени инкубации; концентрация ФПН составила 2,5 мкМ (1) и 5 мкМ (2) по ФИТЦ.

6. Исследование молекулярных механизмов действия никлозамида и ПФН в отношении клеток КРР различных линий

Влияние никлозамида в свободной и полимерной форме на состояние митохондрий оценивали по действию этих препаратов на уровень накопления родамина-123 в клетках КРР человека. Показано, что через 1 и 4 часа инкубации с никлозамидом наблюдается умеренное (линии SW837 и Сасо-2) или значительное (линия COLO 320 HSR) снижение накопления родамина-123. Через 24 часа происходило полное (линии SW837 и Сасо-2) или только частичное (линия COLO 320 HSR) восстановление накопления красителя в клетках (рис. 7А). Инкубация клеток с ПФН в равной с никлозамидом концентрации приводила к более глубокому снижению накопления родамина-123 через 1 и 4 часа, а восстановление способности клеток накапливать краситель через 24 часа культивирования в присутствии ПФН было неполным у клеток линий SW837 и Сасо-2 и полностью отсутствовало у клеток линии COLO 320 HSR (рис. 7Б). Наиболее глубокое повреждение митохондрий, регистрируемое по снижению накопления родамина-123, при действии препаратов обнаружено в клетках карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR.

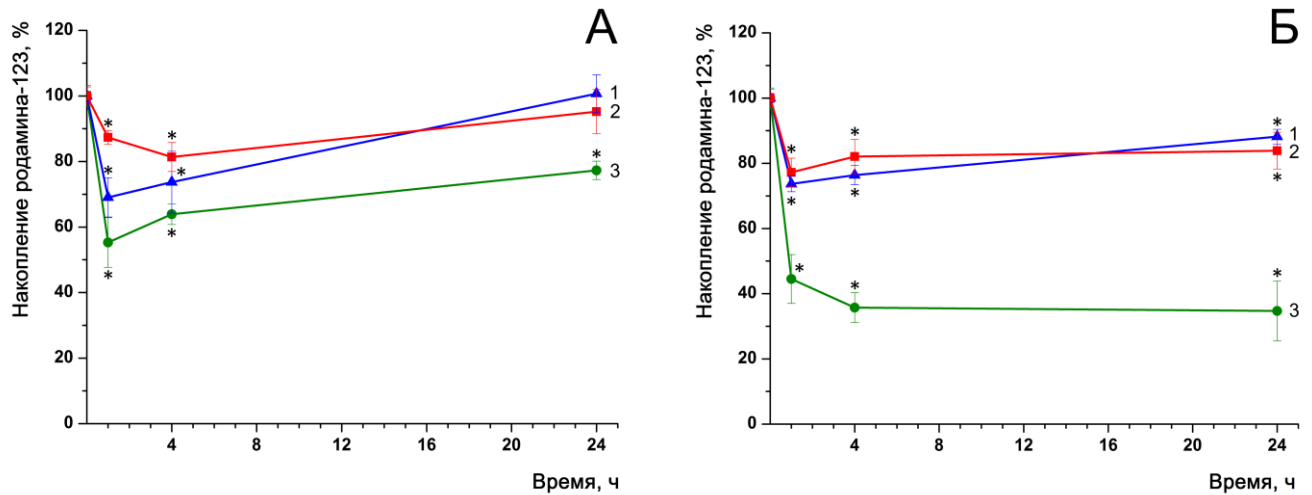


Рис. 7. Динамика изменения уровня накопления флуоресцентного красителя родамина-123 в клетках аденокарциномы прямой кишки линии SW837 (1), аденокарциномы ободочной кишки линии Сасо-2 (2) и карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR (3) после инкубации клеток с никлозамидом (А) и с ПФН (Б) в концентрации 1 мкМ. * – отличия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Повреждение митохондрий, как правило, сопровождается усиленным образованием АФК, в том числе МСОАН. Влияние ПФН в сравнении с никлозамидом на уровень этих метаболитов исследовали на клетках линии COLO 320 HSR. Полученные результаты представлены на рис. 8. Обнаружено увеличение количества АФК (уровня накопления красителя carboxy-H2DCFDA) при инкубации опухолевых клеток с ПФН. Повышение содержания МСОАН (уровня накопления красителя MitoSOX Red) в клетках линии COLO 320 HSR наблюдали как при действии ПФН, так и при действии никлозамида. Следует отметить, что клетки исследуемой линии гетерогенны по уровню накопления красителей и содержат небольшую популяцию М2 более интенсивно окрашенных клеток. Инкубация клеток линии COLO 320 HSR с никлозамидом сопровождалась увеличением размеров фракций клеток М2 с высоким уровнем образования АФК и МСОАН, более значительным при инкубации с ПФН.

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

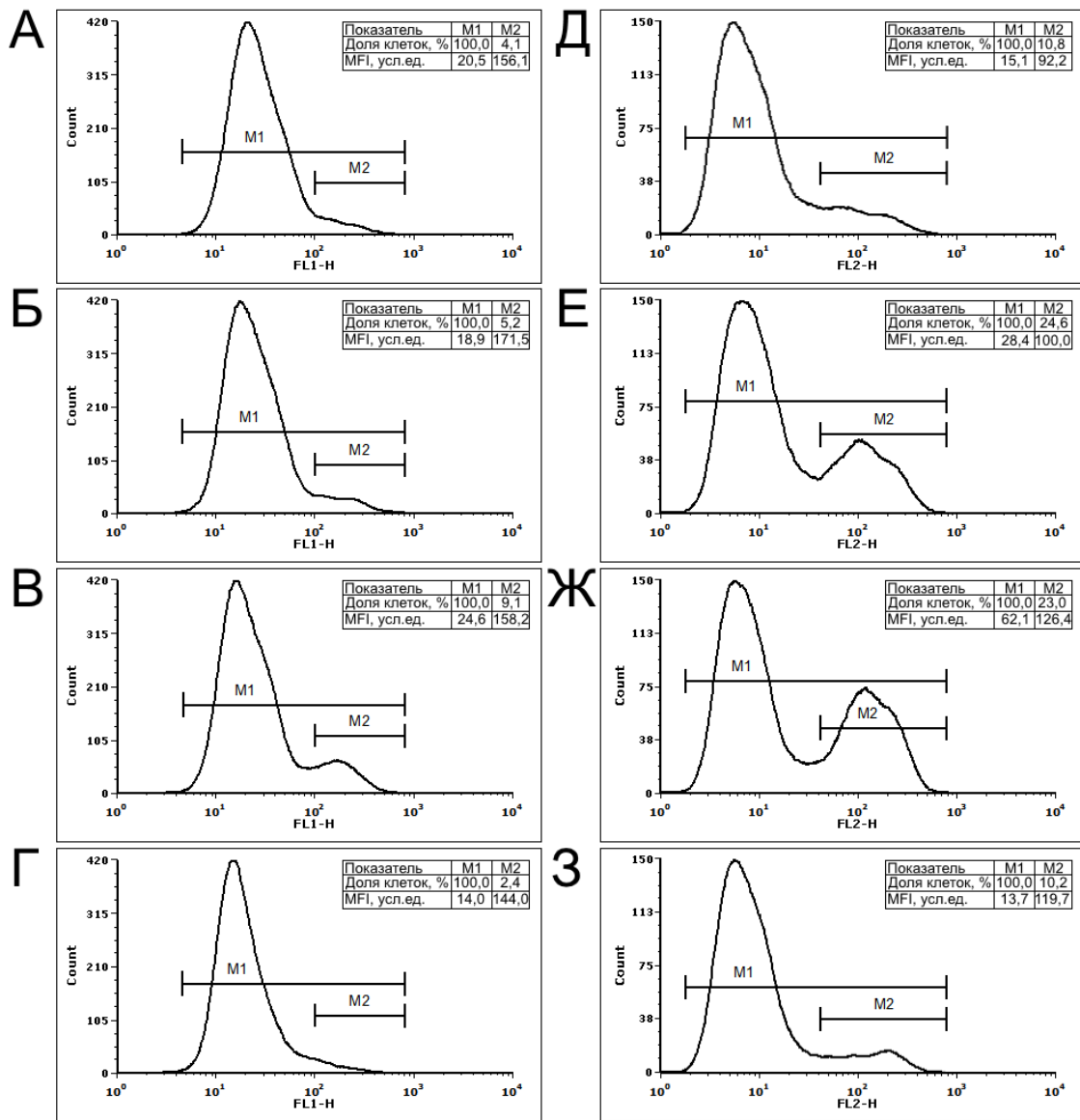


Рис. 8. Изменение общего уровня АФК, оцениваемого по накоплению флуоресцентного красителя carboxy-H2DCFDA (А–Г), и уровня МСОН, оцениваемого по накоплению флуоресцентного красителя MitoSOX Red (Д–З), в клетках линии COLO 320 HSR после инкубации в течение 1 часа с никлозамидом, ПФН и «пустыми частицами». А, Д – контрольные клетки; Б, Е – клетки после инкубации с никлозамидом; В, Ж – с ПФН; Г, З – с «пустыми частицами». По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток (канал детекции FL1 или FL2), по оси ординат – количество клеток, усл. ед. M1 – вся популяция клеток, M2 – фракция клеток, интенсивно накапливающих красители, указана доля этих клеток в процентах и их средняя интенсивность флуоресценции – MFI, усл. ед. Концентрация никлозамида и ПФН – 1 мкМ. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

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 КРР человека линий SW837, Caco-2 и COLO 320 HSR через 24 часа после внесения препаратов в культуральную среду в концентрации 1 мкМ было обнаружено увеличение доли клеток, находящихся в G₀/G₁-фазе (рис. 9). Наиболее глубокие нарушения

клеточного цикла, также как и снижение накопления родамина-123, обнаружены в клетках карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR. Обнаруженный через 24 часа после действия никлозамида и ПФН блок клеточного цикла может, при недостаточной активности процессов репарации, приводить к гибели клеток в более поздние сроки.

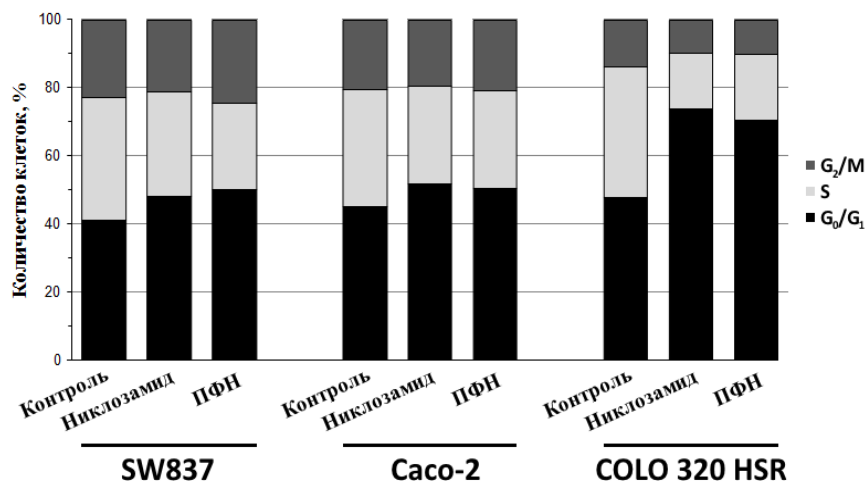


Рис. 9.

Гистограммы распределения клеток КРР человека линий SW837, Caco-2 и COLO 320 HSR по фазам клеточного цикла через 24 часа культивирования в присутствии никлозамида и ПФН в концентрации 1 мкМ. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

7. Исследование радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток КРР

При исследовании выживаемости клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR через 7 суток после облучения было обнаружено, что никлозамид вызывает гибель клеток обеих линий и усиливает действие γ -излучения, о чём свидетельствует более глубокое снижение выживаемости опухолевых клеток при совместном действии γ -излучения и никлозамида в сравнении с действием каждого из этих факторов по отдельности (рис. 10).

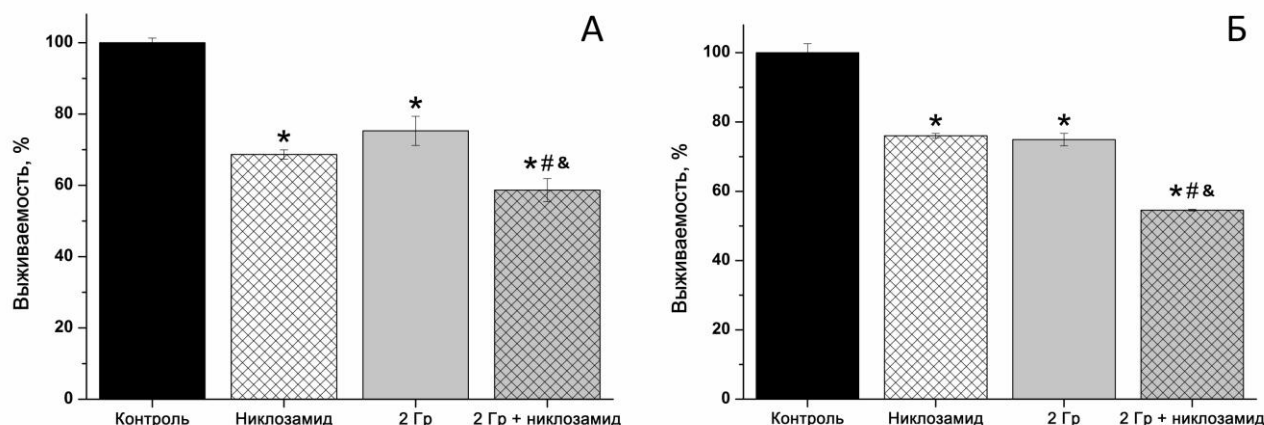


Рис. 10. Влияние никлозамида (2 мкМ), γ -излучения (2 Гр) и их комбинации на выживаемость клеток линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б) через 7 суток после облучения. Данные представлены в процентах от контроля. * – отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$; & – отличия от действия никлозамида достоверны, $p < 0,05$; # – отличия от действия γ -излучения достоверны, $p < 0,05$.

Согласно литературным данным, повышение активности сигнального пути Wnt/ β -катенин может лежать в основе развития устойчивости опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения. В клетках КРР человека линий SW837 и COLO 320 HSR обнаружен высокий уровень β -катенина (рис. 11А,Б), что свидетельствует об активном состоянии канонического сигнального пути Wnt. В клетках линии SW837 уровень β -катенина оставался неизменным как при действии никлозамида в концентрации 2 мкМ, так и при действии γ -излучения в дозе 2 Гр (рис. 11В). При облучении клеток линии SW837, культивируемых в среде с никлозамидом, количество β -катенина также не отличалось от контроля (рис. 11А,В). Совместное действие никлозамида и γ -излучения на клетки линии COLO 320 HSR приводило к достоверному снижению уровня β -катенина (рис. 11Б), более глубокому, чем при действии никлозамида и γ -излучения по отдельности (рис. 11Г). В то же время, как показано на рис. 10, при действии только никлозамида и комбинации никлозамида с γ -излучением выживаемость клеток обеих линий статистически значимо снижается. Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибирование сигнального пути Wnt/ β -катенин в опухолевых клетках не является единственным механизмом цитотоксического и радиосенсибилизирующего действия никлозамида.

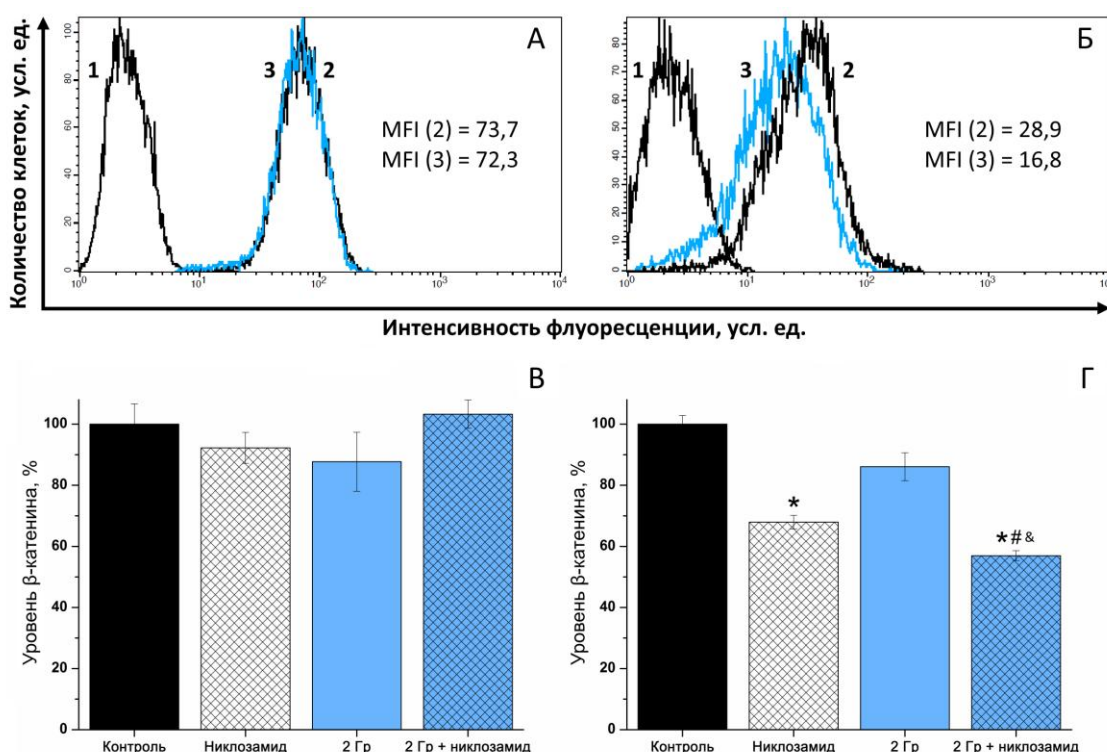


Рис. 11. Уровень β -катенина в клетках линий SW837 (А,В) и COLO 320 HSR (Б,Г). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция контрольных клеток; 3 – флуоресценция клеток при совместном действии γ -излучения (2 Гр) и никлозамида (2 мкМ). MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. * – отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$; & – отличия от действия никлозамида достоверны, $p < 0,05$; # – отличия от действия γ -излучения достоверны, $p < 0,05$.

Процесс репарации ДР ДНК, наиболее трудно репарируемого типа повреждений ДНК при действии γ -излучения, требует значительного расхода АТФ. В то же время, как было показано нами (рис. 7) и другими авторами, никлозамид вызывает повреждение митохондрий, разобщение клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования и, тем самым, приводит к снижению образования АТФ (Mook et al., 2017). Это позволило предположить, что никлозамид может опосредованно ингибировать АТФ-зависимый процесс репарации ДР ДНК. О количестве ДР ДНК в опухолевых клетках судили по уровню гистона γ H2AX, который измеряли через 1 и 24 часа после облучения. Действие γ -излучения в дозе 2 Гр приводило к увеличению уровня гистона γ H2AX в 2,0 и 1,8 раз относительно фонового уровня в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR соответственно через 1 час после облучения. Через 24 часа уровень гистона γ H2AX в облучённых клетках снижался до исходного значения, а в клетках, облучённых в присутствии никлозамида в концентрации 2 мкМ, уровень γ H2AX оставался в 1,6 раза выше, чем в контрольных клетках (рис. 12). Полученные результаты свидетельствуют об ингибировании репарации ДР ДНК после облучения опухолевых клеток в присутствии никлозамида.

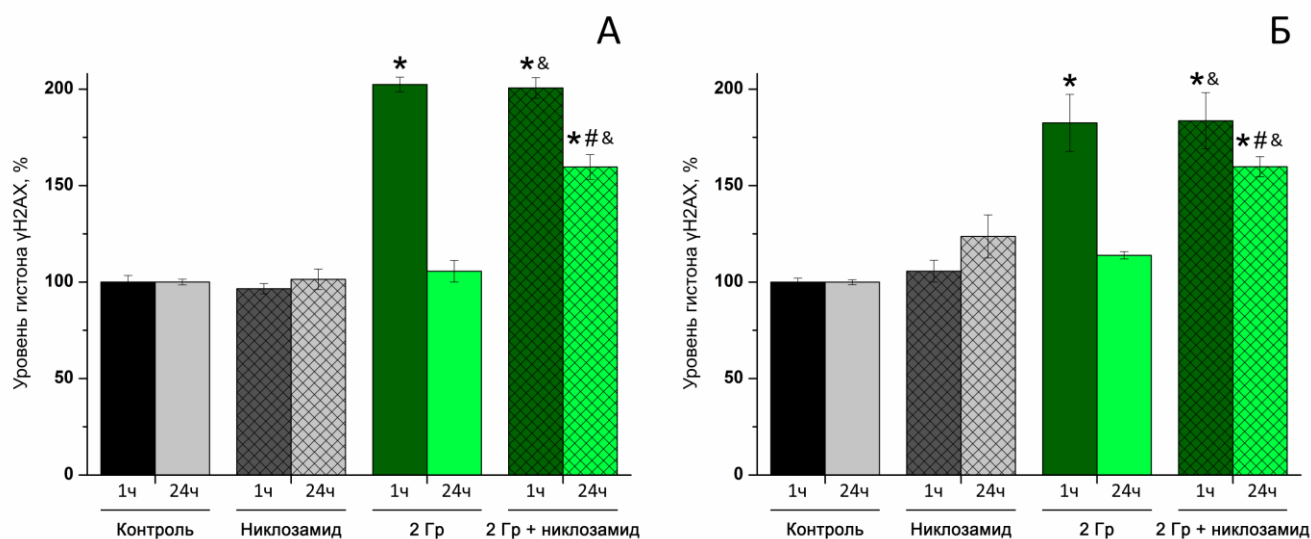


Рис. 12. Уровень гистона γ H2AX в клетках линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б) после действия никлозамида (2 мкМ), γ -излучения (2 Гр) и их комбинации через 1 и 24 часа после облучения. Значение MFI в контроле составило 8,2 и 5,0 усл. ед. для клеток линий SW837 и COLO 320 HSR соответственно. Данные представлены в процентах от контроля. * – отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$; & – отличия от действия никлозамида достоверны, $p < 0,05$; # – отличия от действия γ -излучения через 1 час достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, показана высокая цитотоксическая активность никлозамида в свободной и полимерной форме в отношении опухолевых клеток, в том числе клеток колоректального рака человека с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, обусловленным высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2, при меньшей токсичности в отношении

нормальных клеток. Важно отметить, что обнаруженный механизм противоопухолевого действия никлозамида в свободной и полимерной форме, обусловленный, в первую очередь, повреждением митохондрий, возрастанием уровня активных форм кислорода и блоком клеточного цикла, принципиально отличает его от «классических» химиотерапевтических препаратов, мишенью которых служит ДНК клеток и/или ингибирование её биосинтеза. Повышение эффективности действия никлозамида при его комбинированном использовании с цисплатином и ионизирующим излучением может значительно расширить сферу его применения. Полученные результаты являются основой для дальнейшего изучения никлозамида в качестве противоопухолевого препарата и радиосенсибилизатора в доклинических исследованиях на экспериментальных животных.

ВЫВОДЫ

1. Показана цитотоксическая активность никлозамида в отношении опухолевых клеток, в том числе с высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2, обуславливающих множественную лекарственную устойчивость, и значительно более низкая активность в отношении нормальных.
2. Использование никлозамида в составе полимерных частиц субмикронного размера на основе биосовместимого биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот обеспечивает повышение его противоопухолевой активности и снижение токсичности в отношении нормальных клеток.
3. Показана высокая эффективность комбинированного действия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина в отношении клеток меланомы мыши.
4. Показано эффективное накопление полимерных частиц на основе биосовместимого биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот в клетках колоректального рака человека.
5. Показано, что молекулярные механизмы противоопухолевого действия никлозамида в свободной и полимерной форме одинаковы и связаны с повреждением митохондрий и последующим развитием окислительного стресса, блоком клеточного цикла в G_0/G_1 -фазе и ингибированием пролиферации клеток.
6. Обнаружено радиосенсибилизирующее действие никлозамида в отношении клеток колоректального рака человека, в основе которого лежит ингибирование репарации ДР ДНК; в некоторых случаях оно сопровождается снижением уровня β -катенина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах, включённых в перечень ВАК:

1. Москалёва Е.Ю., Перевозчикова В.Г., **Жирник А.С.**, Северин С.Е. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности никлозамида // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – № 6. – С. 680–693.
2. **Жирник А.С.**, Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю., Перевозчикова В.Г., Родина А.В., Северин С.Е. Антипролиферативная активность никлозамида в отношении клеток меланомы и колоректального рака // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – № 7. – С. 40–43.
3. **Жирник А.С.**, Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю., Крылов Н.И., Тубашева И.А., Кузнецов С.Л., Воронцов Е.А. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида в отношении клеток колоректального рака // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63. – № 2. – С. 132–138.
4. **Жирник А.С.**, Никольская Е.Д., Жунина О.А., Сёмочкина Ю.П., Посыпанова Г.А., Кузнецов С.Л., Журило Н.И., Москалёва Е.Ю. Анализ накопления флуоресцентно меченных полимерных наночастиц на основе PLGA-PEG опухолевыми клетками человека // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13. – № 1–2. – С. 71–78.

Публикации в материалах научных мероприятий:

1. **Жирник А.С.**, Москалёва Е.Ю., Северин С.Е. Изучение противоопухолевой активности никлозамида в отношении клеток линий меланомы и колоректального рака // VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» – Ростов-на-Дону, Россия, 2015. – С. 148–149.
2. **Жирник А.С.**, Сёмочкина Ю.П. Исследование активности никлозамида в отношении опухолевых стволовых клеток меланомы и колоректального рака // XIII Курчатовская молодёжная научная школа – Москва, Россия, 2015. – С. 63.
3. **Жирник А.С.**, Крылов Н.И. Цитотоксическая активность полимерной формы никлозамида в отношении опухолевых клеток различных линий // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2016» – Москва, Россия, 2016. – С. 58.
4. **Жирник А.С.**, Сёмочкина Ю.П., Крылов Н.И. Повышение чувствительности клеток колоректального рака к действию ионизирующего излучения под действием никлозамида и его полимерной формы // Международный научно-практический форум «Ядерные технологии на страже здоровья» – Москва, Россия, 2016. – С. 63–65.
5. **Жирник А.С.**, Крылов Н.И., Сёмочкина Ю.П. Исследование молекулярных механизмов действия никлозамида в полимерной форме на клетки колоректального рака человека // XIV Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа – Москва, Россия, 2016. – С. 78.
6. **Жирник А.С.**, Никольская Е.Д., Посыпанова Г.А., Сёмочкина Ю.П. Исследование эффективности проникновения полимерных наночастиц на основе PLGA в опухолевые клетки человека // Юбилейная XV Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа – Москва, Россия, 2017. – С. 80.
7. **Жирник А.С.**, Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю. Повышение чувствительности опухолевых клеток человека к действию гамма-излучения с помощью никлозамида // Международная конференция «Проблемы химической защиты и репарации при радиационных воздействиях» – Дубна, Россия, 2018. – С. 69–71.

Патенты:

1. Противоопухолевое лекарственное средство на основе никлозамида [Текст]: пат. 2617049 Рос. Федерация: МПК А61Р35/00, А61К31/167 / Воронцов Е.А., Гукасова Н.В., **Жирник А.С.**, Кузнецов С.Л., Москалёва Е.Ю., Тубашева И.А., Посыпанова Г.А., Родина А.В.; заявитель и патентообладатель НИЦ «Курчатовский институт». – № RU2016118486А; заявл. 12.05.2016; опубл. 19.04.2017, Бюл. № 1. – 19 с.