

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*

**Жирник Александр Сергеевич**

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

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Москалёва Елизавета Юрьевна

Москва – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1. Никлозамид и его свойства .....	10
1.1.1. Общие сведения .....	10
1.1.2. Действие никлозамида на нормальные клетки .....	13
1.2. Механизмы цитотоксического действия никлозамида в отношении опухолевых клеток .....	15
1.2.1. Сигнальный путь Wnt/β-катенин.....	15
1.2.2. Сигнальный путь STAT3.....	19
1.2.3. Сигнальный путь Notch .....	21
1.2.4. Сигнальный путь NF-κВ.....	24
1.2.5. Сигнальный путь mTOR.....	26
1.2.6. Влияние на функциональную активность митохондрий .....	30
1.3. Противоопухолевая активность никлозамида в экспериментах <i>in vivo</i> .....	32
1.4. Никлозамид как перспективное соединение для комбинированной терапии злокачественных новообразований .....	35
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	38
2.1. Реагенты .....	38
2.2. Культивирование клеток различных перевиваемых линий.....	38
2.3. Анализ выживаемости клеток с помощью МТТ-теста.....	39
2.4. Анализ содержания белка MDR1 на мембране клеток .....	39
2.5. Анализ содержания белка Bcl-2.....	40
2.6. Получение и характеристика ПФН.....	41
2.7. Анализ выживаемости опухолевых клеток при действии никлозамида и ПФН в комбинации с цисплатином .....	41
2.8. Получение и характеристика флуоресцентно меченых полимерных наночастиц (ФПН).....	42
2.9. Анализ накопления ФПН опухолевыми клетками .....	43

2.10. Исследование уровня повреждений митохондрий по снижению накопления родамина-123 .....	46
2.11. Определение уровня АФК.....	46
2.12. Определение уровня МСОАН.....	47
2.13. Анализ клеточного цикла с использованием йодистого пропидия .....	47
2.14. Облучение клеток.....	48
2.15. Анализ чувствительности опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения в комбинации с никлозамидом.....	48
2.16. Анализ содержания $\beta$ -катенина .....	48
2.17. Анализ содержания гистона $\gamma$ H2AX .....	49
2.18. Статистическая обработка.....	50
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	51
3.1. Исследование цитотоксической активности никлозамида в отношении опухолевых и нормальных клеток.....	51
3.2. Исследование уровня белков MDR1 и Bcl-2 в клетках КРР человека.....	52
3.3. Исследование цитотоксической активности ПФН в отношении опухолевых и нормальных клеток человека .....	54
3.4. Исследование цитотоксической активности никлозамида и ПФН в комбинации с цисплатином в отношении клеток меланомы мыши .....	56
3.5. Исследование накопления ФПН клетками КРР .....	60
3.6. Исследование молекулярных механизмов действия никлозамида и ПФН в отношении клеток КРР различных линий .....	64
3.6.1. Повреждение митохондрий клеток .....	64
3.6.2. Развитие окислительного стресса .....	66
3.6.3. Блок клеточного цикла .....	68
3.7. Исследование радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток КРР .....	70
3.7.1. Влияние никлозамида на радиочувствительность клеток линий SW837 и COLO 320 HSR .....	70

3.7.2. Влияние никлозамида и $\gamma$ -излучения на активность сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR.....	71
3.7.3. Определение уровня ДР ДНК в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR при действии никлозамида и $\gamma$ -излучения.....	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	76
ВЫВОДЫ .....	81
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	86
БЛАГОДАРНОСТИ .....	118
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	119
Приложение 1. Противоопухолевая активность никлозамида в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток человека и лабораторных животных, оцениваемая по значению $IC_{50}^*$ .....	119
Приложение 2. Копия патента на изобретение ПФН .....	140

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень её разработанности**

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 [161]. При проведении нескольких скрининговых исследований было обнаружено, что к числу таких препаратов относится никлозамид – антигельминтное средство, применяемое в медицине на протяжении более 50 лет [108, 144, 177, 183, 189]. В последние годы показано, что никлозамид обладает высокой противоопухолевой активностью в отношении различных видов злокачественных новообразований [43]. 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 [122], однако молекулярные механизмы действия препарата остаются недостаточно изученными. Эффективность действия никлозамида при его использовании в качестве противоопухолевого средства может быть ограничена низкой растворимостью [38]. Поэтому ведётся поиск способов повышения растворимости никлозамида и повышения эффективности его действия путём модификации химической структуры [39] и получения дисперсных систем никлозамида [241, 249], в том числе никлозамидсодержащих полимерных частиц субмикронных размеров [29]. При этом, важным условием является возможность интернализации частиц в опухолевые клетки. Перспективным подходом может оказаться комбинированное использование никлозамида с известными химиотерапевтическими препаратами [40, 104, 132, 224, 229]. Кроме того, возрастает интерес к использованию никлозамида для повышения

чувствительности опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения [11, 115]. Исходя из этого, были сформулированы цель и задачи исследования.

### **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 биодеградируемых 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.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и используются при чтении лекций и проведении семинаров со слушателями факультета повышения квалификации, клиническими ординаторами и студентами 1, 2, 3 курсов.

### **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 биодеградируемых 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.

### **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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

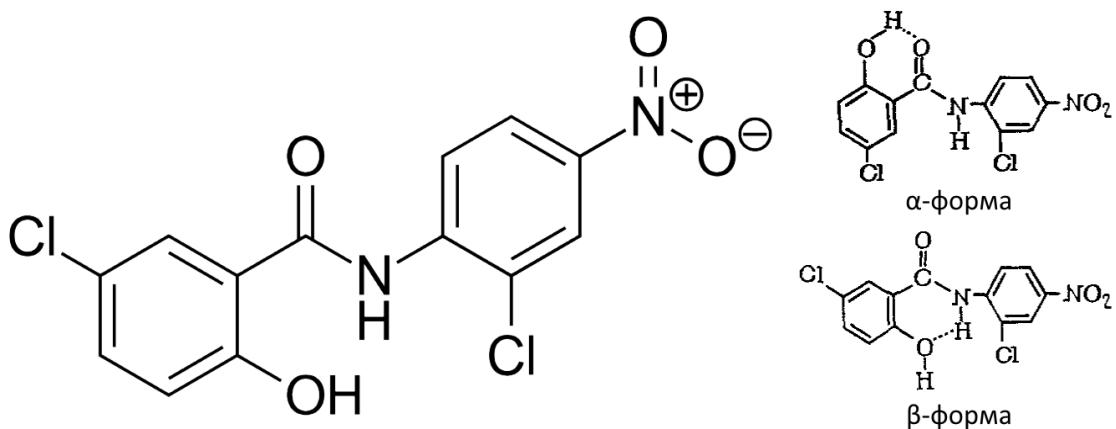
### 1.1. Никлозамид и его свойства

#### 1.1.1. Общие сведения

В 1958 г. на VI Международном конгрессе по тропической медицине и малярии (г. Лиссабон, Португалия) сотрудники подразделения по фармацевтической разработке и созданию новых лекарственных препаратов компании Bayer AG (Германия), немецкие учёные R. Gönnert и E. Schraufstätter, сообщили об открытии нового моллюскоцидного препарата – никлозамида [86]. В последующие десятилетия данный препарат стал успешно применяться для контроля за распространением шистосомоза в Египте, КНР, Тайване, Республике Филиппины, Королевстве Таиланд, Малайзии, Республике Индонезия и Доминиканской республике [226]. После обнаружения цистоцидной и трематоцидной активности никлозамид был одобрен к медицинскому применению и начал широко использоваться в качестве перорального антигельминтного препарата первой линии для лечения различных глистных инвазий (известен под торговыми наименованиями «Yomesan®» (Bayer AG, Германия), «Фенасал®» (ООО «Экохимтех», Россия) и др.) [19]. В связи с высокой эффективностью и безопасностью никлозамид включён в «20<sup>й</sup> Примерный перечень основных лекарственных средств ВОЗ» [222] и «6<sup>й</sup> Примерный перечень основных лекарственных средств ВОЗ для детей» [223].

Никлозамид представляет собой желтовато-серый однородный кристаллический порошок, без запаха, с температурой плавления 222–224°C, умеренно растворимый в этаноле, ацетоне, хлороформе, диэтиловом эфире и практически нерастворимый в воде (0,19–8,11 мг/л) [19, 67, 226, 239]. Известно о существовании нескольких полиморфных модификаций препарата – ангиридата (кубические кристаллы) и двух моногидратов (игольчатые кристаллы) [212]. По химической структуре никлозамид является производным салициланилида (ATX P02DA01); эмпирическая формула: C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, систематическое название:

5-хлор-N-(2-хлор-4-нитрофенил)-2-гидроксибензамид,  $M = 327,1$  г/моль (рис. 1). В зависимости от способа образования внутримолекулярной водородной связи никлозамид может существовать в виде двух резонансных структур: цис ( $\alpha$ -форма) и транс ( $\beta$ -форма) [16, 211, 212].



**Рисунок 1.** Структурная формула и таутомерные формы никлозамида (адаптировано из [112]).

Гидрофобность молекулы (коэффициент распределения в системе октанол-вода  $\log P_{ow} = 4,48$  [226]) и наличие электроноакцепторной нитрогруппы, амидной группы и фенольного гидроксила, определяющего слабокислотные свойства ( $pK_a = 7,45 \pm 0,43$  [16]), обусловливают протонофорную активность никлозамида. Считается, что снижение трансмембранных потенциалов митохондрий, разобщение клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, активация АТФазы, снижение потребления кислорода, ингибирование синтеза АТФ в анаэробных условиях, а также уменьшение поглощения глюкозы и содержания гликогена составляют молекулярный механизм моллюскоцидного и антигельминтного действия препарата [8, 16, 19, 70, 148, 149, 176, 226, 236].

Результаты исследований, проведённых за последние 20 лет, свидетельствуют о многообразии фармакологического действия никлозамида [43, 155, 156, 209]. В первую очередь стоит отметить широкий спектр противомикробного действия никлозамида, проявляющегося гибелю дрожжеподобных грибов вида *Cryptococcus neoformans* [65], паразитических протистов [59, 60, 78, 150], грамположительных бактерий [87, 153], в том числе

микобактерий туберкулёза [61, 99, 179, 203] и метициллин- и ванкомицин-резистентного золотистого стафилококка [90, 181, 210]; никлозамид неактивен в отношении грамотрицательных бактерий [9, 90, 181], однако ослабляет вирулентность синегнойной палочки *in vitro* и её патогенность *in vivo* [56, 100]. Сообщалось также, что никлозамид повышает выживаемость макрофагов линии RAW264.7 и клеток яичников китайского хомячка линии CHO, культивируемых в среде, содержащей бактериальные токсины [254].

Никлозамид препятствует репликации некоторых ДНК- [94, 95] и многих РНК-содержащих вирусов [31, 93, 106, 124, 195, 219, 227, 237, 250], в частности, вируса гепатита С (генотип 1B) [198], ослабляя их цитопатическое действие [31, 76, 124, 218, 237]; по данным литературы, никлозамид не является ингибитором рекомбинантной интегразы ВИЧ-1 [165].

Влияние никлозамида и его солей с этианоламином и пиперазином на метаболические процессы мышей, потребляющих высококалорийный корм, выражается в нормализации углеводного и липидного обменов, в том числе улучшении гликемического контроля, замедлении прогрессирования инсулинерезистентности, ослаблении выраженности стеатоза печени и дислипидемии, что может быть использовано при лечении сахарного диабета II типа [15, 50, 51, 57, 89, 170, 184, 206] и ожирения [15, 145, 184, 197].

Никлозамид проявляет противовоспалительное [97, 127, 180], иммуномодулирующее [228], противофиброзное [36], вазодилатирующее, гипотензивное и отрицательное хронотропное действие [119, 143]. Являясь, по мнению Ai и соавт., селективным аллостерическим ингибитором метаботропных глутаматных рецепторов I группы, данный препарат способствует значительному ослаблению нейропатической боли при субарахноидальном, внутрибрюшинном и пероральном введении крысам Sprague-Dawley со слабо завязанной лигатурой на седалищном нерве [14]. В ряде научных работ никлозамид рассматривается как средство для лечения реакции «трансплантат против хозяина» [158], реперфузионного синдрома при трансплантации почки [248], системной склеродермии [159], остеопороза [45, 64, 135], X-сцепленного глазного

альбинизма I типа [62], болезни Паркинсона [26] и рестеноза артерий как следствия гиперплазии интимы [233].

Стремительное увеличение количества научных работ, посвящённых изучению противоопухолевой активности никлозамида [43], отражает огромный интерес исследователей всего мира к его использованию в качестве нового химиотерапевтического препарата. Вместе с тем большое внимание уделяется оценке безопасности применения никлозамида, в том числе его мутагенным, канцерогенным и токсикологическим свойствам, которые требуют отдельного рассмотрения.

### **1.1.2. Действие никлозамида на нормальные клетки**

Важнейшим этапом разработки противоопухолевых лекарственных препаратов является оценка безопасности их применения, заключающаяся в определении мутагенности, канцерогенности, репродуктивной токсичности, цитотоксической активности в отношении нормальных клеток и др.

Мутагенные свойства никлозамида определяли с использованием микробных тест-систем, а также цитогенетическими методами. Полученные с помощью теста Эймса данные указывают на то, что препарат обладает слабой мутагенной активностью, более выраженной в отношении бактерий с дефектной системой эксцизионной репарации ДНК и усиливающейся при экзогенной активации фракцией S9 печени крыс *in vitro* [19, 27, 55, 73, 74, 226], что может быть обусловлено прямым взаимодействием промежуточных метаболитов (короткоживущих радикалов), образующихся при восстановлении нитрогруппы никлозамида, с молекулой нуклеиновой кислоты [12, 75]. В то же время генотоксичность никлозамида была показана в отношении клеток *Aspergillus nidulans* [63], лимфоцитов периферической крови человека [172] и сперматозоидов мыши [213]; противоречивые результаты получены при использовании клеток костного мозга мыши [84, 213]. Важно отметить, что убедительные доказательства канцерогенного действия никлозамида у млекопитающих отсутствуют [19, 72, 196, 226]. Согласно опубликованным

данным, никлозамид не обладает репродуктивной токсичностью [180], в том числе не проявляет эмбриотоксического и тератогенного действия [226].

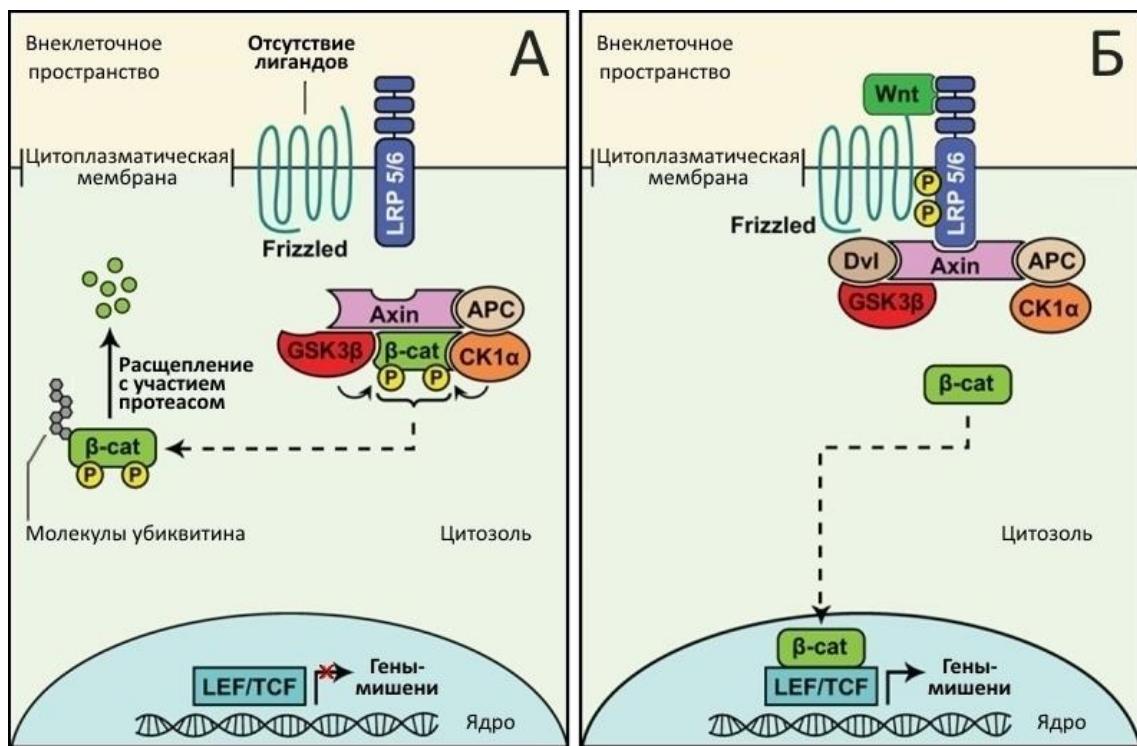
Основным фактором, ограничивающим применение противоопухолевых препаратов, является их высокая токсичность в отношении нормальных клеток при пероральном, внутримышечном и внутривенном введении. Неизбирательность действия химиотерапевтических средств приводит к повреждению печени, почек, органов кроветворной, сердечно-сосудистой и иммунной систем, ЦНС и возникновению серьёзных побочных эффектов. Согласно опубликованным данным, никлозамид проявляет слабое цитотоксическое действие в отношении нормальных клеток мыши [25, 104, 135, 228], крысы [143, 154] и человека [33, 35, 38, 56, 104, 110, 154, 164, 169, 173, 233, 238]. Следует особо отметить, что препарат не ослабляет способность гемопоэтических стволовых клеток человека к самообновлению и не приводит к их гибели по механизму апоптоза [102, 104, 139], т.е. не обладает миелоаблативным действием [108]. Многие исследователи отмечают, что токсичность никлозамида в отношении опухолевых клеток человека значительно выше, чем при действии на нормальные клетки соответствующих тканей [38, 94, 95, 102, 104, 108, 133, 136, 137, 139, 224], что обеспечивает наличие широкого терапевтического диапазона. Различия в чувствительности нормальных и опухолевых клеток к действию биологически активного вещества могут быть связаны с несколько разным механизмом его действия в данных клетках [161], однако в случае с никлозамидом это, по-видимому, не так. Молекулярными мишениями никлозамида в нормальных клетках млекопитающих могут быть митохондрии [89, 119, 143, 144, 156, 206] и сигнальные пути Wnt/β-катенин [36, 47, 51, 68, 142], STAT3 [164, 233], Notch [36], NF-κB [36, 228], mTOR [33, 79, 116] и некоторые другие [228]. В то же время повреждение митохондрий и ингибирование указанных молекулярных каскадов при действии препарата наблюдается и в опухолевых клетках. Механизмы цитотоксического действия никлозамида на опухолевые клетки различных типов анализируются ниже.

## **1.2. Механизмы цитотоксического действия никлозамида в отношении опухолевых клеток**

Механизмы действия никлозамида в отношении опухолевых клеток интенсивно исследуются многими группами учёных. Например, за прошедшие 10 лет было изучено влияние препарата на активность 5 сигнальных путей в более чем 15 типах опухолевых клеток. Конечно, как справедливо отмечают некоторые авторы, в этой области знаний существуют пробелы [13, 66, 122, 128, 154, 194, 202, 231, 251], однако накопленные данные всё же позволяют сделать определённые выводы о действии никлозамида на молекулярном уровне.

### **1.2.1. Сигнальный путь Wnt/β-катенин**

Одним из важнейших сигнальных путей, тесно связанных с эмбриогенезом, жизнедеятельностью стволовых клеток и развитием злокачественных новообразований, является сигнальный путь Wnt (wingless-type MMTV integration site family). Данный эволюционно-консервативный молекулярный каскад принято условно разделять на канонический ( $\beta$ -катенин-зависимый) и неканонический ( $\beta$ -катенин-независимый) [54, 247]. К последнему относят все способы трансмембранный передачи сигнала от белков Wnt, не зависящие от  $\beta$ -катенина, включая регуляцию внутриклеточного уровня кальция и взаимного расположения (полярности) клеток [85]. Наиболее изученным, особенно в контексте канцерогенеза, является канонический сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин (рис. 2) [10].



В неактивном состоянии (рис. 2А), т.е. в отсутствие белков Wnt, под действием расположенного в цитоплазме супрамолекулярного «дестабилизирующего комплекса», состоящего из белка Axin, связывающего  $\beta$ -катенин, белка аденоматозного полипоза кишечника (APC) и двух регуляторных протеинкиназ – киназы гликогенсинтазы (GSK3 $\alpha/\beta$ ) и казеинкиназы (CK1 $\alpha/\delta$ ), происходит фосфорилирование  $\beta$ -каптина по аминокислотным остаткам Сер33, Сер37, Сер45 и Тре41, который далее распознаётся входящим в состав убиквитинлигазы белком  $\beta$ -TrCP и подвергается убиквитинированию и протеолитическому расщеплению с участием 26S протеасомы, что позволяет строго контролировать концентрацию активного (дефосфорилированного)  $\beta$ -каптина в цитоплазме и поддерживать её на очень низком уровне. В отсутствие  $\beta$ -каптина в ядре клетки под влиянием факторов транскрипции семейства TCF/LEF (T-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор), белка TLE и деацетилаз гистонов происходит угнетение экспрессии генов-мишеней [54, 247].

Активация сигнального пути (рис. 2Б) происходит при связывании секретированных гликопротеинов Wnt (у млекопитающих обнаружено 19 видов, например, Wnt3A, Wnt7A) с находящимся на мемbrane гетеродимерным рецепторным комплексом, состоящим из трансмембранных белков Frizzled (у млекопитающих обнаружено 10 видов, например, Frizzled1) и LRP 5/6. Вследствие конформационных изменений рецепторного комплекса под действием GSK3 $\beta$  и CK1 $\alpha$  цитоплазматические домены корецепторов LRP 5/6 фосфорилируются по аминокислотным остаткам Тре1479, Сер1490 и Тре1493, что способствует связыванию С-концевых участков рецепторов Frizzled с PDZ-доменами цитоплазматических белков Dishevelled (у млекопитающих обнаружено 3 вида, например, Dishevelled-2), которые после полимеризации совместно с фосфорилированными корецепторами LRP 5/6 взаимодействуют с белком Axin «дестабилизирующего комплекса», вызывая диссоциацию последнего, что приводит к ингибированию фосфорилирования, убиквитинирования и расщепления  $\beta$ -катенина и его стабилизации. Накопление дефосфорилированного  $\beta$ -катенина в цитоплазме клетки сопровождается его транслокацией в ядро и связыванием с факторами транскрипции семейства TCF/LEF, что вызывает отщепление белка TLE и присоединение нескольких коактиваторов и гистон-модифицирующих ферментов с образованием активного комплекса, взаимодействующего с промоторными участками генов-мишеней, таких как циклин D1, сурвивин, с-Myc, Axin1, Axin2, Naked1, S100A4, матриксная металлопротеиназа-9 (MMP9), TCF1, LEF1, PPAR $\gamma$ , костные морфогенетические белки, белки множественной лекарственной устойчивости, и инициирующего их экспрессию [54, 247]. Активация сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин, обусловленная в том числе мутациями в генах, кодирующих белки «дестабилизирующего комплекса» (APC, Axin) и  $\beta$ -катенин, обнаружена в опухолевых клетках различных типов [107, 185]. В связи с этим ингибиторы сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин рассматриваются в качестве перспективных противоопухолевых препаратов [10, 247].

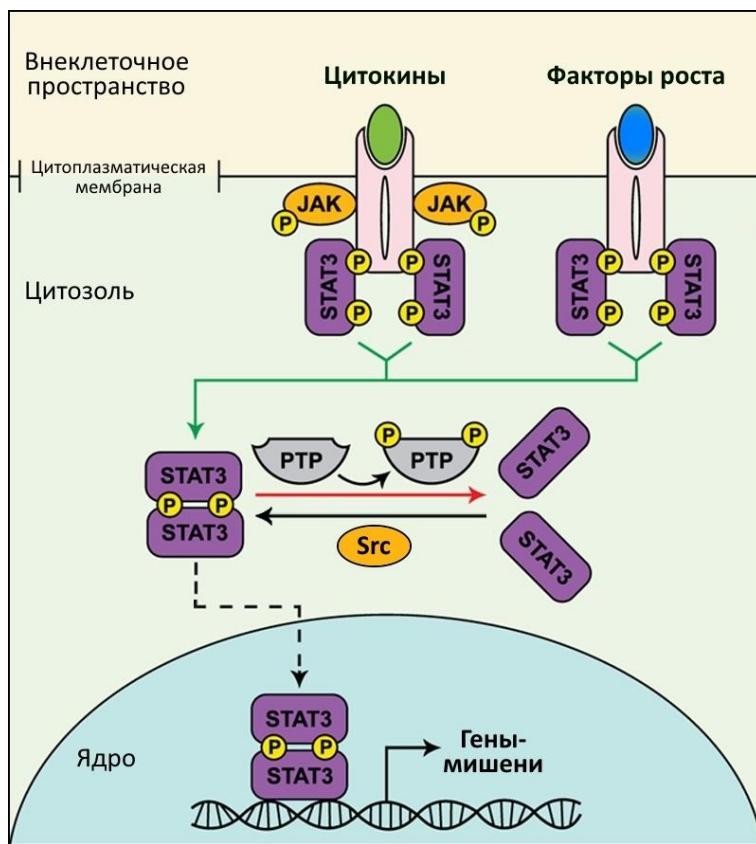
Об ингибировании канонического сигнального пути Wnt/β-катенин в клетках обычно судят по уменьшению количества LRP6, Dishevelled-2 и β-катенина в цитоплазме, снижению активности факторов транскрипции TCF/LEF и понижению уровня экспрессии генов-мишеней. Показано, что такие изменения наблюдаются при действии никлозамида на клетки остеосаркомы [41, 42], КРР [13, 156, 157, 169], рака предстательной железы [142], тройного негативного рака молочной железы [140, 142], печеночноклеточного рака [209], ретинобластомы [125], рака яичников [22, 111], лейомиомы матки [167], адренокортикального рака [191], почечноклеточного рака [251],uveальной меланомы [253]. Здесь стоит упомянуть о способности никлозамида блокировать активацию сигнального пути Wnt/β-катенин в опухолевых клетках, стимулированных Wnt3A [41, 42, 140, 209] и солями лития (ингибитор GSK3β) [167]. Были предприняты попытки установить конкретную мишень действия никлозамида в сигнальном пути Wnt/β-катенин. Так, Chen и соавт. обнаружили, что при действии препарата на клетки остеосаркомы линии U2OS ускоряется эндоцитоз рецепторов Frizzled1 [41, 42]. Согласно данным Lu и соавт., никлозамид уменьшает время полужизни белка LRP6 с 6,9 до 2,3 часа в клетках рака предстательной железы линии PC-3 [142]. Результаты Sack и соавт. [189] и Monin и соавт. [154] показывают, что в клетках КРР никлозамид не влияет на процесс транслокации β-катенина в ядро, но препятствует образованию активного комплекса β-катенина с факторами транскрипции семейства TCF/LEF, что может быть связано со снижением уровня экспрессии коактиватора Bcl9. Снижение активности сигнального пути Wnt/β-катенин также может быть следствием конкурентного ингибирования образования комплекса GSK3β-Axin2, обусловленного взаимодействием никлозамида с гидрофобными радикалами аминокислотных остатков Axin-связывающего участка киназы GSK3β [13].

По мнению некоторых исследователей, эффекты никлозамида на клеточном уровне обусловлены именно его способностью снижать активность сигнального пути Wnt/β-катенин [125, 154, 169]. К примеру, ингибирование миграции и инвазивности опухолевых клеток при действии препарата связывают со

снижением экспрессии генов-мишеней S100A4 и MMP9 [189, 208, 253]. Однако полностью исключить существование других молекулярных механизмов противоопухолевого действия никлозамида не представляется возможным [98, 251].

### **1.2.2. Сигнальный путь STAT3**

Важную роль в передаче внутрь клетки сигналов из окружающей среды играет семейство белков STAT (signal transducer and activator of transcription), включающее шесть факторов транскрипции млекопитающих (STAT1–6). STAT3 – один из членов данного семейства, активность которого часто бывает повышена во многих типах опухолевых клеток. Регуляция функциональной активности белка STAT3 осуществляется путём фосфорилирования-дефосфорилирования (рис. 3). Известно, что фосфорилирование находящегося в цитоплазме клетки STAT3 по аминокислотному остатку Тир705, приводящее к его активации, может осуществляться Янус-киназами (JAK1, JAK2), передающими сигнал от рецепторов к цитокинам (интерферонам, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10), тирозинкиназами, связанными с рецепторами факторов роста (EGFR, HGF), а также тирозинкиназой, не связанной с рецепторами факторов роста (Src). После активации происходит димеризация фосфорилированных молекул STAT3 и транслокация димеров в ядро, где они активируют транскрипцию большого количества генов, включая Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, циклин D1, c-Myc, матриксные металлопротеиназы, Rac, Rho, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , что способствует повышению выживаемости клеток. Снижение активности сигнального пути происходит при дефосфорилировании STAT3 гидролазами, например, тирозинфосфатазой PTPMeg2 [32, 105]. Ранее было показано, что блокирование STAT3 приводит к ингибированию роста опухолей *in vivo* [200]. В последние годы ведётся активный поиск низкомолекулярных ингибиторов STAT3, которые могли бы использоваться в клинике [225].



**Рисунок 3.** Сигнальный путь STAT3 (адаптировано из [146]).

PTP – тирозинфосфатаза. Пояснения в тексте.

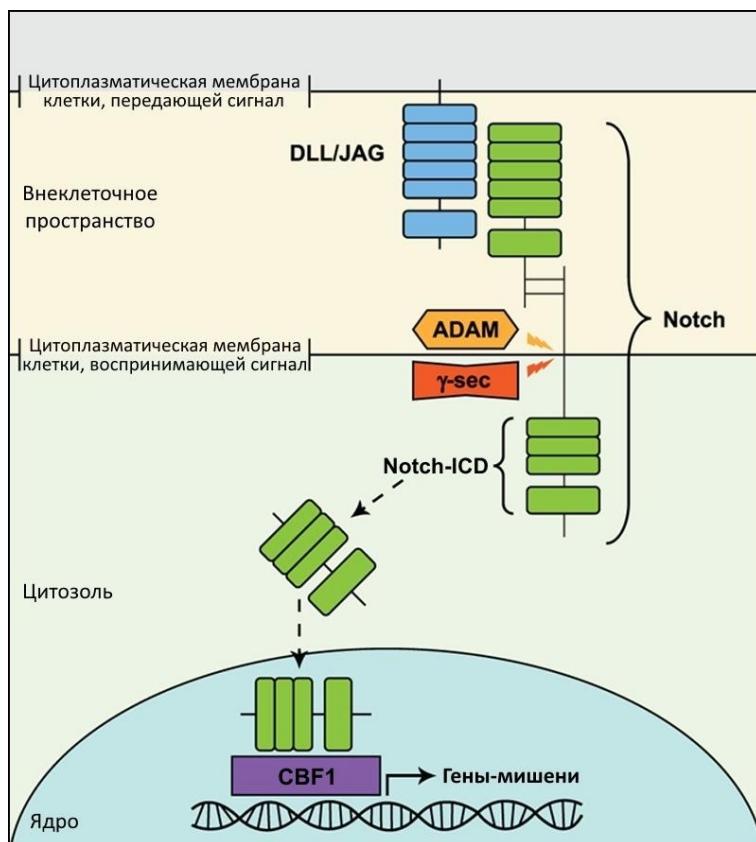
Способность никлозамида ингибировать сигнальный путь STAT3 была впервые показана Ren и соавт. при скрининге коллекции, включающей 1500 соединений, с помощью репортерной системы, основанной на использовании люциферазы [183]. С помощью этой системы в клетках рака шейки матки линии HeLa было обнаружено пропорциональное дозе подавление активности STAT3-зависимого репортерного гена при действии никлозамида. В ходе дальнейших исследований было изучено влияние никлозамида на активность сигнального пути STAT3 в клетках рака предстательной железы [132, 183], рака поджелудочной железы [123], светлоклеточной карциномы яичников [244], множественной миеломы [108], рака молочной железы [39, 240], КРР [123, 194, 238], рака лёгкого [138, 147]. Авторы некоторых из вышеперечисленных работ отметили уменьшение общего количества STAT3 в опухолевых клетках при действии никлозамида [39, 138], однако результаты большинства исследований указывают на то, что данный препарат избирательно снижает уровень

fosфорилированного белка STAT3 и блокирует его повышение, происходящее под действием ИЛ-6 [108, 132] и вследствие гиперэкспрессии WSTF [147], ИЛ-6 и STAT3 [132]. Более того, никлозамид препятствует вызванной EGF транслокации STAT3 в ядро [183], ингибирует его транскрипционную активность [39, 132] и вызывает снижение уровня экспрессии генов-мишеней, что в конечном итоге приводит к блоку клеточного цикла, индукции апоптоза, подавлению миграции, ингибированию инвазивности, снижению колониеобразующей активности и выживаемости опухолевых клеток. Ингибирование никлозамидом сигнального пути STAT3 может быть обусловлено снижением активности некоторых внутриклеточных киназ [183, 238, 240], а также взаимодействием препарата непосредственно с белком STAT3. Способность никлозамида образовывать водородные связи с радикалами аминокислотных остатков Лиз591, Глу594, Арг595, Сер636 SH2-домена белка STAT3, препятствуя его фосфорилированию по Тир705, была продемонстрирована с помощью компьютерного моделирования (молекулярный докинг) [194], однако не была подтверждена экспериментально [80, 183]. В литературе встречаются противоречивые данные относительно способности никлозамида взаимодействовать с ДНК-связывающим доменом белка STAT3 [80, 183]. В то же время нельзя исключить возможность косвенного ингибирующего действия никлозамида в отношении молекулярного каскада STAT3 [80, 120, 121].

### **1.2.3. Сигнальный путь Notch**

Сигнальный путь Notch (рис. 4) участвует в регуляции большого количества процессов жизнедеятельности клеток различных тканей и органов. Изменение его активности может приводить к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических [18]. Лиганды Delta-1, Delta-3, Delta-4, Jagged-1, Jagged-2 и рецепторы Notch (у млекопитающих известна экспрессия 4 генов рецепторов – Notch1–4) являются трансмембранными белками, которые локализуются на поверхности клеток, расположенных рядом друг с другом. При связывании лиганда с рецептором под действием металлопротеиназ ADAM происходит

отщепление внеклеточного домена рецептора, сопровождающееся отщеплением  $\alpha$ - и  $\gamma$ -секретазами внутриклеточного домена Notch-ICD, представляющего собой активную форму рецептора. Находящийся в цитоплазме Notch-ICD либо подвергается убиквитинированию и протеасомной деградации, либо транслоцируется в ядро, где совместно с ДНК-связывающим белком CBF1 и рядом других белков активирует транскрипцию генов-мишеней, таких как HES-1, Hey-1, Hey-2, c-Myc и др. [30]. Важно отметить, что Notch-ICD чрезвычайно трудно обнаружить в нормальных клетках, хотя даже в очень небольших количествах он вызывает биологические эффекты. 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 [46].



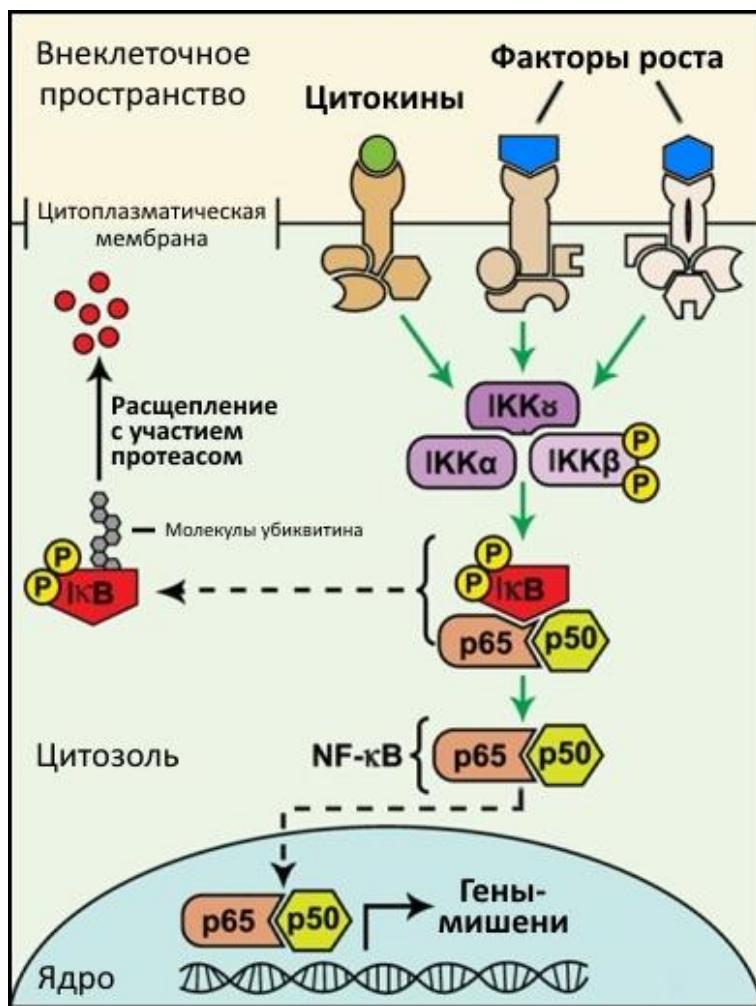
**Рисунок 4.** Сигнальный путь Notch (адаптировано из [146]). DLL – лиганды Delta, JAG – лиганды Jagged,  $\gamma$ -sec –  $\gamma$ -секретаза. Пояснения в тексте.

Влияние никлозамида на активность сигнального пути Notch в опухолевых клетках освещено в литературе гораздо скромнее, чем его действие на другие молекулярные каскады: найдено только две научные работы, посвящённые

целенаправленному исследованию изменений в трансдукции сигнала Notch при действии никлозамида. Для скрининга препаратов, способных регулировать активность сигнального пути Notch, Wang и соавт. использовали репортерную систему, с помощью которой в клетках эритролейкоза линии K562 было обнаружено пропорциональное дозе и времени инкубации подавление активности CBF1-зависимого репортерного гена люциферазы при действии никлозамида [215]. Инкубация опухолевых клеток с препаратом в нетоксичной концентрации 1,25 мкМ в течение 24 часов также приводила к снижению экспрессии циклина D1 и с-Myc на уровне мРНК и белка и Notch-ICD и HES-1 на уровне белка; однако снижения экспрессии Hey-1, Notch1 и HES-1 на уровне мРНК отмечено не было, в то время как наблюдалось увеличение количества мРНК Hey-2, что авторы связывают со сложной системой регуляции транскрипции данных генов. Никлозамид не приводил к блоку клеточного цикла и снижению колониеобразующей активности клеток линии K562, но стимулировал их эритроидную дифференцировку. Несмотря на то, что разработанная авторами репортерная система не позволяет определить, какой именно тип рецептора Notch регулирует экспрессию репортерного гена люциферазы при действии никлозамида, полученные результаты позволили им сделать заключение об участии данного препарата в регуляции активности сигнального пути Notch. Результаты другого исследования [202] указывают на то, что никлозамид приводит к уменьшению количества белков Notch1, Notch2, Notch3 и Hey-1, ингибирует пролиферацию, подавляет миграцию и индуцирует апоптоз клеток КРР линий LoVo, SW620 и HCT116. Кроме того, было отмечено повышение уровня экспрессии различных микроРНК в опухолевых клетках при действии никлозамида. Впрочем, являются ли наблюдаемые эффекты следствием прямого или косвенного ингибирования никлозамидом сигнального пути Notch, ещё предстоит установить.

#### 1.2.4. Сигнальный путь NF-кВ

Регуляция процессов жизнедеятельности клетки под воздействием различных внешних и внутренних факторов может осуществляться посредством сигнального пути NF-кВ (рис. 5). Показано участие данного молекулярного каскада в развитии воспалительных и иммунных реакций, а также его важная роль в возникновении и прогрессировании опухолей [230]. Центральное место в системе передачи внутриклеточного сигнала занимает семейство белков NF-кВ (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), включающее пять факторов транскрипции млекопитающих (NF-кВ1 (p50), NF-кВ2 (p52), RelA (p65), RelB, c-Rel), находящихся в цитоплазме в виде гетеродимерных комплексов, связанных со специфическими ингибиторами IкВ, что обеспечивает их неактивное состояние. При взаимодействии цитокинов (ФНО $\alpha$ ) и факторов роста (EGF, TGF $\beta$ ) с соответствующими рецепторами или при действии иного «активирующего сигнала» (бактериальных токсинов, ионизирующего излучения, повышения внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК)) происходит фосфорилирование и активация киназ IKK, которые, в свою очередь, фосфорилируют ингибиторный белок IкВ. Комплекс NF-кВ и IкВ диссоциирует, при этом последний подвергается убиквитинированию и протеолитическому расщеплению с участием 26S протеасомы. Высвободившиеся транскрипционные факторы NF-кВ транслоцируются в ядро клетки, где активируют транскрипцию различных генов, в том числе Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, циклин D1, c-Myc, сурвивин, MMP9, CCL2, CCL20, ICAM-1, Fas, ИЛ-6, IкВ, приводя, в частности, к подавлению апоптоза, повышению выживаемости и усилиению пролиферации опухолевых клеток [1, 162].



**Рисунок 5.** Сигнальный путь NF-κВ (адаптировано из [146]). Пояснения в тексте.

Изменение активности сигнального пути NF-κВ при действии никлозамида было обнаружено в различных типах опухолевых клеток; при этом, в качестве «активирующего сигнала» большинство исследователей использовали ФНО $\alpha$ . Показано, что никлозамид ингибирует вызванные ФНО $\alpha$  фосфорилирование киназ IKK $\alpha$  и IKK $\beta$ , фосфорилирование и деградацию ингибиторного белка I $\kappa$ B $\alpha$ , транслокацию p65 в ядро, взаимодействие p65 с ДНК, транскрипционную активность p65 и экспрессию генов-мишеней в лейкозных клетках линий HL-60 и Molm13 [104]. Схожие результаты были получены с использованием клеток множественной миеломы линии UM3 [108], карциномы шейки матки линии HeLa [205],uveальной меланомы линий Mel270 и Omm1 [253], карциномы лёгкого линий A549 и H460 [199] и остеосаркомы линии U2OS [104]. Важно отметить, что эффективность ингибирующего действия никлозамида в отношении сигнального

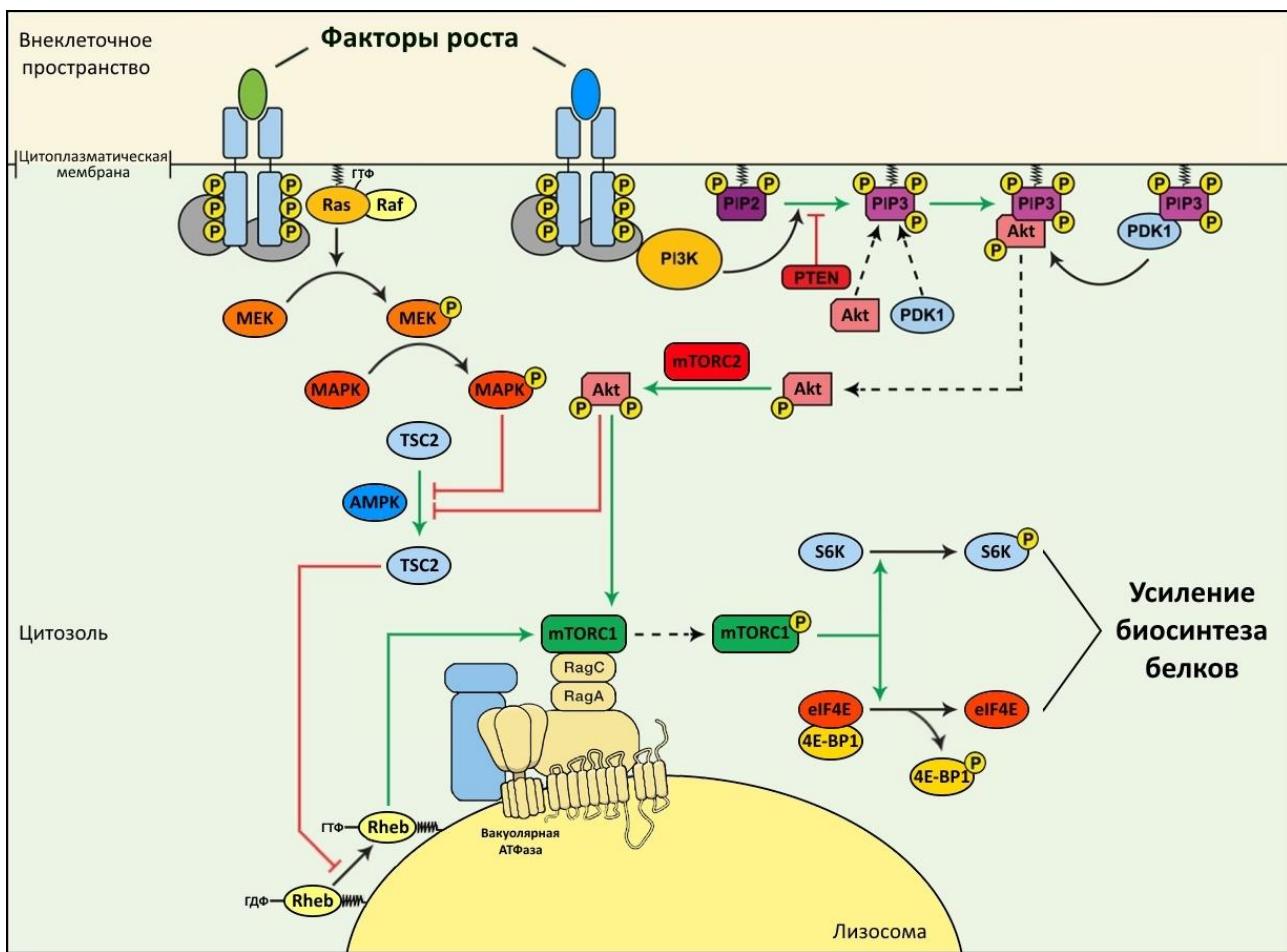
пути NF-кВ была показана также в опухолевых клетках пациентов, стимулированных ФНО $\alpha$ , и в опухолевых клетках стандартных линий с высокой эндогенной активностью данного молекулярного каскада [104]. По мнению некоторых исследователей, снижение активности сигнального пути NF-кВ в опухолевых клетках при действии никлозамида может быть обусловлено как его способностью ингибировать реакции фосфорилирования, в том числе за счёт непосредственного взаимодействия с киназами [104], так и его влиянием на активность других сигнальных путей, связанных с каскадом NF-кВ [199].

### **1.2.5. Сигнальный путь mTOR**

Одним из главнейших регуляторов внутриклеточной сигнальной трансдукции, «замыкающим» на себе несколько сигнальных путей, имеющих важное значение для опухолевой прогрессии, является молекулярный каскад, включающий серин-треониновую протеинкиназу mTOR (mammalian target of rapamycin) (рис. 6). В клетках млекопитающих данная протеинкиназа входит в состав двух функционально различных белковых комплексов – mTORC1, контролирующего интенсивность анаболических и катаболических процессов, и mTORC2, регулирующего ремоделирование актинового цитоскелета. Будучи в активном состоянии, mTORC1 фосфорилирует киназу рибосомного белка S6 (S6K1), приводя к её активации, и белок-супрессор 4E-BP1, инактивируя его и способствуя высвобождению связанного с ним фактора инициации трансляции eIF4E, в результате чего происходит стимулирование биосинтеза белков [6]. Активация киназы mTOR, входящей в комплекс mTORC1, может осуществляться по нескольким механизмам. При реализации эффекта факторов роста с участием Ras- и Raf-белков митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK) фосфорилирует и инактивирует белок-супрессор опухолей TSC2, ингибитор mTORC1, что сопровождается снижением ГТФ-фосфатазной активности белка Rheb, увеличением его сродства к ГТФ и последующей активацией mTORC1. В то же время при передаче сигнала от факторов роста через фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) происходит активация протеинкиназы B (Akt), способной не только

инактивировать белок TSC2, но и непосредственно фосфорилировать и активировать mTORC1 [192]. Важно отметить, что доступность питательных веществ также влияет на активность mTORC1. Известно, что на мембране лизосом находится белковый комплекс, включающий, в том числе, ГТФазы RagA/B/C/D и вакуолярную  $H^+$ -АТФазу. Взаимодействие данного комплекса с аминокислотами, например, аргинином и лейцином, находящимися в достаточном количестве в цитоплазме и лизосомах, сопровождается снижением ГТФ-fosфатазной активности белков Rag и увеличением их сродства к ГТФ и находящемуся в цитоплазме mTORC1, который в присутствии связанного с ГТФ белка Rheb переходит в активное состояние, что приводит к повышению интенсивности биосинтеза белков и, в конечном итоге, к росту и пролиферации клеток, в том числе опухолевых [188]. Напротив, при недостатке питательных веществ происходит ингибирование сигнального пути mTOR и, как следствие, индукция аутофагии, т.е. процесса «поедания клеткой самой себя», направленного на восполнение пула необходимых для жизнедеятельности клетки метаболитов, который, однако, в определённых условиях может приводить и к её гибели [81].

Важная роль киназы mTOR в регуляции внутриклеточного метаболизма и её тесная взаимосвязь с сигнальными каскадами PI3K/Akt и Ras/Raf/MEK/MAPK, гиперактивация которых часто обнаруживается в опухолевых клетках, позволяет рассматривать ингибиторы сигнального пути mTOR в качестве возможных противоопухолевых препаратов. К настоящему моменту разработано несколько поколений таких средств, включая аналоги рапамицина, конкурентные ингибиторы киназ PI3K и mTOR и др., уже применяемых в клинической практике или находящихся в разных фазах клинических исследований. В то же время продолжается активный поиск соединений с иными механизмами действия, способных влиять на активность молекулярного каскада mTOR [204, 234].



**Рисунок 6.** Сигнальный путь mTOR (адаптировано из [146, 192]). PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, PDK1 – 3-фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа-1, PTEN – фермент подкласса фосфатаз. Пояснения в тексте.

Признаки снижения активности сигнального пути mTOR в опухолевых клетках при действии никлозамида были впервые обнаружены Balgi и соавт. [25]. Так, авторы отметили уменьшение содержания фосфорилированных белков S6K, 4E-BP1 и 4E-BP2 в клетках аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при их инкубации с препаратом. В дальнейшем ингибирующее действие никлозамида в отношении сигнального пути mTOR было показано и в опухолевых клетках других тканей [40, 116, 123], однако точный механизм не был полностью раскрыт. Согласно опубликованным данным, никлозамид не снижает катализическую активность киназы mTOR и не нарушает процесс образования комплекса mTORC1 [79]; более того, действие никлозамида реализуется, по-видимому, не

из-за прерывания передачи молекулярного сигнала к mTORC1 по каскадам PI3K/Akt [25, 33, 52, 53, 79] и Ras/Raf/MEK/ERK/MNK [79, 139]. Эти результаты в совокупности с данными об эффективности ингибирующего действия никлозамида на трансдукцию сигнала через киназу mTOR в клетках с гиперактивацией mTORC1, обусловленной мутациями в TSC2 [25], Rheb [79] и RagA [116], указывают на преимущественную роль лизосом в изменении активности сигнального пути mTOR при действии препарата. Действительно, в работах [52, 53, 79, 116] было показано, что никлозамид за счёт протонофорной активности снижает протонный градиент между лизосомами и цитоплазмой, что приводит, с одной стороны, к повышению величины pH в лизосомах и, как следствие, снижению протеолитической активности катепсинов, а с другой стороны, к снижению величины pH цитоплазмы, что может лежать в основе ингибирования киназы mTOR в составе комплекса mTORC1. Индукция аутофагии, происходящая в этих условиях [25, 52, 53, 108, 116, 177], может отчасти обуславливать цитотокическое действие никлозамида в отношении опухолевых клеток.

В целом, глубокий анализ имеющихся литературных данных о механизмах цитотокической активности никлозамида в отношении опухолевых клеток позволяет сделать заключение об отсутствии специфической молекулярной мишени действия препарата. Здесь важно выделить ряд научных работ, авторы которых отметили одновременное изменение активности разных сигнальных путей в опухолевых клетках различного происхождения при их инкубации с никлозамидом [20, 21, 44, 66, 128, 224]. Думается, что в основе наблюдаемых плейотропных эффектов данного препарата может лежать его действие на определённый интегративный процесс, изменение характера протекания которого отражается на столь внушительном количестве внутриклеточных реакций. Некоторые исследователи считают, что в качестве такого «процесса» может выступать убиквитинирование/деубиквитинирование клеточных белков [82, 231] или фолдинг клеточных белков с участием шаперона-90 [38], однако результаты проведённых исследований позволяют полагать, что основной причиной

кажущейся множественности механизмов действия никлозамида является его влияние на митохондрии и энергетический обмен опухолевых клеток.

### **1.2.6. Влияние на функциональную активность митохондрий**

Митохондрии – двумембранные внутриклеточные органеллы, выполняющие целый ряд функций, включая генерирование энергии, регулирование окислительно-восстановительного состояния клетки, синтез различных химических соединений, обеспечение передачи сигналов посредством ионов кальция и участие во внутреннем пути индукции апоптоза [4]. В исследованиях последних лет накапливаются данные, позволяющие рассматривать митохондрии в качестве перспективной мишени действия новых противоопухолевых препаратов, поскольку их повреждение может приводить к нарушению энергетического обмена и инициации гибели опухолевых клеток. Активно разрабатываются способы фармакологического воздействия на свойства мембран митохондрий, активность высокомолекулярных комплексов цепи переноса электронов, скорость метаболических реакций цикла Кребса, процессы репликации митохондриальной ДНК и трансляции митохондриальных белков, интенсивность внутриклеточных сигналов индукции апоптоза и др. [166, 220].

Совокупность опубликованных данных свидетельствует об эффективном действии никлозамида на митохондрии в лейкозных клетках [58, 103, 104], клетках рака шейки матки [26, 40, 177], множественной миеломы [108], рака предстательной железы [144], адренокортикального рака [191], почечноклеточного рака [251], уvealной меланомы [253] и папиллярной карциномы щитовидной железы [246]. Так, препарат приводил к быстрому снижению митохондриального электрохимического потенциала, разобщению клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, снижению уровня АТФ и увеличению образования АФК, в том числе митохондриального супероксиданион-радикала (МСОАН); в отдельных работах было отмечено также снижение активности комплекса I цепи переноса электронов [40] и усиление деления митохондрий [177]. Развитие окислительного стресса в опухолевых

клетках при их инкубации с никлозамидом, сопровождающееся истощением антиоксидантной глутатионовой защиты (снижением уровня глутатиона) [91] и повреждением ДНК (образованием остатков 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина) [40] в совокупности со снижением уровня антиапоптотических факторов Bcl-2, Mcl-1 и XIAP [103, 104, 126, 246] и высвобождением из межмембранных пространства митохондрий в цитоплазму такого проапоптотического фактора как цитохром c [103, 104, 253] обуславливает инициацию каспазоопосредованного апоптоза [40, 103, 104, 108, 126, 177, 191, 246, 253]. Важность индукции окислительного стресса как этапа реализации цитотоксического действия никлозамида подтверждается тем, что использование N-ацетилцистеина приводит к нейтрализации АФК и снижению эффективности действия данного препарата [40, 104, 253].

Как уже было указано ранее, ингибирование активности различных сигнальных путей в опухолевых клетках в присутствии никлозамида может быть следствием его первичного действия на митохондрии. Так, преимущественное снижение уровня фосфорилированных форм ферментов сигнальных каскадов STAT3, NF-кВ и mTOR обусловлено, по-видимому, угнетением процессов фосфорилирования вследствие уменьшения внутриклеточного содержания АТФ, а не из-за прямого ингибирования никлозамидом каталитической активности протеинкиназ [79, 110, 183] (стоит отметить, что данных о прямом влиянии никлозамида на активность протеинфосфатаз в литературе не найдено). Более того, уменьшение образования цАМФ из АТФ в условиях разобщения клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования может препятствовать активации протеинкиназы А и приводить к ингибированию фосфорилирования  $\beta$ -катенина по аминокислотным остаткам Сер552 и Сер675 и снижению активности сигнального пути Wnt [58, 253]. С другой стороны, блокирование распространения сигнала по каскаду mTOR может быть связано с активацией белка TSC2 [156] и NAD-зависимой деацетилазы SIRT1 [83] под действием киназы AMPK, активной в условиях гипознергетического состояния и возрастания соотношения АМФ/АТФ.

Итак, обсуждение и уточнение молекулярных механизмов цитотоксической активности никлозамида в отношении опухолевых клеток продолжается. Этому способствует проведение новых исследований и появление новых экспериментальных данных. Напротив, у подавляющего большинства авторов не вызывает сомнений эффективность действия никлозамида в отношении широкого спектра опухолей (приложение 1), в связи с чем они уверенно говорят о целесообразности изучения никлозамида в качестве нового противоопухолевого средства в экспериментах с использованием лабораторных животных.

### **1.3. Противоопухолевая активность никлозамида в экспериментах *in vivo***

Изучению противоопухолевой активности никлозамида предшествовало исследование общетоксического действия этого препарата с использованием лабораторных животных. Согласно результатам исследований острой токсичности, значение LD<sub>50</sub> никлозамида при пероральном введении составляет выше 5000 мг/кг для крыс и выше 1500 мг/кг для мышей, а при внутрибрюшинном введении – 610–750 мг/кг и 210 мг/кг для крыс и мышей соответственно. При изучении подострой (субхронической) токсичности никлозамида было показано, что пероральное введение данного препарата в дозе 2000 мг/кг 6 дней в неделю в течение 4 недель не сопровождается развитием побочных эффектов у крыс [19, 226]. Наличие вышеуказанных данных, свидетельствующих об отсутствии «кумулятивной» токсичности, хорошей переносимости и широких границах безопасного диапазона концентраций никлозамида, стимулировало исследование его противоопухолевой активности в экспериментах *in vivo*.

В этих исследованиях авторы использовали модели сингенной [34, 238, 240] и ксеногенной трансплантации опухолей мышей. В ксеногенных моделях использовали иммунодефицитных мышей SCID [130, 131, 133], NOD/SCID [169, 189, 243, 251] и nude [13, 66, 111, 118, 121, 136, 137, 191, 245]. В нескольких работах при использовании ксеногенной модели авторы выполняли

ортотопическую трансплантацию опухолевых клеток молочной железы [140], клеток глиобластомы [224] и остеосаркомы [128] человека иммунодефицитным мышам. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ежедневное пероральное (в дозе 100–200 мг/кг) или внутрибрюшинное (в дозе 10–30 мг/кг) введение никлозамида в течение 2–5 недель приводит к торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни животных. Признаков общей или специфической токсичности при этом не наблюдалось, что подтверждалось данными гистологических, гематологических и биохимических исследований. В опухолевой ткани при введении никлозамида наблюдалось снижение уровня ключевых белков сигнальных путей Wnt/β-катенин, STAT3, NF-κB и mTOR, уменьшение количества пролиферирующих клеток и увеличение количества клеток в состоянии апоптоза, а также угнетение ангиогенеза [240] и формирования сосудистоподобных структур [121] и уменьшение количества Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> супрессорных клеток миелоидного происхождения [238, 240]. Кроме того, обнаружена способность никлозамида ингибировать образование метастазов [138, 189, 240]. Исходя из полученных с использованием лабораторных животных данных, полагают, что использование никлозамида может оказаться перспективным для лечения злокачественных новообразований [122].

В то же время фармакокинетические параметры данного препарата могут потребовать дополнительных усилий для его использования [38, 117, 242]. Так, низкая степень абсорбции никлозамида в желудочно-кишечном тракте [37] может затруднить достижение его терапевтической концентрации в плазме крови при пероральном введении. С другой стороны, внутрибрюшинное или внутривенное введение никлозамида может быть ограничено его крайне низкой растворимостью в водных растворах и необходимостью использования солюбилизаторов, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), полиоксиэтилированное касторовое масло (Cremophor® EL), полисорбат-80 и др. В связи с этим в настоящее время значительные усилия направлены на поиск способов повышения растворимости никлозамида в воде и улучшения его фармакокинетических свойств для обеспечения возможности применения в терапии онкологических заболеваний.

Для преодоления низкой растворимости никлозамида были предприняты попытки модификации его химической структуры и использования никлозамида в составе дисперсных систем.

При исследовании взаимосвязи молекулярной структуры никлозамида и его активности установлено, что большая часть изменений в типе и положении заместителей в обоих бензольных кольцах приводит к снижению или полной потере биологической активности [79, 155, 189, 205]. При этом, было обнаружено, что важнейшими функциональными элементами молекулы являются электроноакцепторная нитрогруппа, амидная группа и фенольный гидроксил. В связи с этим повышение растворимости никлозамида в воде осуществлялось за счёт получения «пролекарств» – эфиров препарата с 2-аминоэтанолом [39], фосфорной кислотой [103, 104, 253], карбаминовой кислотой [20, 21, 214] и октановой кислотой [157]. Авторами работы [39] было синтезировано производное, обладающее более высокой растворимостью (762 мг/л при 0,19–8,11 мг/л у никлозамида [19]) и эффективностью действия в отношении опухолевых клеток линии MDA-MB-231 *in vivo*. Однако модификация химической структуры никлозамида для повышения его растворимости приводит к необходимости использования химического соединения, изучение которого требует проведения новых дополнительных исследований.

Альтернативным подходом к улучшению фармакокинетических свойств и повышению эффективности действия никлозамида является получение дисперсных систем, содержащих этот препарат. Среди вновь разработанных форм никлозамида можно выделить наносусpenзии, стабилизированные полисорбатом-80 [241], поливиниловым спиртом [24, 129] и октенилсукцинатгидроксипропилфитогликогеном [235]; твёрдые липидные частицы, полученные с использованием стеариновой кислоты, полисорбата-80 и полиэтиленглиоля [182]; микроэмulsionи, полученные с использованием олеиновой кислоты и моноолеата полиэтиленглиоля [249]; углеродные наночастицы с осаждёнными на них комплексами никлозамида с кукурубит[6]урилом [171]; мезопористые кремнийоксидные материалы,

содержащие никлозамид [174, 175]; комплексные системы на основе полимерных нановолокон [71, 113, 201]; полимерные мицеллы [28, 152, 187] и полимерные наночастицы на основе хитозана [163] и бычьего сывороточного альбумина [29]. При использовании указанных форм отмечено повышение биодоступности никлозамида при пероральном введении лабораторным животным [129, 182, 249] и его цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток различных линий [171, 187, 235]. В настоящее время продолжается разработка и других способов «включения» никлозамида в полимерные носители. Так, в качестве перспективного носителя никлозамида может быть использован сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA): этот препарат, разрешённый для клинического использования, обладает такими свойствами, как биосовместимость, биодеградируемость, низкая токсичность и низкая иммуногенность [7].

#### **1.4. Никлозамид как перспективное соединение для комбинированной терапии злокачественных новообразований**

Наряду с исследованием противоопухолевой активности никлозамида активно изучается и возможность его комбинированного использования с классическими химиотерапевтическими препаратами и ионизирующим излучением для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

В ряде публикаций представлены результаты исследования противоопухолевого действия никлозамида при его комбинированном применении с алкилирующими агентами [20-22, 34, 125, 137, 169, 224, 251], интеркалирующими агентами [35, 104], антиметаболитами [13, 35, 104], ингибиторами топоизомеразы II [101, 104], antimитотическими средствами [35, 40], антиандrogenными препаратами [130-134], моноклональными антителами [140, 229] и ингибиторами протеинкиназ [103, 104, 117, 118, 139, 194]. Показана более высокая эффективность действия никлозамида и противоопухолевых препаратов из указанных выше групп при их совместном использовании, выражаясь в более интенсивной индукции апоптоза, снижении выживаемости

и колониеобразующей активности и ингибиции миграции и инвазивности опухолевых клеток *in vitro*, а также в более интенсивном торможении роста опухоли и ингибировании пролиферации клеток опухоли *in vivo*, чем при использовании каждого препарата по отдельности. Обнаружена способность никлозамида повышать чувствительность опухолевых клеток с приобретённой резистентностью к действию химиотерапевтических средств. Так, снижение уровня экспрессии сплайсингового варианта андрогенового рецептора AR-V7 при действии никлозамида приводило к повышению эффективности действия энзалутамида [133, 134], бикалутамида [131] и абиратерона [130] в отношении резистентных клеток рака предстательной железы линий C4-2B MDVR и C4-2B AbiR. Уменьшение содержания белков LRP (lung resistance-related protein) и с-Myc в резистентных клетках рака лёгкого линии A549/DDP при инкубации с никлозамидом способствовало повышению их чувствительности к действию цисплатина [255]. Ингибирование никлозамидом сигнального пути STAT3 позволило преодолеть приобретённую резистентность клеток рака лёгкого линии HCC827/ER к действию эрлотиниба [117]. Полученные данные указывают на возможность повышения эффективности лечения опухолей путём комбинированного использования никлозамида с классическими химиотерапевтическими препаратами.

В последние годы возрастает интерес исследователей к использованию никлозамида в качестве нового малотоксичного радиосенсибилизатора для повышения эффективности лучевой терапии онкологических заболеваний. Способность препарата повышать чувствительность опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения была впервые обнаружена Lee и соавт. при скрининге коллекции, включающей более тысячи соединений [114]. Согласно полученным данным, совместное использование никлозамида и  $\gamma$ -излучения приводит к повышению уровня фосфорилированных белков p38 MAPK и c-Jun в клетках рака лёгкого линии H1299 и увеличению количества клеток в состоянии апоптоза до более высоких значений, чем в случае использования каждого из этих факторов по отдельности. Схожие результаты были получены в работах [232] и

[245], однако в качестве возможных механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток рака лёгкого авторы рассматривали ингибирование молекулярных каскадов STAT3/Bcl-2/Bcl-XL и HIF-1 $\alpha$ /VEGF соответственно. Yin и соавт. [242] было показано, что предварительная обработка клеток тройного негативного рака молочной железы никлозамидом в малотоксичной концентрации приводит к повышению их чувствительности к действию  $\gamma$ -излучения, что может быть обусловлено снижением активности сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин. В то же время появившиеся недавно публикации свидетельствуют о способности никлозамида влиять на количество индуцированных излучением ДР ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы [11] и карциномы носоглотки человека [115]. Как следует из представленных данных, изучение радиосенсибилизирующей активности никлозамида в отношении опухолевых клеток различных линий и молекулярных механизмов, лежащих в её основе, является динамично развивающейся областью исследований, а использование никлозамида в качестве радиосенсибилизатора – перспективным подходом к повышению эффективности лучевой терапии.

Таким образом, анализ литературы позволяет заключить, что никлозамид является перспективным противоопухолевым препаратом. Актуальной проблемой при этом предстаёт низкая растворимость никлозамида, что может влиять на эффективность его действия. Для её решения целесообразно создание новых форм препарата на основе полимерных носителей.

Это позволило сформулировать цель настоящего исследования: изучение противоопухолевой активности никлозамида в свободной и полимерной форме на культурах клеток человека и мыши и изучение его комбинированного и радиосенсибилизирующего действия.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Реагенты

Никлозамид («Sigma-Aldrich», США) для приготовления исходного раствора растворяли в ДМСО («Sigma-Aldrich», США) и хранили в виде 10 мМ стока при -20°C. Для достижения нужной концентрации готовили разведения стока никлозамида в полной культуральной среде; содержание ДМСО при добавлении никлозамида к клеткам не превышало 0,1%. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, «Sigma-Aldrich», США) растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7.4, «Gibco», США) и хранили в виде 5 мг/мл стока при 4°C; родамин-123 («Sigma-Aldrich», США) растворяли в метаноле и хранили в виде 100 мкг/мл стока при -20°C. Следующие реагенты были приобретены в компании «Sigma-Aldrich» (США): 0,4% раствор трипанового синего, бычий сывороточный альбумин (БСА), рибонуклеаза А, йодистый пропидий. Параформальдегид был приобретён в компании «Panreac» (Испания). В качестве стока цисплатина использовали 0,5 мг/мл концентрат для приготовления раствора для инфузий «Цисплатин-ЛЭНС®» («ЛЭНС-Фарм», Россия).

### 2.2. Культивирование клеток различных перевиваемых линий

Клетки меланомы человека линий Mel-8 (MDR1<sup>+</sup> [5]), Mel-10, MS, adenокарциномы ободочной кишки линии Caco-2, карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR, adenокарциномы 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 аденоовириуса типа 5, линии HEK293 и лёгочные эмбриональные фибробласты человека линии ЛЭЧ – культивировали в полной культуральной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы («Gibco», США), содержащей 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота (СПК,

«HyClone», США) и 50 мкг/мл гентамицина («Gibco», США), в пластиковых культуральных фляконах («Corning Costar», США) в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% СО<sub>2</sub>.

### **2.3. Анализ выживаемости клеток с помощью МТТ-теста**

Выживаемость опухолевых и нормальных клеток после инкубации с препаратами оценивали с помощью МТТ-теста по методу [160] с небольшими изменениями. За сутки до добавления препаратов клетки высевали в 96-луночные планшеты («Corning Costar», США) в количестве 3,5 тыс. кл/лунка (линии меланомы) и 10 тыс. кл/лунка (остальные линии) в 100 мкл полной культуральной среды. Исследуемый препарат – никлозамид в свободной и полимерной форме – добавляли в объёме 100 мкл к клеткам не менее, чем в трёх повторах для каждой исследуемой концентрации в диапазоне от 0,1 до 10 мкМ по никлозамиду, и культивировали в течение 72 часов. При приготовлении растворов никлозамида в полимерной форме концентрацию рассчитывали, исходя из содержания никлозамида (%) в полимерном препарате. За 2–4 часа до окончания инкубации в каждую лунку культурального планшета добавляли по 50 мкл раствора МТТ в концентрации 1 мг/мл в среде для культивирования клеток. После развития окраски среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО и измеряли интенсивность окраски по поглощению при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра iMark Microplate Absorbance Reader («Bio-Rad», США). Выживаемость клеток оценивали в процентах от необработанного контроля и по кривым выживаемости рассчитывали значение IC<sub>50</sub> – концентрацию препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток.

### **2.4. Анализ содержания белка MDR1 на мемbrane клеток**

Клетки трижды промывали ФСБ, сусpendировали в ФСБ, содержащем 3% СПК, в концентрации 1×10<sup>6</sup> клеток/мл и инкубировали с моноклональными антителами мыши к CD243 (MDR1), конъюгированными с фикоэритрином (1:20,

«BioLegend», США) 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», США). Для измерения использовали не менее 20 тыс. клеток на пробу. Изотипические моноклональные антитела мыши, конъюгированные с фикоэритрином (1:20, «BioLegend», США), использовали для получения отрицательного контроля.

## **2.5. Анализ содержания белка Bcl-2**

Клетки промывали ФСБ, фиксировали в 2% растворе параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы хранили в ФСБ, содержащем 0,02% NaN<sub>3</sub>, при 4°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки permeabilizировали с помощью ФСБ, содержащего 0,25% тритон X-100 и 2% БСА, в течение 30 мин при комнатной температуре, отмывали в ФСБ, содержащем 0,1% тритон X-100 и 10% СПК, инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши к Bcl-2 (1:20, «Sigma-Aldrich», США) 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», США) 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 («BD Biosciences», США) 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.

## 2.6. 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 (приложение 2). Для получения препарата ПФН использовали: никлозамид, сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA 50/50, «PURAC Biochemicals», Нидерланды), полимер EUDRAGIT RS PO («EVONIK», Германия), поливиниловый спирт (молекулярная масса 30000–70000, «Sigma-Aldrich», США), D-маннитол («Sigma-Aldrich», США) и этилацетат («Химмед Синтез», Россия). Получение полимерных частиц с никлозамидом осуществляли методом эмульгирования в системе «масло/вода» [141] по разработанному в лаборатории методу [3]. Препарат ПФН характеризовали по таким показателям как содержание никлозамида (ВЭЖХ, система Agilent 1100, «Agilent Technologies», Германия), средний размер полимерных частиц (метод динамического рассеяния света, анализатор Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, «Malvern Instruments», Великобритания) и состав стабилизаторов (табл. 1).

**Таблица 1. Характеристика препарата ПФН.**

<b>Состав препарата ПФН</b>		<b>Размер частиц, нм</b>
<b>Вещество</b>	<b>Содержание, %</b>	
Никлозамид	5,2±0,4	
PLGA 50/50	35,1±2,0	
EUDRAGIT RS PO	24,3±1,1	
Поливиниловый спирт	29,0±1,5	240,9±3,1
D-маннитол	6,4±0,3	

## 2.7. 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, как описано в разделе 2.3. Раствор цисплатина готовили путём разбавления готового 0,5 мг/мл концентрата для приготовления раствора для инфузий «Цисплатин-ЛЭНС®» полной культуральной средой до нужной концентрации.

Для исследования характера взаимодействия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина при их комбинированном применении использовали два экспериментальных режима:

- 1) непостоянное соотношение концентраций препаратов, при котором к клеткам добавляли никлозамид и ПФН в диапазоне концентраций от 0,01 до 3,2 мкМ и от 0,01 до 1,2 мкМ (по никлозамиду) соответственно и одновременно цисплатин до конечной концентрации 2,5 и 5 мкМ
- 2) постоянное соотношение концентраций препаратов, при котором к клеткам добавляли предварительно приготовленные общие растворы препаратов в концентрациях, кратных соответствующим значениям IC<sub>50</sub> и взятых в соотношении 1:1, 1:2 и 2:1 для никлозамида и цисплатина или ПФН и цисплатина соответственно

Полуколичественное определение характера взаимодействия препаратов при их комбинированном применении выполняли методом Chou-Talalay [48]. С помощью программы «CompuSyn» («ComboSyn», США) 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).

## **2.8. Получение и характеристика флуоресцентно меченых 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. Препарат ФПН получен стандартным методом нанопреципитации [17] по разработанному в лаборатории методу [2] с использованием предварительно синтезированного блок-сополимера

поли(D,L-лактид-ко-гликолида) (PLGA-COOH 50/50, «LACTEL® Absorbable Polymers», США) и полиэтиленгликоля (PEG, «IRIS Biotech GmbH», Германия) с добавлением вспомогательных компонентов; в качестве флуоресцентной метки использовали флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ, FITC, «Sigma-Aldrich», США). 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. 2.

**Таблица 2. Основные физико-химические характеристики ФПН.**

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

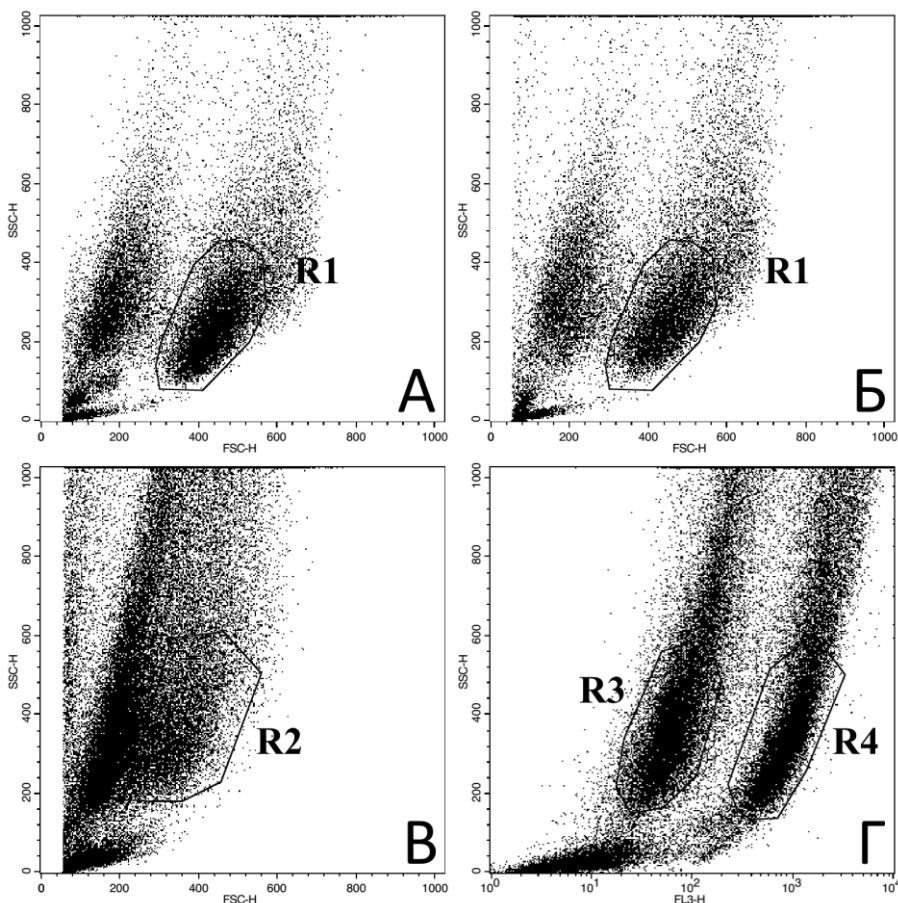
## 2.9. Анализ накопления ФПН опухолевыми клетками

Способность опухолевых клеток накапливать ФПН оценивали по интенсивности флуоресценции ФИТЦ, входящего в состав частиц. Клетки высевали в 12-луночные планшеты («Corning Costar», США) по 400 тыс. кл/лунка, 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, ресусPENDИРОВАЛИ в изотоническом 0,013 М цитратном буфере (рН 4.0), инкубировали в течение 30 с на льду и измеряли интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur («BD Biosciences», США) при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 520 нм, анализировали по 10 тысяч 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 [190]. Для этого к суспензии клеток в цитратном буфере добавляли трипановый синий 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.

Использование трипанового синего для «гашения» флуоресценции только адсорбированных частиц позволяет раздельно оценить общее количество флуоресцентной метки в клетках, её количество внутри клеток и, при необходимости, по разности этих величин рассчитать количество частиц на их поверхности в динамике в процессе культивирования клеток в присутствии наночастиц. При этом, важной проблемой является выбор условий проведения исследований с помощью проточной цитофлуориметрии, обеспечивающих анализ только живых клеток с неповреждённой мембраной. Выбор такой популяции клеток для анализа показан на рис. 7. На представленных гистограммах некротические и апоптотические клетки локализуются в левой части гистограммы. Это связано с тем, что клеточная гибель неизбежно приводит к повышению проницаемости клеточных мембран, следствием чего является увеличение их прозрачности и сопутствующее уменьшение прямого светорассеяния [168]. На рис. 7А,Б обведена область R1, использованная для анализа накопления метки ФИТЦ, в которой представлены только живые клетки с интактными мембранными. В области более высоких значений параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния располагаются агрегаты клеток, которые исключали из анализа. Инкубация клеток в растворе для «гашения» флуоресценции поверхностно-связанного ФИТЦ приводит к выраженным изменениям гистограммы FSC/SSC (область R2 на рис. 7В), и этих двух параметров становится недостаточно для того, чтобы идентифицировать клетки с неповрежденными мембранными. Известно, что краситель трипановый синий способен связываться с белками и образовывать флуоресцирующий комплекс с максимумом поглощения при  $\lambda = 483$  нм и максимумом эмиссии при  $\lambda = 660$  нм

[23], что соответствует каналу детекции FL3 на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur («BD Biosciences», США). На рис. 7Г показано, что клетки с проницаемыми мембранами, имеющие повышенную флуоресценцию в канале детекции FL3, отчетливо отделяются на гистограмме (область R4), что позволяет воспользоваться комбинированной областью R2 и R3 для выбора неповрежденных клеток при отсутствии флуоресценции от трипанового синего.



**Рисунок 7.** Распределение клеток линии COLO 320 HSR по параметрам прямого (FSC-H) и бокового (SSC-H) светорассеяния в контрольном образце (А), в образце клеток после инкубации с ФПН в течение 24 часов до (Б) и после (В) инкубации в цитратном буфере с трипановым синим для «гашения» флуоресценции ФИТЦ, а также распределение этих клеток по боковому светорассеянию и по флуоресценции в FL3 для исключения клеток с высокой флуоресценцией от трипанового синего (Г).

## **2.10. 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  $1 \times 10^6$  клеток/мл. К суспензии клеток добавляли флуоресцентный краситель родамин-123 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 («BD Biosciences», США) 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.

## **2.11. Определение уровня 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», США) 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 («BD Biosciences», США) при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали по 50 тыс. клеток на пробу.

## **2.12. Определение уровня МСОАН**

Определение уровня МСОАН с MitoSOX Red проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Маточный раствор MitoSOX Red («Thermo Fischer», США) 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 («BD Biosciences», США) при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 585 нм, анализировали по 50 тыс. клеток на пробу.

## **2.13. Анализ клеточного цикла с использованием йодистого пропидия**

Исследование клеточного цикла проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. После инкубации с препаратами клетки собирали, промывали ФСБ, фиксировали 70% этанолом в концентрации  $1\times10^6$  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, ресуспензировали 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  $1\times10^6$  клеток/мл и инкубировали 1–1,5 часа при комнатной температуре. Исходный раствор рибонуклеазы А предварительно кипятили на водяной бане в течение 10 мин, чтобы избавиться от возможной примеси дезоксирибонуклеаз. Анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur («BD Biosciences», США) 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», США).

## **2.14. Облучение клеток**

Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR в культуральной среде подвергали действию  $\gamma$ -излучения в дозе 2 Гр на установке «ГУТ-200М» ( $^{60}\text{Co}$ , 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 СО<sub>2</sub>-инкубатор и инкубировали необходимое время.

## **2.15. 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/лунка за сутки до исследования, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкМ в течение 24 часов и подвергали действию  $\gamma$ -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.

## **2.16. Анализ содержания $\beta$ -катенина**

Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR высевали в 6 см чашки Петри («Corning», США) в количестве  $2 \times 10^6$  клеток/чашка за сутки до исследования, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкМ в течение 4 часов и подвергали действию  $\gamma$ -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<sub>3</sub>, при 4°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки пермеабилизировали с помощью ФСБ, содержащего 0,25% тритон X-100 и 3% СПК, в течении 30 мин при комнатной температуре, отмывали и инкубировали с моноклональными антителами мыши к β-катенину, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:100, «eBioscience», США) 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 («BD Biosciences», США) при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали не менее 20 тыс. клеток на пробу. Изотипические моноклональные антитела мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1:100, «BD Pharmingen», США), использовали для получения отрицательного контроля.

## **2.17. Анализ содержания гистона γH2AX**

Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR за сутки до исследования высевали в 3,5 см чашки Петри («Corning», США) 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 моноклональными антителами мыши к гистону γH2AX, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:100, «BD Pharmingen», США) 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 («BD Biosciences», США) при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 525 нм, анализировали не менее 20 тыс. клеток на пробу.

Изотипические моноклональные антитела мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1:100, «BD Pharmingen», США), использовали для получения отрицательного контроля.

## **2.18. Статистическая обработка**

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

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1. Исследование цитотоксической активности никлозамида в отношении опухолевых и нормальных клеток**

Анализ выживаемости опухолевых клеток различных линий и нормальных клеток человека (НЕК293, ЛЭЧ) при действии никлозамида проводили с использованием МТТ-теста. Средние значения  $IC_{50}$  приведены в табл. 3. Согласно полученным результатам, никлозамид обладает выраженной цитотоксической активностью в отношении исследованных линий опухолевых клеток. Наиболее чувствительными к действию препарата оказались клетки меланомы линии Mel-10 и аденокарциномы ободочной кишки линии Сасо-2. Полученные результаты сравнивали с данными по цитотоксическому действию никлозамида в отношении клеток почки эмбриона человека (линия НЕК293) и лёгочных эмбриональных фибробластов человека (линия ЛЭЧ). Важно отметить, что никлозамид практически избирательно действовал на опухолевые клетки. Его токсичность в отношении клеток почки эмбриона человека и лёгочных эмбриональных фибробластов человека была значительно ниже, чем при действии на опухолевые клетки. Значение  $IC_{50}$  для этих линий составило 9,3 и 20,0 мкМ соответственно, в то время как для опухолевых клеток 1–2 мкМ и только для линии Н69 – 6,7 мкМ (табл. 3). Избирательное цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток с меньшим влиянием на нормальные клетки организма человека является важной характеристикой никлозамида.

**Таблица 3. 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 фибробласти человека, линия ЛЭЧ	$20,00 \pm 0,87$

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

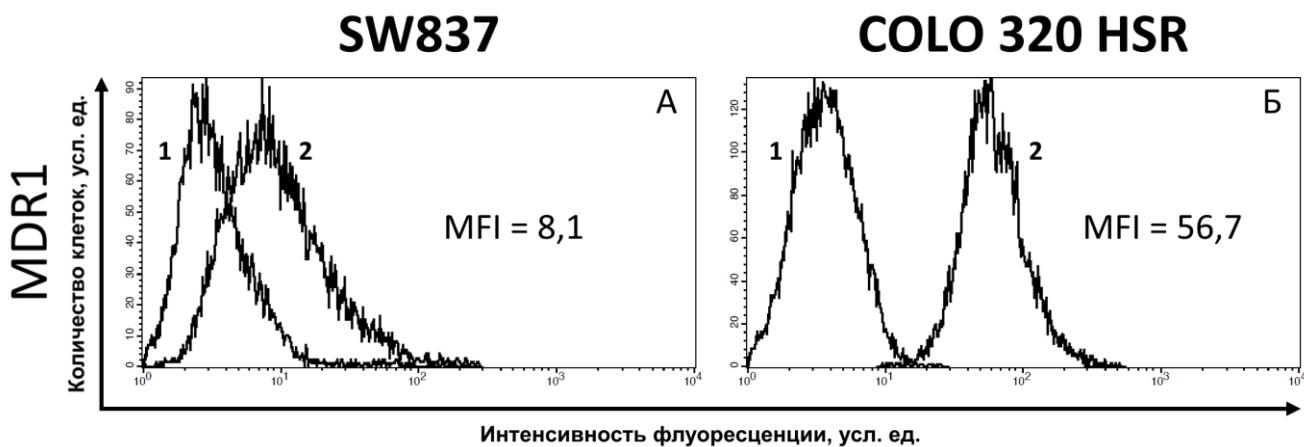
### 3.2. Исследование уровня белков MDR1 и Bcl-2 в клетках КРР человека

Согласно данным литературы, никлозамид проявляет биологическую активность в отношении опухолевых клеток после проникновения через цитоплазматическую мембрану и взаимодействия с внутриклеточными мишениями. Ввиду высокой гидрофобности [226] 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 [69, 151]. Поэтому клетки КРР линий SW837 и COLO 320 HSR были охарактеризованы по уровню экспрессии белков MDR1 и Bcl-2 с помощью

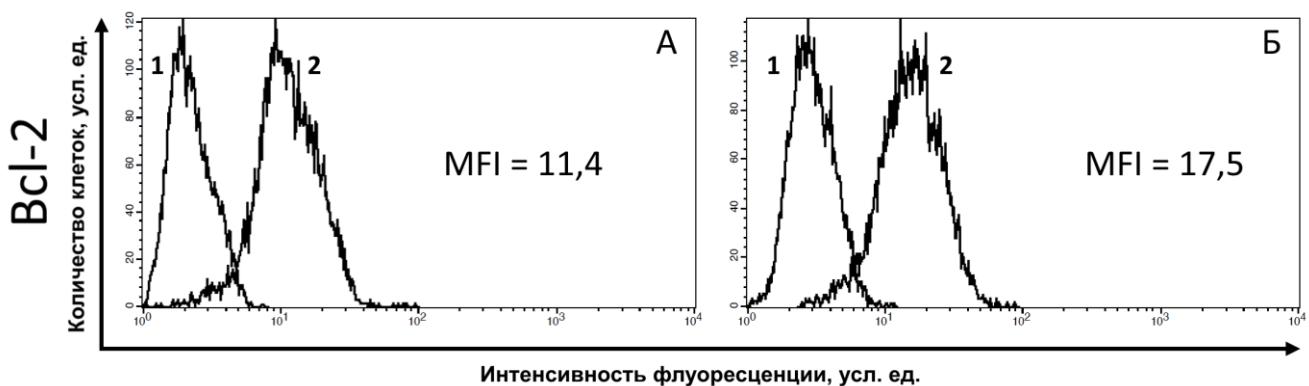
проточной цитофлуориметрии после инкубации с соответствующими антителами. Полученные результаты представлены на рис. 8 и 9.

В клетках обеих линий обнаружен высокий уровень белка MDR1 (рис. 8), и белка Bcl-2 (рис. 9), что свидетельствует об их устойчивости к широкому спектру противоопухолевых препаратов. Тем не менее, клетки линий SW837, COLO 320 HSR и MDR1<sup>+</sup> линии Mel-8 [5] были чувствительны к действию никлозамида, также как и MDR1<sup>-</sup> клетки линий Mel-10 и MS (табл. 3). Полученные результаты позволяют констатировать, что никлозамид эффективен в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2.

Отметим, что в клетках карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR обнаружен более высокий уровень экспрессии белка MDR1, чем в клетках рака прямой кишки человека линии SW837 (рис. 8). В то же время содержание белка Bcl-2 в клетках обеих линий было близким (рис. 9).



**Рисунок 8.** Экспрессия белка MDR1 в клетках КРР человека линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция клеток, окрашенных соответствующими антителами. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

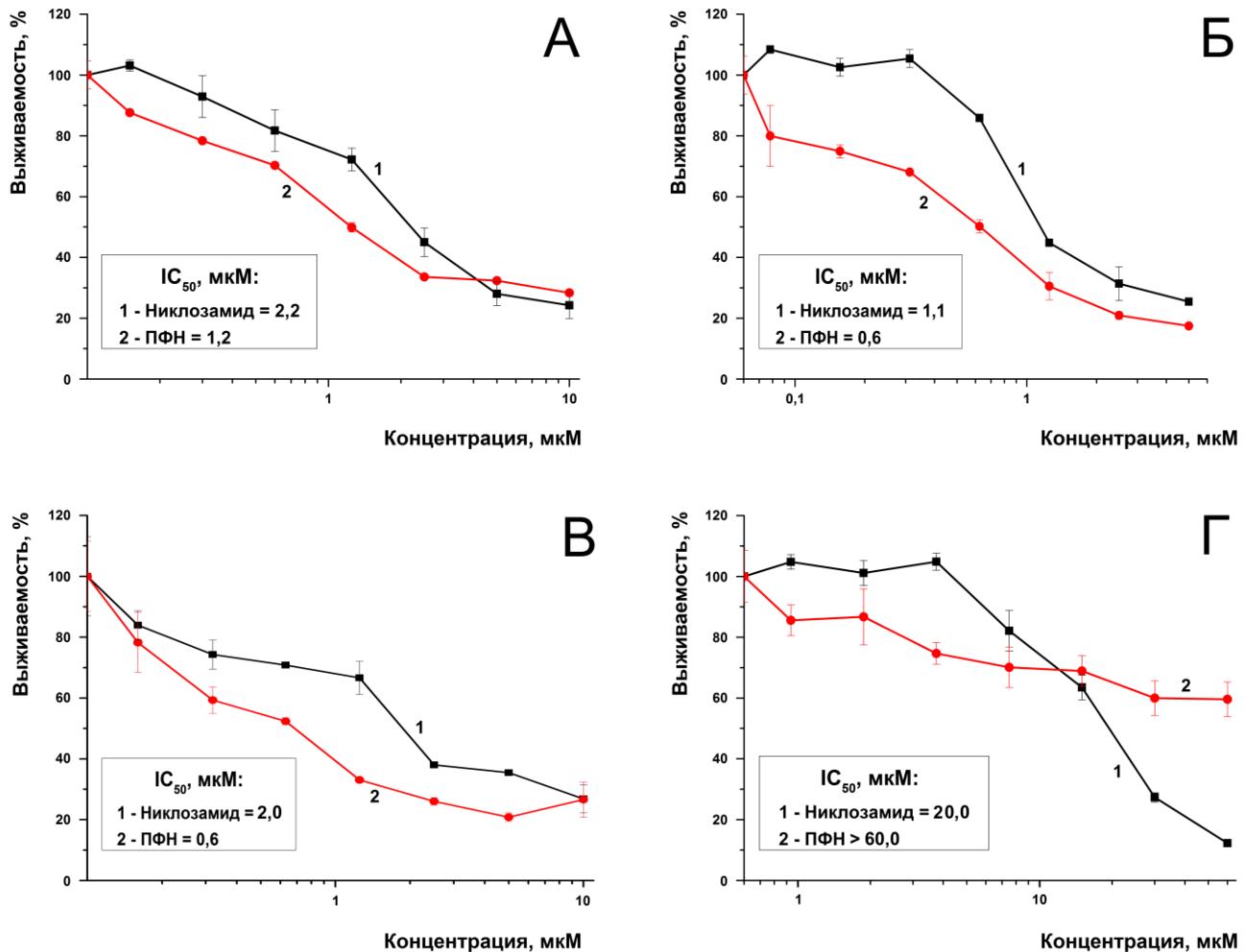
**SW837****COLO 320 HSR**

**Рисунок 9.** Экспрессия белка Bcl-2 в клетках КРР человека линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция клеток, окрашенных соответствующими антителами. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

### 3.3. 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. На рис. 10А–Г представлена зависимость выживаемости клеток трёх линий клеток КРР и линии нормальных клеток человека – ЛЭЧ – от концентрации никлозамида в свободном виде и в виде ПФН. Средние значения  $IC_{50}$  никлозамида и ПФН для изученных линий приведены в табл. 4. Обнаружено, что в отношении опухолевых клеток ПФН более активна, чем свободный никлозамид (рис. 10А–В, табл. 4). В то же время нормальные клетки человека (ЛЭЧ) (рис. 10Г, табл. 4) были намного менее чувствительны, чем опухолевые как к действию никлозамида, так и к действию ПФН. Полимерные частицы, не содержащие никлозамид («пустые частицы»), практически не влияли на выживаемость клеток в диапазоне концентраций, соответствующих диапазону используемых концентраций ПФН: выживаемость клеток при концентрации «пустых частиц», равной даже 10 мкМ по никлозамиду, составляла не менее  $85,2 \pm 8,4\%$  от контроля. Принимая во внимание ранее полученные данные об уровне экспрессии MDR1 и Bcl-2 в клетках КРР 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.



**Рисунок 10.** Влияние никлозамида (1) и ПФН (2) на выживаемость клеток adenокарциномы прямой кишки линии SW837 (А), adenокарциномы ободочной кишки линии Сaco-2 (Б), карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR (В) и лёгочных эмбриональных фибробластов человека (Г). Данные одного из трёх типичных экспериментов.

**Таблица 4. Цитотоксическая активность никлозамида и ПФН в отношении клеток КРР и нормальных клеток человека, оцениваемая по значению IC<sub>50</sub>.** Данные представлены в виде средней величины ± ошибка среднего; \* – отличия достоверны по сравнению с никлозамидом, p<0,05; # – отличия достоверны по сравнению с опухолевыми клетками, p<0,05.

<b>Линия клеток</b>	<b>Значение IC<sub>50</sub>, мкМ</b>	
	<b>Никлозамид</b>	<b>ПФН</b>
Аденокарцинома прямой кишки, линия SW837	2,1±0,2	1,2±0,1*
Аденокарцинома ободочной кишки, линия Сасо-2	0,9±0,2	0,6±0,1
Карцинома сигмовидной кишки, линия COLO 320 HSR	2,1±0,2	0,6±0,1*
Лёгочные эмбриональные фибробласты человека, линия ЛЭЧ	20,0±0,9 <sup>#</sup>	>60,0±5,7* <sup>#</sup>

### **3.4. Исследование цитотоксической активности никлозамида и ПФН в комбинации с цисплатином в отношении клеток меланомы мыши**

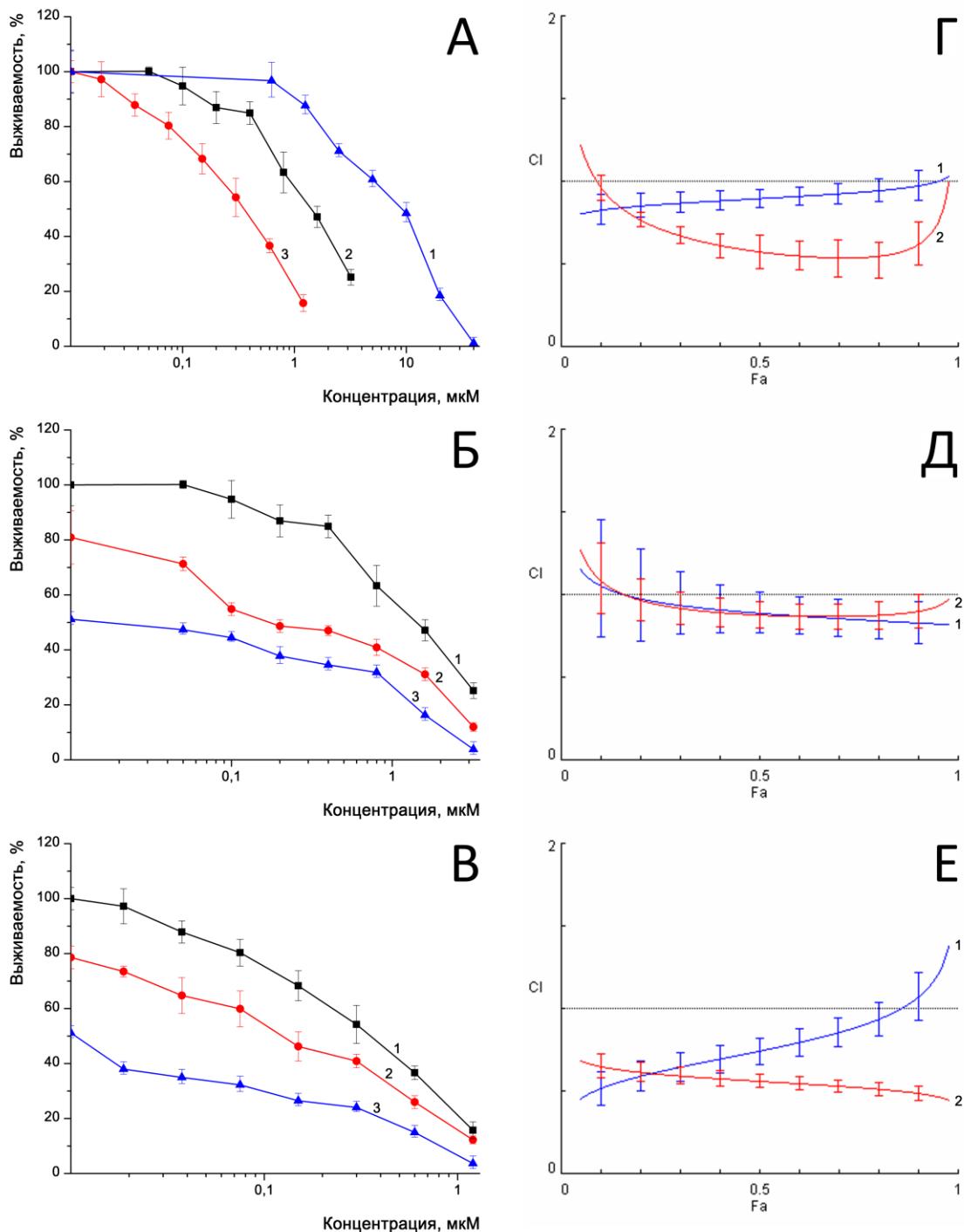
Перед изучением характера взаимодействия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина при их комбинированном применении была исследована чувствительность опухолевых клеток к действию каждого из этих препаратов по отдельности. На рис. 11А представлена зависимость выживаемости клеток меланомы мыши линии В16 от концентрации препаратов. Средние значения IC<sub>50</sub> цисплатина, никлозамида и ПФН составили 10,2±0,5 мкМ, 1,6±0,2 мкМ и 0,6±0,1 мкМ соответственно. Как видно из представленных данных, никлозамид обладает более высокой в сравнении с цисплатином цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток линии В16. Кроме того, использование никлозамида в виде полимерной формы (ПФН) приводит к статистически значимому повышению эффективности его действия в отношении клеток меланомы, что совпадает с ранее полученными с использованием клеток КРР данными (рис. 10А–В).

Возможность использования цисплатина для повышения эффективности действия никлозамида и ПФН в отношении опухолевых клеток была изучена в условиях непостоянного соотношения концентраций препаратов. Для комбинированного применения были использованы концентрации цисплатина, равные 5 и 10 мкМ ( $0,5 \times IC_{50}$  и  $IC_{50}$  соответственно). Была обнаружена более высокая эффективность совместного действия никлозамида и ПФН с цисплатином в концентрации 5 мкМ в отношении клеток линии В16 в сравнении с действием только никлозамида и ПФН, о чём свидетельствует сдвиг кривых выживаемости в сторону меньших концентраций (рис. 11Б,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.

Характер взаимодействия препаратов при их комбинированном применении возможно определить с помощью различных методов [88], среди которых наиболее широко используемым является подход, разработанный американскими учёными Т.С. Chou и Р. Talalay на основе закона действующих масс. Метод Chou-Talalay определяет взаимосвязь между «дозой» и «эффектом» с помощью уравнения «медианного» (среднего) эффекта и позволяет с помощью расчёта показателя аддитивности полукачественно определить направленность и силу взаимодействия препаратов при их комбинированном применении [48].

Указанный метод использовали для изучения характера взаимодействия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина при их совместном действии на клетки меланомы линии В16. Соблюдение постоянного соотношения концентраций препаратов (никлозамида и цисплатина, ПФН и цисплатина) при их комбинированном применении позволяет рассчитать величину показателя аддитивности при любом значении выживаемости опухолевых клеток. Согласно рекомендациям авторов метода [49], направленность и силу взаимодействия противоопухолевых препаратов в комбинации следует определять при значении выживаемости менее 20%, т.е. при гибели более 80% клеток. На рис. 11Г–Е показана зависимость показателя аддитивности (CI) от доли погибших клеток

(fraction affected, Fa) меланомы линии B16 при их инкубации с комбинациями препаратов в концентрациях, кратных соответствующим значениям  $IC_{50}$  и взятых в соотношении 1:1 (рис. 11Г), 1:2 (рис. 11Д) и 2:1 (рис. 11Е) для никлозамида и цисплатина или ПФН и цисплатина соответственно. Рассчитанные значения показателя аддитивности при  $Fa = 0,9$  приведены в табл. 5.



**Рисунок 11.** Влияние никлозамида, ПФН, цисплатина и их комбинаций на выживаемость клеток меланомы мыши линии B16 (А–В) и динамика изменения

величины показателя аддитивности для комбинаций никлозамида и ПФН с цисплатином в зависимости от уровня эффективности, определяемого долей опухолевых клеток, погибших при инкубации с препаратами в концентрациях, кратных соответствующим значениям  $IC_{50}$  и взятых в постоянных соотношениях (Г–Д). 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); Г–Е – зависимость величины показателя аддитивности от доли опухолевых клеток, погибших при инкубации с никлозамидом и цисплатином (1) и ПФН и цисплатином (2) в концентрациях, кратных соответствующим значениям  $IC_{50}$  и взятых в соотношении 1:1 (Г), 1:2 (Д) и 2:1 (Е) соответственно. СІ – показатель аддитивности. Fa – доля погибших клеток меланомы мыши линии В16 при инкубации с комбинациями препаратов. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

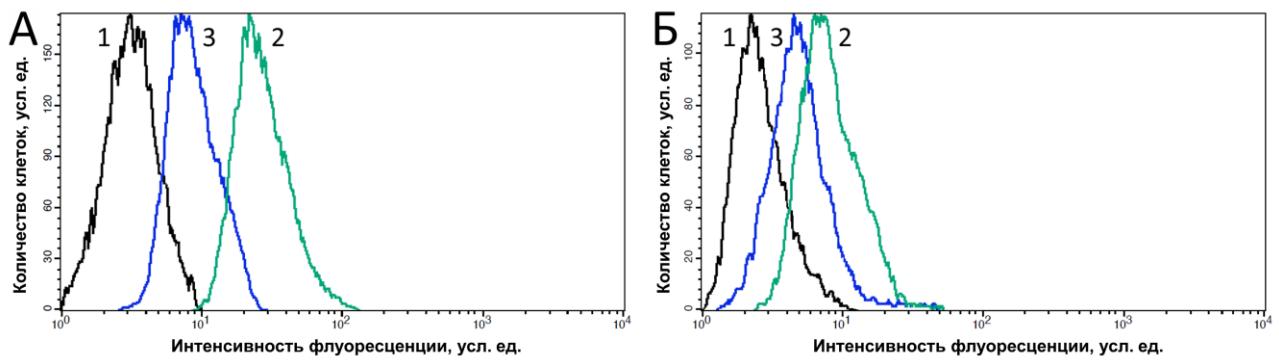
**Таблица 5. Характер взаимодействия никлозамида и ПФН при совместном действии с цисплатином на клетки меланомы мыши линии В16 при различных соотношениях концентраций препаратов, кратных соответствующим значениям  $IC_{50}$ , оцениваемый по величине показателя аддитивности (СІ). Значения СІ рассчитаны при  $Fa = 0,9$  ( $Fa$  – 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.

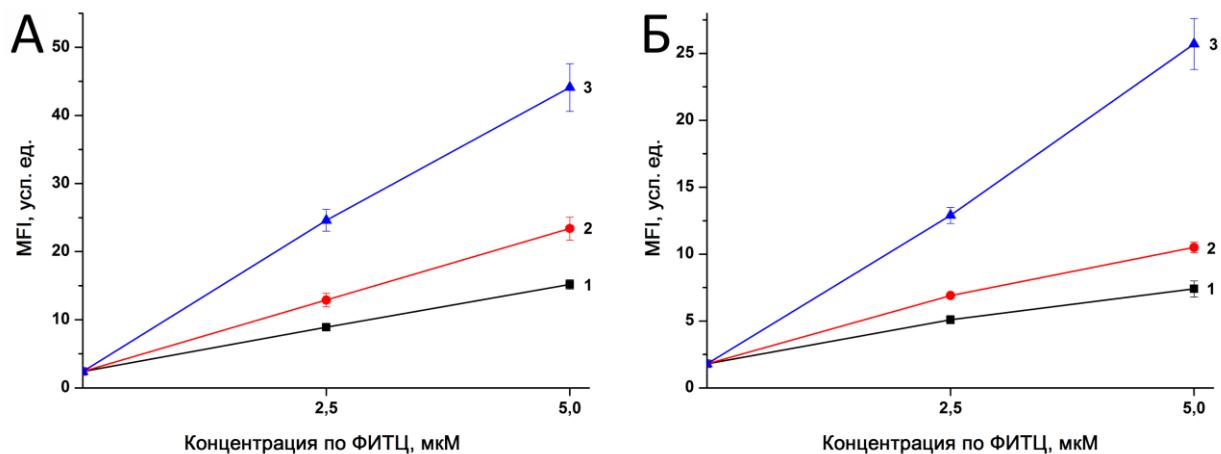
### **3.5. Исследование накопления ФПН клетками КРР**

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 наночастиц на основе блок-сополимера поли(D,L-лактид-ко-гликогенолида) и полиэтиленгликоля в клетках КРР человека линий COLO 320 HSR и SW837. На рис. 12 показан пример раздельного анализа общей флуоресценции клеток (кривая 2) и внутриклеточной флуоресценции (кривая 3) через 4 часа инкубации частиц в концентрации 5 мкМ по ФИТЦ с клетками двух линий опухолевых клеток человека – COLO 320 HSR (рис. 12А) и SW837 (рис. 12Б). Аутофлуоресценция клеток (кривая 1) не изменялась после инкубации с трипановым синим, используемым для «гашения» флуоресценции метки на поверхности клеток. Следует отметить, что клетки линии SW837 характеризовались менее интенсивным накоплением частиц, что может быть связано с меньшим размером этих клеток, который определяет и меньшую площадь их поверхности, а следовательно, и меньшую площадь взаимодействия с частицами.



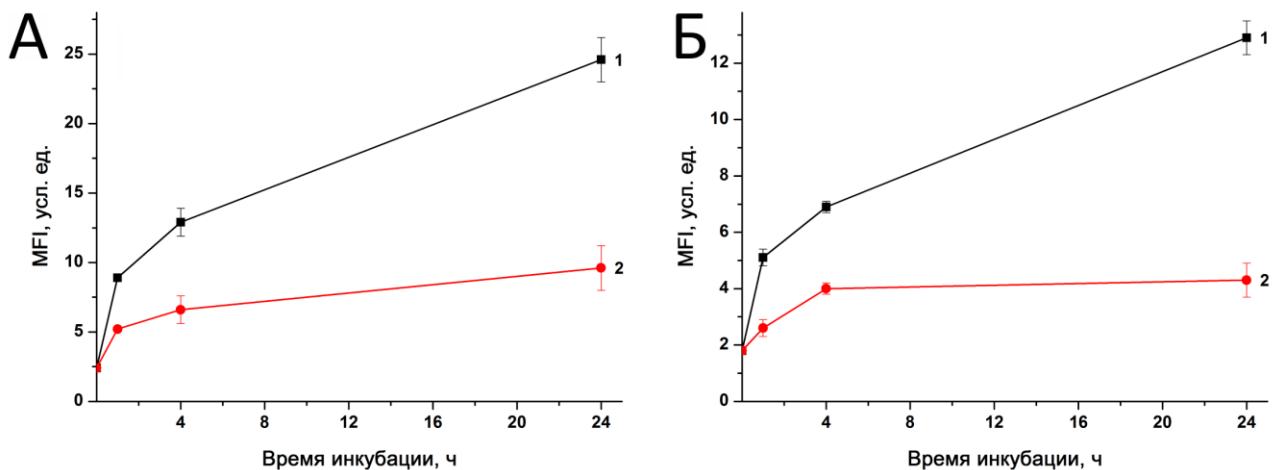
**Рисунок 12.** Накопление ФПН опухолевыми клетками человека линий COLO 320 HSR (А) и SW837 (Б) через 4 часа культивирования в присутствии частиц (5 мкМ по ФИТЦ). 1 – аутофлуоресценция клеток; 2 – общая флуоресценция клеток; 3 – флуоресценция клеток после «гашения» флуоресценции ФПН, адсорбированных на клеточной мембране, трипановым синим. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

На рис. 13 показан общий уровень накопления флуоресцентной метки в исследуемых клетках в зависимости от концентрации частиц и времени их инкубации с клетками. Представленные результаты свидетельствуют о том, что при использованных концентрациях частиц – 2,5 и 5 мкМ по ФИТЦ – и времени исследования – 1, 4 и 24 часа – их накопление в клетках пропорционально как концентрации, так и продолжительности инкубации с клетками.



**Рисунок 13.** 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.

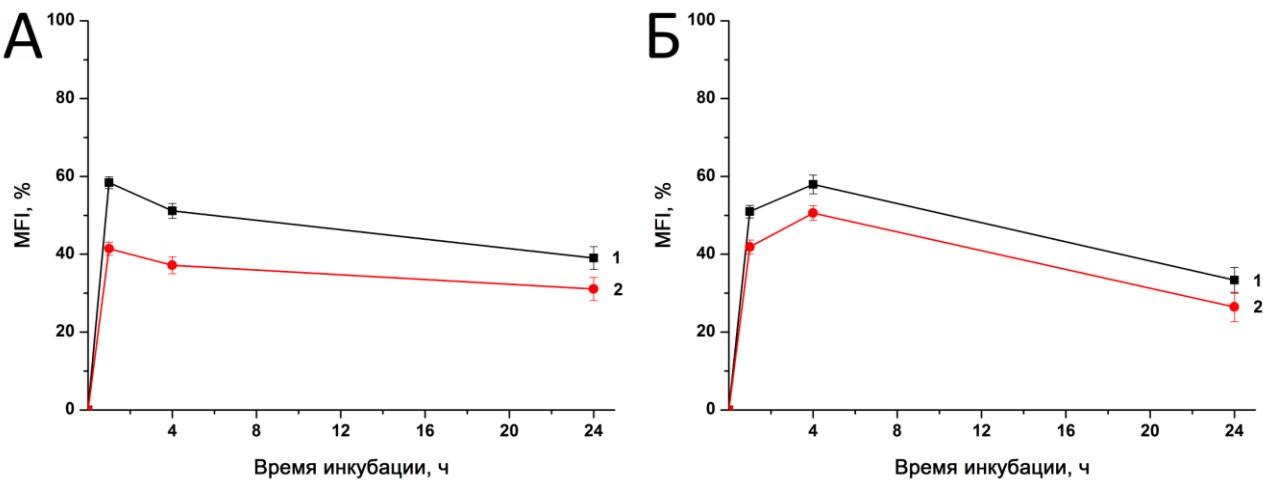
На рис. 14 показана динамика внутриклеточного накопления ФПН в опухолевых клетках (кривая 2), оцениваемого по флуоресценции клеток, обработанных после окончания инкубации с частицами трипановым синим, в сравнении с общим накоплением ФПН (кривая 1). Как следует из представленных данных, максимальный уровень накопления частиц внутри клеток, в отличие от их общего накопления, достигается, в зависимости от типа клеток, уже через 1 час (линия COLO 320 HSR) и 4 часа (линия SW837). Этот уровень остаётся практически постоянным при дальнейшей инкубации. Таким образом, максимальное накопление частиц происходит уже в первые часы контакта с клетками.



**Рисунок 14.** Сравнение динамики общего накопления (1) ФПН и их содержания внутри (2) опухолевых клеток человека линий COLO 320 HSR (А) и SW837 (Б) при концентрации частиц 2,5 мкМ по ФИТЦ. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед.

Для анализа эффективности накопления ФПН внутри клеток оценивали уровень их флуоресценции внутри клеток в процентах от общего уровня флуоресценции клеток. Полученные результаты представлены на рис. 15. Показано, что, в отличие от общего накопления ФПН, доля частиц внутри клеток достигает максимального значения уже через 1 час для клеток линии COLO 320 HSR и составляет  $58,4 \pm 1,5\%$  при концентрации 2,5 мкМ и  $41,4 \pm 1,7\%$  при концентрации ФПН, равной 5 мкМ по ФИТЦ (рис. 15А). В клетках линии

SW837 максимальное накопление ФПН внутри клеток достигается через 4 часа и также составляет  $58,0 \pm 2,4\%$  при концентрации 2,5 мкМ и  $50,6 \pm 1,9\%$  при концентрации ФПН, равной 5 мкМ по ФИТЦ (рис. 15Б). При дальнейшей инкубации, несмотря на возрастание общей флуоресценции, доля частиц, проникающих внутрь клеток, для линии COLO 320 HSR несколько снижается и через 24 часа составляет  $39,0 \pm 2,9\%$  и  $31,1 \pm 3,0\%$  при концентрациях 2,5 и 5 мкМ соответственно (рис. 15А). Для клеток линии SW837 наблюдалась та же закономерность: эффективность накопления частиц внутри клеток через 24 часа снижалась и достигала  $33,3 \pm 3,3\%$  и  $26,5 \pm 3,8\%$  от связавшихся с клетками частиц при концентрациях 2,5 и 5 мкМ соответственно (рис. 15Б). Известно, что в основе internalизации частиц лежит процесс эндоцитоза, который может быть неспецифическим, а может быть опосредован и некоторыми рецепторами. Обнаруженное снижение эффективности транслокации ФПН во внутриклеточные компартменты при увеличении их концентрации в среде позволяет полагать, что в основе internalизации таких частиц может лежать процесс эндоцитоза, который ингибируется со временем.



**Рисунок 15.** Эффективность внутриклеточного накопления частиц ФПН в опухолевых 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. MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

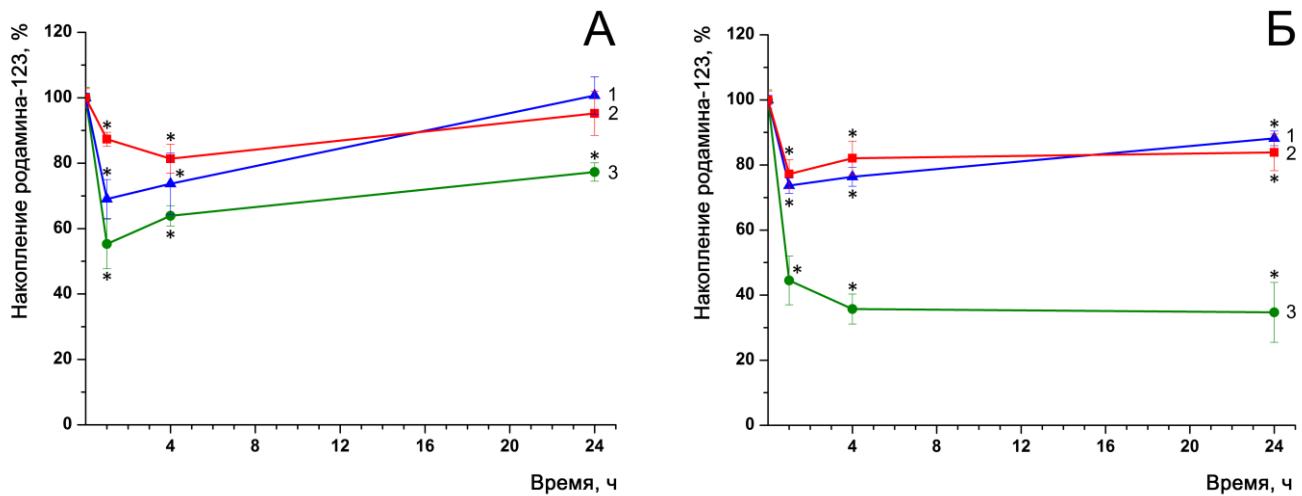
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наноразмерные частицы на основе блок-сополимера поли(D,L-лактид-ко-гликолида) и полиэтиленгликоля транслоцируются в опухолевые клетки, по-видимому, путем эндоцитоза и накапливаются в них. Этот процесс оказался насыщаемым: максимальное накопление, в зависимости от типа клеток, достигается через 1–4 часа инкубации клеток с частицами. Известно, что использование нагруженных противоопухолевыми препаратами полимерных наночастиц для лечения опухолей основано на их избирательном накоплении в ткани опухоли, также как и в зоне воспаления, благодаря изменениям в строении кровеносных сосудов, характеризующихся повышенной проницаемостью. Обнаруженный процесс эффективной интернализации полимерных частиц опухолевыми клетками можно рассматривать как второй механизм, определяющий эффективность противоопухолевых препаратов в составе наноразмерных полимерных лекарств. Транслокация биосовместимых биодеградируемых полимерных наночастиц, нагруженных противоопухолевыми препаратами, в опухолевые клетки может существенно повышать эффективность действия таких лекарств благодаря пролонгированному повышению внутриклеточной концентрации активной субстанции и оптимизации условий её взаимодействия с внутриклеточными мишениями.

### **3.6. Исследование молекулярных механизмов действия никлозамида и ПФН в отношении клеток КРР различных линий**

#### **3.6.1. Повреждение митохондрий клеток**

Известно, что накопление витального флуоресцентного красителя родамина-123 в митохондриях происходит в результате взаимодействия с их внутренней мембраной, и при повреждении митохондрий оно снижается [109]. После культивирования клеток КРР различных линий в присутствии никлозамида обнаружено (рис. 16А), что через 1 и 4 часа наблюдается умеренное (линии SW837 и Caco-2) или значительное (линия COLO 320 HSR) снижение накопления

родамина-123. Через 24 часа культивирования клеток в присутствии никлозамида происходило полное (линии SW837 и Caco-2) или только частичное (линия COLO 320 HSR) восстановление накопления красителя в клетках (рис. 16А). 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 Caco-2 и полностью отсутствовало у клеток линии COLO 320 HSR (рис. 16Б).



**Рисунок 16.** Динамика изменения уровня накопления флуоресцентного красителя родамина-123 в клетках adenокарциномы прямой кишки линии SW837 (1), adenокарциномы ободочной кишки линии Caco-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,  $p<0,05$ .

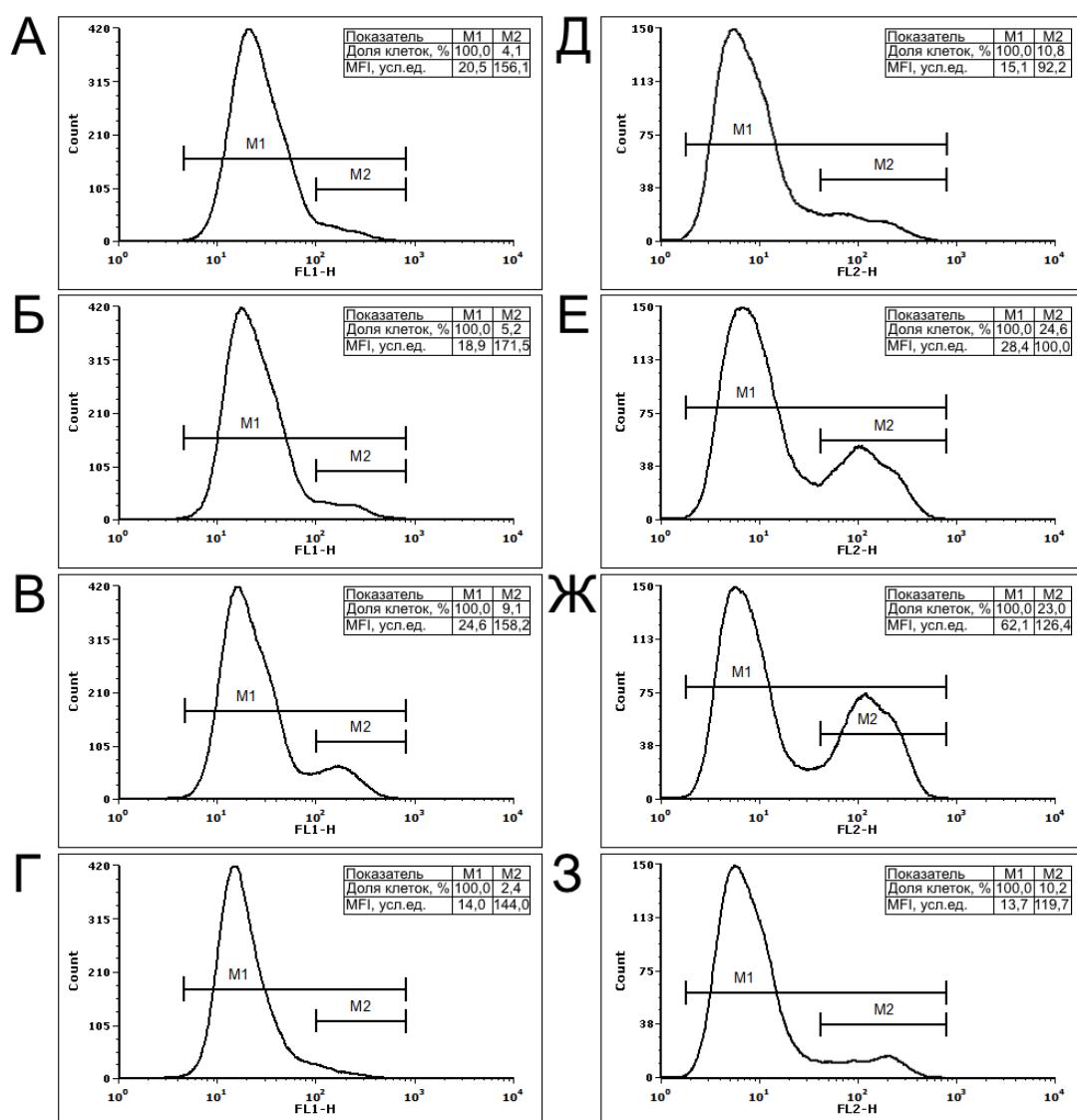
Таким образом, ПФН оказывает близкое по степени или даже более сильное повреждающее действие на митохондрии опухолевых клеток в сравнении с никлозамидом, что может быть связано с проникновением частиц через клеточную мембрану и созданием более высокой внутриклеточной концентрации никлозамида благодаря его высвобождению в цитоплазме клеток. Наиболее глубокое повреждение митохондрий, регистрируемое по снижению накопления

родамина-123, при действии препаратов обнаружено в клетках карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR.

### **3.6.2. Развитие окислительного стресса**

Повреждение митохондрий, как правило, сопровождается усиленным образованием АФК. Известно, что действие никлозамида может приводить к развитию окислительного стресса в опухолевых клетках различных типов и повышению уровня 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. 17. Показано, что при определении общего количества АФК по уровню накопления красителя carboxy-H2DCFDA увеличение средней интенсивности флуоресценции (MFI) всей популяции клеток (M1) обнаружено только при действии ПФН (рис. 17А–Г). При определении же содержания МСОАН по уровню накопления красителя MitoSOX Red увеличение MFI всей популяции клеток (M1) обнаружено как при действии никлозамида – до 28,4 усл. ед., так и при действии ПФН – до 62,1 усл. ед. при значении MFI для контрольных клеток и клеток, инкубировавшихся с «пустыми частицами», 15,1 и 13,7 усл. ед. соответственно (рис. 17Д–З). Следует отметить, что клетки линии COLO 320 HSR гетерогенны по уровню накопления красителей carboxy-H2DCFDA и MitoSOX Red и содержат небольшую популяцию M2 более интенсивно окрашенных клеток, которая составила для этих красителей 4,1 и 10,8% соответственно (рис. 17А,Д). При инкубации клеток с исследуемыми препаратами в течение 1 часа обнаружено увеличение этой фракции клеток с высоким уровнем АФК с 4,1% до 5,2 и 9,1% при действии никлозамида и ПФН соответственно при использовании красителя carboxy-H2DCFDA (рис. 17Б,В), и она не увеличивалась при действии «пустых частиц» (рис. 17Г). Значение MFI фракции клеток M2 в контроле составило 156,1 усл. ед. и было более высоким – 171,5 усл. ед. – при действии никлозамида. Действие «пустых частиц» не приводило к увеличению размера фракции M2, а накопление красителя carboxy-H2DCFDA в клетках этой фракции составило 144,0 усл. ед. (рис. 17Г), и

оно возрастало до 158,2 усл. ед. при действии ПФН. При действии никлозамида и ПФН увеличение фракции клеток М2 с высоким уровнем образования МСОАН, регистрируемым по накоплению красителя MitoSOX Red, было аналогичным: оно возрастало с 10,8 до 24,6% при действии никлозамида и до 23,0% при действии ПФН (рис. 17Е,Ж). Значение MFI фракции клеток М2 в контроле составило 92,2 усл. ед. и было более высоким – 126,4 усл. ед. – при действии ПФН, чем при действии никлозамида – 100,0 усл. ед. Действие «пустых частиц» не приводило к увеличению размера фракции М2, но накопление красителя MitoSOX Red в клетках этой фракции возрастало до 119,7 усл. ед. (рис. 17З).



**Рисунок 17.** Изменение общего уровня АФК, оцениваемого по накоплению флуоресцентного красителя carboxy-H2DCFDA (А–Г), и уровня МСОАН, оцениваемого по накоплению флуоресцентного красителя MitoSOX Red (Д–З), в

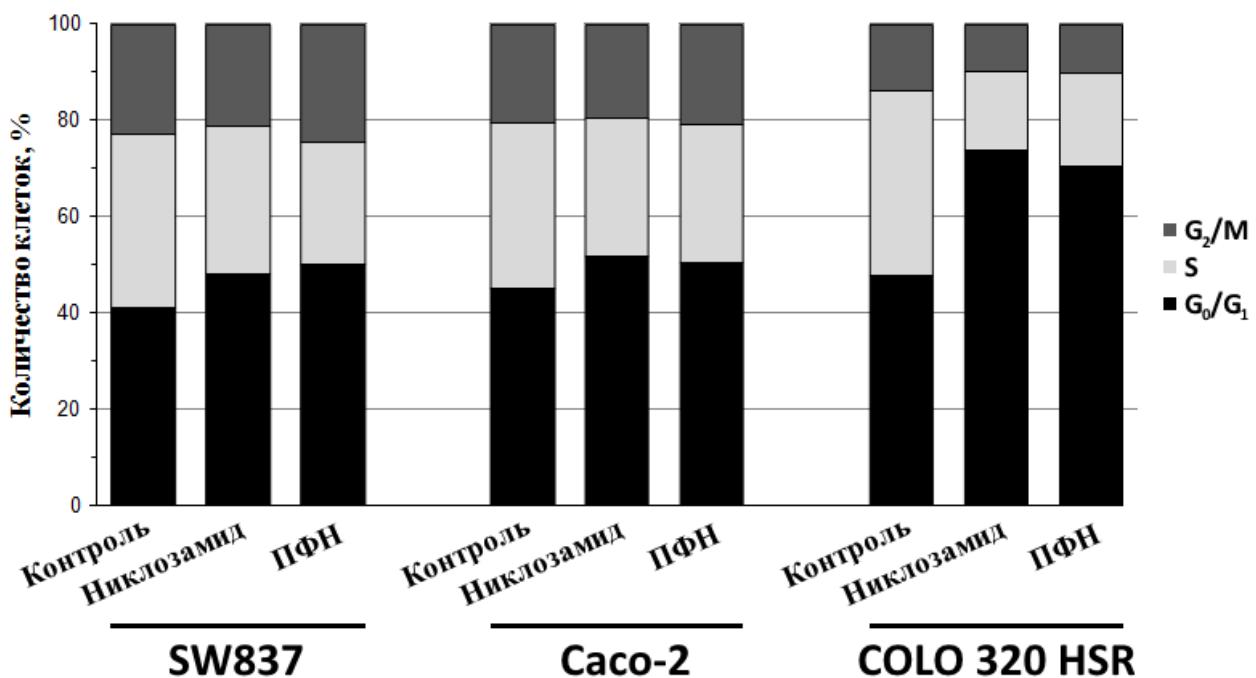
клетках линии COLO 320 HSR после инкубации в течение 1 часа с никлозамидом, ПФН и «пустыми частицами». А, Д – контрольные клетки; Б, Е – клетки после инкубации с никлозамидом; В, Ж – с ПФН; Г, З – с «пустыми частицами». По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток (канал детекции FL1 или FL2), по оси ординат – количество клеток, усл. ед. М1 – вся популяция клеток, М2 – 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.

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.

### **3.6.3. Блок клеточного цикла**

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 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе. Наиболее глубокие нарушения клеточного цикла, также как и снижение накопления родамина-123, обнаружены в клетках карциномы сигмовидной кишки линии COLO 320 HSR. В этой линии доля клеток в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе возрасала с 48% в контроле до 74 и 71% при действии никлозамида в свободной и полимерной форме соответственно, а доля клеток в S-фазе клеточного цикла снижалась с 39% в контроле до 17 и 19% соответственно (рис. 18). Таким образом, действие и никлозамида, и ПФН уже при концентрации, близкой к IC<sub>50</sub>, приводит к блоку клеточного цикла в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе. 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.



**Рисунок 18.** Гистограммы распределения клеток аденокарциномы прямой кишки линии SW837, аденокарциномы ободочной кишки линии Сасо-2 и карциномы сигмовидной кишки человека линии 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.

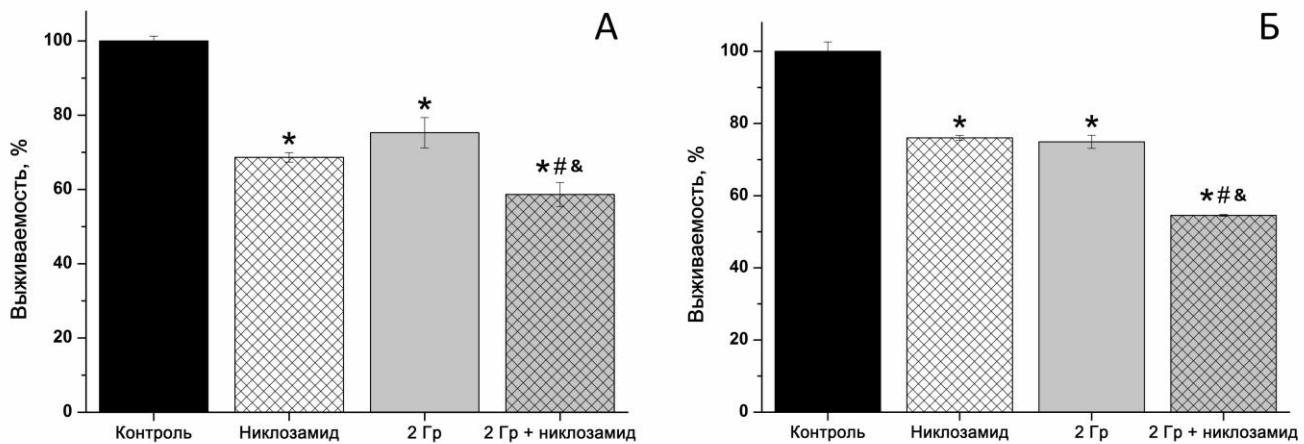
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что никлозамид и в виде ПФН, и в свободной форме вызывает повреждение митохондрий клеток разных линий КРР человека, которое сопровождается накоплением АФК, и в том числе МСОАН. Оксислительный стресс приводит к повреждению чувствительных к действию АФК внутриклеточных мишней и блоку клеточного цикла в  $G_0/G_1$ -фазе. Все обнаруженные изменения были более интенсивными при использовании ПФН, что, по-видимому, связано с транспортом частиц ПФН внутрь клеток и последующим высвобождением никлозамида непосредственно в цитоплазме.

### **3.7. Исследование радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток КРР**

Перспективным способом повышения эффективности лучевой терапии, широко применяемой при лечении рака прямой кишки, представляется использование радиосенсибилизаторов, повышающих чувствительность опухолевых клеток к действию излучения. Поэтому следующим этапом работы было исследование радиосенсибилизирующей активности никлозамида в отношении клеток КРР человека линий SW837 и COLO 320 HSR и изучение механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида. Опухолевые клетки подвергали действию  $\gamma$ -излучения в дозе 2 Гр, соответствующей разовой дозе, используемой при фракционированном облучении опухолей.

#### **3.7.1. Влияние никлозамида на радиочувствительность клеток линий SW837 и COLO 320 HSR**

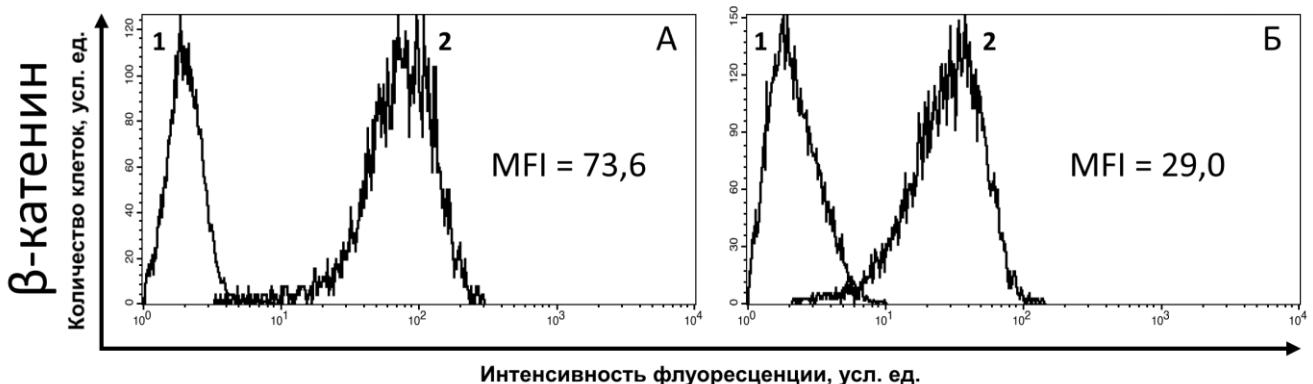
Для определения радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR исследовали их выживаемость через 7 суток после облучения, как описано в разделе 2.15 (время инкубации с никлозамидом до облучения составило 24 часа). Как следует из рис. 19, выживаемость опухолевых клеток линий SW837 и COLO 320 HSR при действии  $\gamma$ -излучения в дозе 2 Гр снижалась до  $75,3 \pm 4,1\%$  и  $74,9 \pm 1,8\%$  от контроля соответственно, что было сравнимо с действием никлозамида в концентрации 2 мкМ. Использование  $\gamma$ -излучения в комбинации с никлозамидом приводило к более глубокому снижению выживаемости клеток линий SW837 и COLO 320 HSR – до  $58,7 \pm 3,2\%$  и  $54,6 \pm 0,2\%$  от контроля соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что никлозамид повышает эффективность действия  $\gamma$ -излучения на клетки исследованных линий.



**Рисунок 19.** Влияние никломацида ( $2 \text{ мкМ}$ ),  $\gamma$ -излучения ( $2 \text{ Гр}$ ) 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 никломацида достоверны,  $p < 0,05$ ; # – отличия от действия  $\gamma$ -излучения достоверны,  $p < 0,05$ .

### 3.7.2. Влияние никломацида и $\gamma$ -излучения на активность сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR

Известно, что в клетках КРР вследствие мутаций в генах, кодирующих белки «дестабилизирующего комплекса» (APC, Axin) и  $\beta$ -катенин, происходит активация канонического сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин [247]. Действительно, в клетках аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR обнаружен высокий уровень  $\beta$ -катенина (рис. 20), что свидетельствует об активном состоянии канонического сигнального пути Wnt.

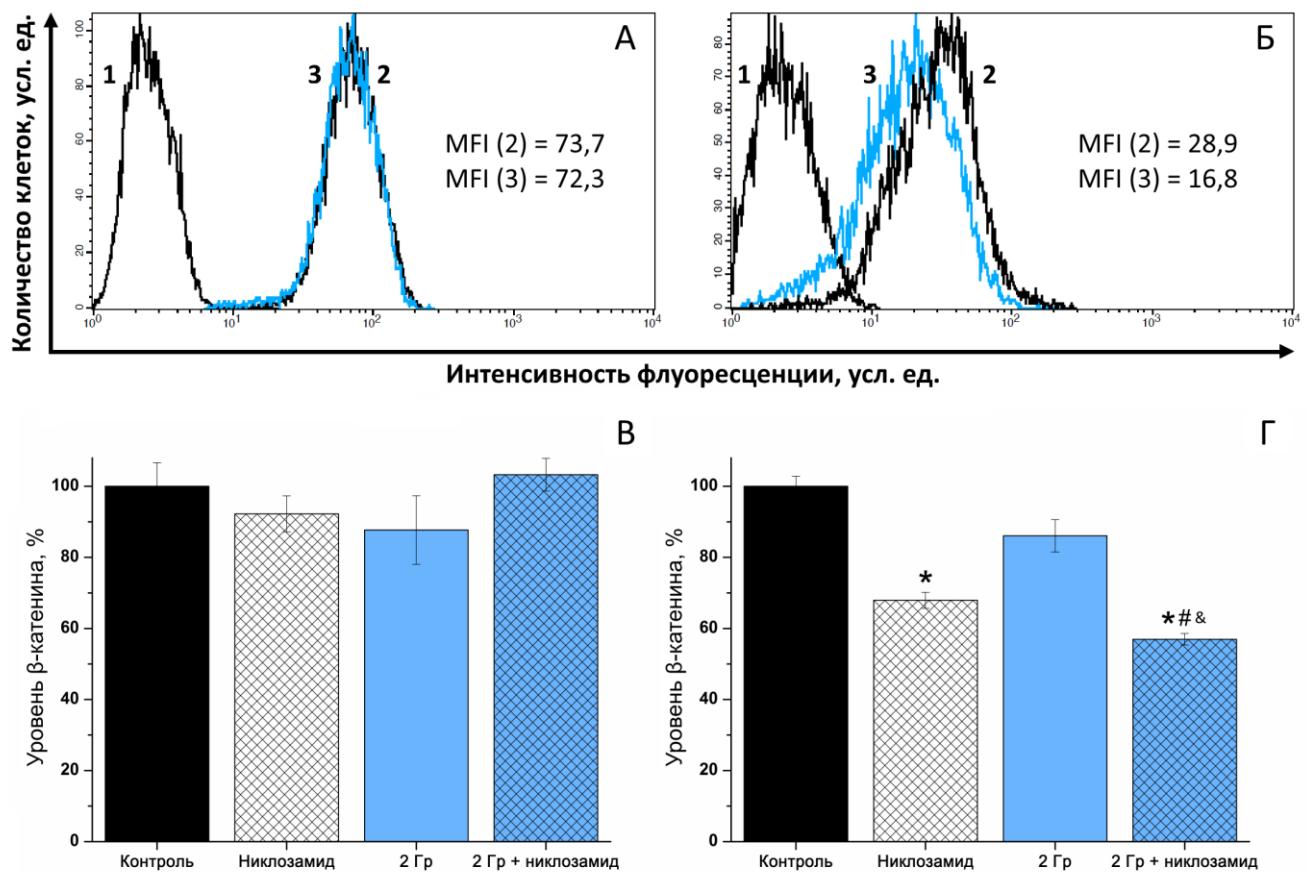
**SW837****COLO 320 HSR**

**Рисунок 20.** Экспрессия  $\beta$ -катенина в клетках КРР человека линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция клеток, окрашенных соответствующими антителами. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Данные одного из трёх типичных экспериментов.

Согласно литературным данным, повышение активности сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин может лежать в основе развития устойчивости опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения [252]. Более того, как было указано ранее, снижение активности данного молекулярного каскада рассматривается в качестве возможного механизма радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток тройного негативного рака молочной железы [242]. Исходя из этого, повышение чувствительности клеток КРР исследуемых линий к действию излучения с помощью никлозамида могло бы быть следствием ингибирования сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин.

С помощью проточной цитофлуориметрии было обнаружено, что уровень  $\beta$ -катенина в клетках линии SW837 оставался неизменным как при действии никлозамида в концентрации 2 мкМ, так и при действии  $\gamma$ -излучения в дозе 2 Гр (рис. 21В). При облучении клеток линии SW837, культивируемых в среде с никлозамидом, количество  $\beta$ -катенина также не отличалось от контроля (рис. 21А,В). Совместное действие никлозамида и  $\gamma$ -излучения на клетки линии COLO 320 HSR приводило к достоверному снижению уровня  $\beta$ -катенина (рис. 21Б), более глубокому, чем при действии никлозамида и  $\gamma$ -излучения по отдельности (рис. 21Г). В то же время, как показано на рис. 19, при действии

только никлозамида и комбинации никлозамида с  $\gamma$ -излучением выживаемость клеток обеих линий статистически значимо снижается. Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибирование сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в опухолевых клетках не является единственным механизмом цитотоксического и радиосенсибилизирующего действия никлозамида.

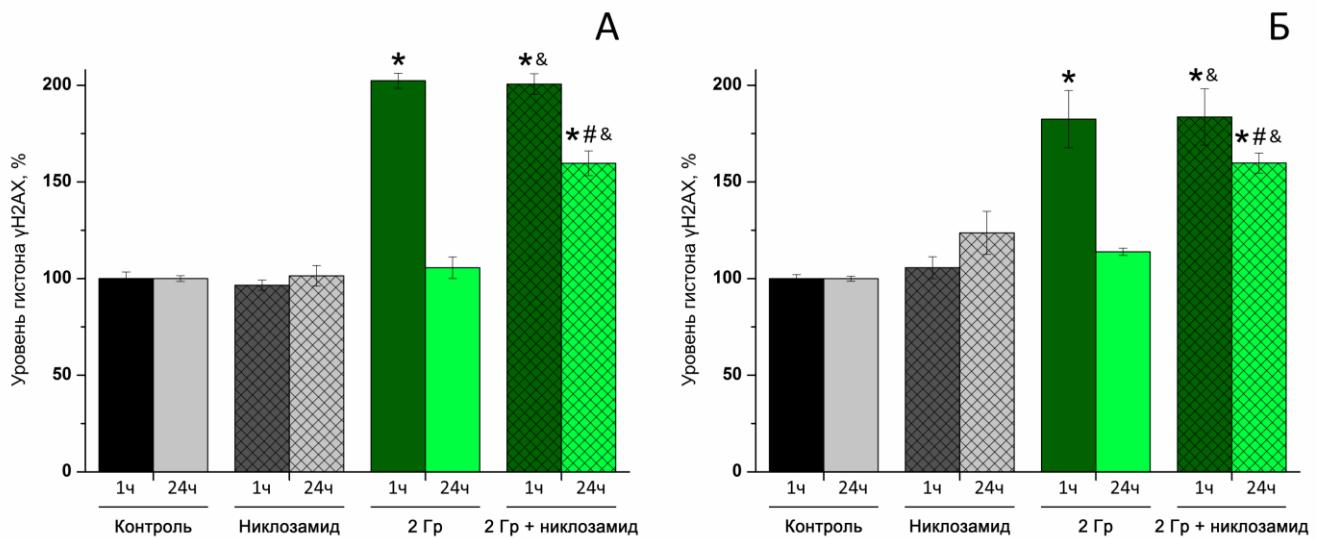


**Рисунок 21.** Уровень  $\beta$ -катенина в клетках линий SW837 (А,В) и COLO 320 HSR (Б,Г). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция контрольных клеток; 3 – флуоресценция клеток при совместном действии  $\gamma$ -излучения (2 Гр) и никлозамида (2 мкМ). MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. \* – отличия от контроля достоверны,  $p<0,05$ ; & – отличия от действия никлозамида достоверны,  $p<0,05$ ; # – отличия от действия  $\gamma$ -излучения достоверны,  $p<0,05$ .

### **3.7.3. Определение уровня ДР ДНК в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR при действии никлозамида и $\gamma$ -излучения**

Действие  $\gamma$ -излучения на клетки сопровождается повреждением ДНК. Репарация ДР ДНК, наиболее трудно репарируемого типа повреждений ДНК при действии  $\gamma$ -излучения, сопровождается каскадом реакций фосфорилирования, что требует значительного расхода АТФ. В работе [156] было показано, что никлозамид разобщает клеточное дыхание и окислительное фосфорилирование и приводит к снижению уровня АТФ в клетках КРР. Это позволило предположить, что никлозамид может опосредованно ингибировать репарацию ДР ДНК, снижая уровень АТФ в опухолевых клетках.

О количестве ДР ДНК в опухолевых клетках судили по уровню гистона  $\gamma$ H2AX, который измеряли через 1 и 24 часа после облучения (рис. 22). Действие  $\gamma$ -излучения в дозе 2 Гр приводило к увеличению уровня гистона  $\gamma$ H2AX в 2,0 и 1,8 раз относительно фонового уровня в клетках аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR соответственно через 1 час после облучения. Через 24 часа уровень гистона  $\gamma$ H2AX в облучённых клетках снижался до исходного значения. При культивировании клеток линий SW837 и COLO 320 HSR в присутствии никлозамида в концентрации 2 мкМ не наблюдали изменения уровня гистона  $\gamma$ H2AX в соответствующие интервалы времени. В то же время при совместном действии никлозамида и  $\gamma$ -излучения полного восстановления количества ДР ДНК в опухолевых клетках обеих линий не происходило, и их количество в 1,6 раз превышало фоновый уровень. Полученные результаты свидетельствуют об ингибировании репарации ДР ДНК при облучении опухолевых клеток в присутствии никлозамида.



**Рисунок 22.** Уровень гистона  $\gamma$ H2AX в клетках линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б) после действия никлозамида (2 мкМ),  $\gamma$ -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  $\gamma$ -излучения через 1 час достоверны,  $p<0,05$ .

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что никлозамид проявляет радиосенсибилизирующую активность в отношении клеток КРР человека, в основе которой может лежать не только ингибирование сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин, но и иные механизмы, и в первую очередь обнаруженное ингибирование репарации ДР ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении противоопухолевой активности никлозамида в свободной и полимерной форме на культурах клеток человека нами обнаружено более глубокое в сравнении с нормальными клетками снижение выживаемости опухолевых клеток различных линий при действии никлозамида (табл. 3). Значения  $IC_{50}$ , составившие 1–2 мкМ и 10–20 мкМ для опухолевых и нормальных клеток соответственно, свидетельствуют об избирательности противоопухолевого действия препарата, что соответствует данным других авторов [104, 110]. Важным является показанное нами впервые эффективное действие никлозамида на опухолевые клетки человека с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, обусловленной как высоким уровнем экспрессии белка MDR1 (линия меланомы Mel-8 [5]), так и одновременной экспрессией белков MDR1 и Bcl-2 (линии КРР COLO 320 HSR и SW837) (рис. 8 и 9, табл. 3), которое позднее было подтверждено Hamdoun и соавт. [91].

Для преодоления проблемы использования никлозамида, связанной с его низкой растворимостью, и повышения эффективности его действия был применён способ получения никлозамида в полимерной форме и изучена активность такого препарата и его механизм действия в сравнении со свободным никлозамидом на клетки КРР. ПФН была получена в лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины НИЦ «Курчатовский институт» под руководством к.х.н. Е.А. Воронцова на основе сополимера молочной и гликолевой кислот. Препарат ПФН был получен в виде никлозамидсодержащих частиц субмикронного размера ( $240,9 \pm 3,1$  нм, табл. 1). Обнаружена более высокая в сравнении с никлозамидом цитотоксическая активность ПФН в отношении опухолевых клеток (рис. 10, табл. 4). Отметим, что в работе [24] для создания препарата никлозамида в полимерной форме также использовался сополимер молочной и гликолевой кислот, однако полученные авторами частицы имели существенно большие размеры (584–662 нм), что может не вполне удовлетворять условиям их практического применения, в частности, внутривенного введения.

Комбинированное использование никлозамида с известными химиотерапевтическими препаратами может значительно расширить сферу его применения. В связи с этим была оценена эффективность совместного действия никлозамида в свободной и полимерной форме и широко применяемого в противоопухолевой терапии алкилирующего агента из группы соединений платины – цисплатина. Исследование проведено в отношении клеток меланомы мыши в сравнении с каждым из препаратов по отдельности (рис. 11, табл. 5). Стоит отметить, что исследование совместного действия никлозамида и цисплатина на опухолевые клетки проводилось и ранее: соответствующие данные представлены в нескольких работах, в которых, впрочем, либо дана только качественная оценка характера взаимодействия препаратов [137, 251], либо вывод о направленности и силе взаимодействия препаратов при их комбинированном применении сделан на основе значения показателя аддитивности, рассчитанного не в полном соответствии с рекомендациями авторов метода (Chou-Talalay) [255]. Поэтому нами было выполнено более детальное исследование с использованием разных экспериментальных условий (раздел 3.4). При использовании непостоянного соотношения концентраций препаратов в комбинации была обнаружена более высокая эффективность их совместного действия, выраженная в интенсивной гибели опухолевых клеток, что совпадает с результатами приведённых выше работ. Результаты, полученные при использовании постоянных соотношений концентраций никлозамида и цисплатина и ПФН и цисплатина в комбинации, позволили сделать вывод соответственно об аддитивности и синергизме их цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток, а также о зависимости характера взаимодействия препаратов от режима их использования, что необходимо учитывать при проведении доклинических исследований.

Особый интерес вызывает механизм противоопухолевого действия никлозамида в полимерной форме в сравнении со свободным никлозамидом, который обычно связывают с ингибированием различных сигнальных путей, в частности, сигнальной системы Wnt/β-катенин [125, 154, 169]. Однако в

проведённых нами исследованиях снижение уровня  $\beta$ -катенина при действии никлозамида было обнаружено не во всех типах опухолевых клеток: снижение было обнаружено в клетках линии COLO 320 HSR, но отсутствовало в клетках линии SW837 (рис. 21). Анализ литературы показал, что и другие авторы отмечали это обстоятельство [128]. Полученные данные указывают на существование иных мишеней действия никлозамида, главной среди которых могут быть митохондрии. Действительно, никлозамид в свободной и полимерной форме, как показано нами (рис. 16–18), приводил к повреждению митохондрий, о чём судили по снижению накопления флуоресцентного красителя родамина-123 (рис. 16), возрастанию уровня АФК (рис. 17А–Г) и МСОАН (рис. 17Д–З) и блоку клеточного цикла в  $G_0/G_1$ -фазе (рис. 18) в клетках обеих исследованных линий КРР человека. Все обнаруженные изменения были более интенсивными при использовании ПФН.

Такой механизм противоопухолевого действия никлозамида принципиально отличает его от классических химиотерапевтических препаратов (алкилирующих и интеркалирующих агентов, антиметаболитов и др.), мишенью которых служит ДНК клеток и/или ингибирование её биосинтеза. Комбинированное использование двух препаратов с разным механизмом действия (например, никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина) является целесообразным способом повышения эффективности их цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток в результате действия на две разные мишени, что подтверждается полученными нами данными об аддитивности и синергизме действия этих препаратов. Таким образом, нами показано, что механизм действия ПФН и свободного никлозамида одинаков, а более высокая активность ПФН определяется её проникновением в клетки (рис. 12–15).

Актуальным направлением исследований является поиск препаратов, способных повышать чувствительность опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения. В проведённых нами экспериментах было обнаружено более глубокое снижение выживаемости клеток КРР человека при комбинированном действии  $\gamma$ -излучения и никлозамида в сравнении с каждым из

этих факторов по отдельности (рис. 19). При этом, в отличие от ранее опубликованных данных [242], радиосенсибилизирующее действие никлозамида было только частично связано со снижением активности сигнального пути Wnt/β-катенин. При действии ионизирующего излучения наиболее критичным для выживаемости клеток повреждением является образование ДР ДНК. Снижение скорости их репарации приводит к повышению радиочувствительности опухолевых клеток. В процесс репарации ДНК вовлечено большое число протеинкиназ, регулирующих развитие ответа клеток на повреждение ДНК. Одним из важнейших субстратов ATM-киназы и ДНК-зависимой протеинкиназы является гистон H2AX. В результате его фосфорилирования по Сер139 образуется фосфорилированный гистон, получивший название γH2AX [186]. В результате тысячи молекул γH2AX закрывают ДР ДНК для их последующей репарации. Поэтому по уровню γH2AX в настоящее время судят о количестве ДР ДНК и скорости их репарации [77]. Таким образом, процесс репарации ДНК требует значительного расхода АТФ для обеспечения высокой активности протеинкиназ. В то же время, как было показано нами (рис. 16) и другими авторами [156, 177], никлозамид вызывает повреждение митохондрий, разобщение клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования и, тем самым, приводит к снижению образования АТФ, вследствие чего может происходить ингибирование широкого спектра АТФ- зависимых процессов, включая репарацию ДР ДНК.

При исследовании действия никлозамида на уровень репарации ДР ДНК через 24 часа после облучения в дозе 2 Гр, когда процесс репарации двунитевых разрывов при этой дозе уже завершается, нами было обнаружено ингибирование никлозамидом репарации ДР ДНК в клетках обеих исследованных линий (SW837 и COLO 320 HSR) (рис. 22). Так, уровень гистона γH2AX, суррогатного маркёра ДР ДНК, в облучённых клетках повышался относительно фонового уровня через 1 час и снижался до исходного значения через 24 часа после действия γ-излучения, в то время как в присутствии никлозамида полного восстановления количества ДР ДНК через 24 часа после облучения не происходило, и их количество статистически значимо превышало фоновый уровень. Сам никлозамид

не приводил к повышению уровня гистона  $\gamma$ H2AX в клетках КРР исследованных линий. При этом, количество ДР ДНК через 1 час после облучения было сравнимым при действии только  $\gamma$ -излучения и комбинации  $\gamma$ -излучения и никлозамида. Тем не менее, в ряде работ [11, 115] показана способность никлозамида усиливать образование индуцированных излучением ДР ДНК, что может быть связано с прооксидантным действием препарата.

Таким образом, нами показано, что никлозамид повышает чувствительность клеток КРР человека к действию  $\gamma$ -излучения за счёт ингибирования репарации ДР ДНК вне зависимости от снижения активности сигнальной системы Wnt/ $\beta$ -катенин. Подчеркнём, что эти результаты получены при использовании ионизирующего излучения в дозе 2 Гр и более приближены к условиям однократного облучения, применяемого при лучевой терапии, чем данные большинства других авторов, использовавших в своих работах более высокие дозы облучения (6–8 Гр), что делает целесообразным дальнейшие исследования эффективности никлозамида для повышения чувствительности опухолевых клеток к лучевой терапии.

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 биодеградируемого сopolимера молочной и гликоловой 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 биодеградируемого сopolимера молочной и гликоловой 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<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК	– активные формы кислорода
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДР ДНК	– двунитевые разрывы ДНК
ИЛ	– интерлейкин
КРР	– колоректальный рак
МСОАН	– митохондриальный супероксиданион-радикал
ПФН	– полимерная форма никлозамида
СПК	– сыворотка плодов крупного рогатого скота
ФИТЦ (FITC)	– флуоресцеин-5-изотиоцианат (англ. fluorescein-5-isothiocyanate)
ФНО $\alpha$	– фактор некроза опухоли-альфа
ФПН	– флуоресцентно меченные полимерные наночастицы
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
4E-BP	– белок, связывающий eIF4E
ABCВ1 (MDR1)	– белок В1 суперсемейства АТФ-связывающих транспортных белков, белок множественной лекарственной устойчивости 1 (англ. ATP-binding cassette sub-family B member 1, multidrug resistance protein 1)
ADAM	– фермент семейства адамализинов (англ. a disintegrin and metalloproteinase)
Akt	– серин-треониновая протеинкиназа, протеинкиназа В (англ. Rac serine/threonine-protein kinase)
AMPK	– 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа (англ. 5'-AMP-activated protein kinase)
APC	– белок adenomatозного полипоза кишечника (англ. adenomatous polyposis coli)

Bcl-2	– антиапоптотический белок В-клеточной лимфомы 2 (англ. B-cell lymphoma 2)
Bcl-XL	– антиапоптотический белок семейства белков Bcl-2 (англ. B-cell lymphoma-extra large)
CBF1	– ДНК-связывающий белок семейства CSL (англ. C promoter binding factor 1)
CI	– показатель аддитивности (англ. combination index)
CK1	– казеинкиназа-1 (англ. casein kinase 1)
EGF	– эпидермальный фактор роста (англ. epidermal growth factor)
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor receptor)
eIF4E	– фактор инициации трансляции эукариот 4E (англ. eukaryotic translation initiation factor 4E)
ERK	– киназа, индуцируемая внеклеточными сигналами (англ. extracellular signal-regulated kinase)
Fa	– доля клеток, погибших при инкубации с препаратом (англ. fraction affected)
FSC	– прямое светорассеяние (англ. forward scatter)
GSK3	– киназа-3 гликогенсинтазы (англ. glycogen synthase kinase 3)
HGF	– фактор роста гепатоцитов (англ. hepatocyte growth factor)
HIF-1 $\alpha$	– фактор, индуцируемый гипоксией-1альфа (англ. hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )
IC <sub>50</sub>	– концентрация препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток (англ. half maximal inhibitory concentration)
ICAM-1	– молекула клеточной адгезии-1 (англ. intercellular adhesion molecule 1)
IKK	– киназа белка I $\kappa$ B (англ. I $\kappa$ B kinase)
I $\kappa$ B	– ингибитор фактора транскрипции NF- $\kappa$ B
JAK	– Янус-киназа (англ. Janus kinase)

LD <sub>50</sub>	– доза, вызывающая гибель 50% животных (англ. lethal dose, 50%)
LRP 5/6	– связанный с рецептором липопротеина низкой плотности белок 5/6 (англ. low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6)
MAPK	– митоген-активируемая протеинкиназа (англ. mitogen-activated protein kinase)
MEK	– киназа MAPK
MFI	– средняя интенсивность флуоресценции (англ. mean fluorescence intensity)
MMP9	– матриксная металлопротеиназа-9
MNK	– взаимодействующая с MAPK серин-треониновая протеинкиназа (MAPK-interacting serine/threonine-protein kinase)
mTOR	– мишень рапамицина млекопитающих (англ. mammalian target of rapamycin)
MTT	– 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид
NF-κB	– фактор транскрипции, ядерный фактор В-лимфоцитов, усиливающий синтез лёгких κ-цепей иммуноглобулинов (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
Notch-ICD	– внутриклеточный домен белка Notch (англ. Notch intracellular domain)
PEG	– полиэтиленгликоль (англ. polyethylene glycol)
PI3K	– фосфатидилинозитол-3-киназа (англ. phosphatidylinositol-3-kinase)
PLGA	– сополимер молочной и гликоловой кислот, поли(D,L-лактид-ко-гликолид) (англ. poly(D,L-lactic-co-glycolic acid))

PPAR $\gamma$	– гамма-изоформа рецептора активатора пролиферации пероксисом (англ. peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ )
Rheb	– ГТФ-связывающий белок, относящийся к семейству белков Ras (англ. Ras homolog enriched in brain)
S100A4	– кальций-связывающий белок A4 семейства белков S100
S6K	– киназа рибосомного белка S6 (англ. ribosomal protein S6 kinase 1)
SSC	– боковое светорассеяние (англ. side scatter)
STAT	– сигнальный белок и активатор транскрипции (англ. signal transducer and activator of transcription)
TCF/LEF	– Т-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор (англ. T cell factor/lymphoid enhancer binding factor)
TGF $\beta$	– трансформирующий фактор роста-бета (англ. transforming growth factor beta)
TSC2	– туберин (англ. tuberous sclerosis complex 2)
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов (англ. vascular endothelial growth factor)
Wnt	– гликопротеины семейства белков wingless-type MMTV integration site family
WSTF	– транскрипционный фактор синдрома Уильямса (англ. Williams Syndrome Transcription Factor)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Ошкина Е.В., Кушлинский Н.Е., Огнерубов Н.А. Ключевые компоненты NF-κB сигнального пути в опухолях больных раком молочной железы // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2013. – V. 19. – № 6-2. – P. 3292-3297.
2. Жирник А.С., Никольская Е.Д., Жунина О.А., Семочкина Ю.П., Посыпанова Г.А., Кузнецов С.Л., Журило Н.И., Москалева Е.Ю. Анализ накопления флуоресцентно меченых полимерных наночастиц на основе PLGA-PEG опухолевыми клетками человека // Российские нанотехнологии. – 2018. – V. 13. – № 1-2. – P. 71-78.
3. Жирник А.С., Семочкина Ю.П., Москалева Е.Ю., Крылов Н.И., Тубашева И.А., Кузнецов С.Л., Воронцов Е.А. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида в отношении клеток кишечнодистального рака // Биомедицинская химия. – 2017. – V. 63. – № 2. – P. 132-138.
4. Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Архангельская А.А., Хряпенкова Т.Г. Митохондрия как многогликий Янус (обзор) // Биохимия. – 2007. – V. 72. – № 10. – P. 1371-1384.
5. Кондрашева И.Г., Москаleva E.YU., Popova O.H., C.E. C. Выявление в различных линиях меланомы человека клеток, не включающих родамин-123 // Молекулярная медицина. – 2009. – V. – № 4. – P. 51-55.
6. Красильников М.А., Жуков Н.В. Сигнальный путь mTOR: новая мишень терапии опухолей // Современная онкология. – 2010. – V. 02. – № – P. 9-16.
7. Кузнецова И.Г., Северин С.Е. Использование сополимера молочной и гликолевой кислот для получения наноразмерных лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – V. 5. – № 5. – P. 30-36.

8. Русак Л.В., Ковчур В.Н. Влияние некоторых антигельминтиков на содержание гликогена в тканях цестод *Hymenolepis nana* // Паразитология. – 1972. – V. 6. – № 1. – P. 85-87.
9. Сиволодский Е.П. Вибростатический тест с никлозамидом для идентификации бактерий рода *Vibrio* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – V. 59. – № 5. – P. 53-55.
10. Татарский В.В. Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – V. 3. – № 1. – P. 28-31.
11. Шуватова В.Г., Кузыренкова А.П., Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю. Радиосенсибилизация опухолевых стволовых клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 в помощь никлозамида // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2017. – V. 62. – № 6. – P. 5-11.
12. Abreu F.C., Goulart M.O., Brett A.M. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor // Biosensors & bioelectronics. – 2002. – V. 17. – № 11-12. – P. 913-919.
13. Ahn S.Y., Kim N.H., Lee K., Cha Y.H., Yang J.H., Cha S.Y., Cho E.S., Lee Y., Cha J.S., Cho H.S., Jeon Y., Yuk Y.S., Cho S., No K.T., Kim H.S., Lee H., Choi J., Yook J.I. Niclosamide is a potential therapeutic for familial adenomatous polyposis by disrupting Axin-GSK3 interaction // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – № 19. – P. 31842-31855.
14. Ai N., Wood R.D., Yang E., Welsh W.J. Niclosamide is a Negative Allosteric Modulator of Group I Metabotropic Glutamate Receptors: Implications for Neuropathic Pain // Pharmaceutical research. – 2016. – V. 33. – № 12. – P. 3044-3056.
15. Al-Gareeb A.I., Aljubory K.D., Alkuraishy H.M. Niclosamide as an anti-obesity drug: an experimental study // Eating and weight disorders : EWD. – 2017. – V. 22. – № 2. – P. 339-344.
16. Al-Hadiya B.M. Niclosamide: comprehensive profile // Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. – 2005. – V. 32. – № – P. 67-96.

17. Almoustafa H.A., Alshawsh M.A., Chik Z. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method // International journal of pharmaceutics. – 2017. – V. 533. – № 1. – P. 275-284.
18. Andersson E.R., Sandberg R., Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function // Development. – 2011. – V. 138. – № 17. – P. 3593-3612.
19. Andrews P., Thyssen J., Lorke D. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide // Pharmacology & therapeutics. – 1982. – V. 19. – № 2. – P. 245-295.
20. Arend R.C., Londono-Joshi A.I., Gangrade A., Katre A.A., Kurpad C., Li Y., Samant R.S., Li P.K., Landen C.N., Yang E.S., Hidalgo B., Alvarez R.D., Straughn J.M., Forero A., Buchsbaum D.J. Niclosamide and its analogs are potent inhibitors of Wnt/beta-catenin, mTOR and STAT3 signaling in ovarian cancer // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 52. – P. 86803-86815.
21. Arend R.C., Londono-Joshi A.I., Gangrade A., Katre A.A., Kurpad C., Li Y., Samant R.S., Li P.K., Landen C.N., Yang E.S., Hidalgo B., Alvarez R.D., Straughn J.M., Forero A., Buchsbaum D.J. Correction: Niclosamide and its analogs are potent inhibitors of Wnt/beta-catenin, mTOR and STAT3 signaling in ovarian cancer // Oncotarget. – 2018. – V. 9. – № 27. – P. 19459.
22. Arend R.C., Londono-Joshi A.I., Samant R.S., Li Y., Conner M., Hidalgo B., Alvarez R.D., Landen C.N., Straughn J.M., Buchsbaum D.J. Inhibition of Wnt/beta-catenin pathway by niclosamide: a therapeutic target for ovarian cancer // Gynecol Oncol. – 2014. – V. 134. – № 1. – P. 112-120.
23. Avelar-Freitas B.A., Almeida V.G., Pinto M.C., Mourao F.A., Massensini A.R., Martins-Filho O.A., Rocha-Vieira E., Brito-Melo G.E. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry // Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. – 2014. – V. 47. – № 4. – P. 307-315.
24. Bai M.Y., Yang H.C. Fabrication of novel niclosamide-suspension using an electrospray system to improve its therapeutic effects in ovarian cancer cells in vitro //

Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects. – 2013. – V. 419. – № – P. 248-256.

25. Balgi A.D., Fonseca B.D., Donohue E., Tsang T.C., Lajoie P., Proud C.G., Nabi I.R., Roberge M. Screen for chemical modulators of autophagy reveals novel therapeutic inhibitors of mTORC1 signaling // PloS one. – 2009. – V. 4. – № 9. – P. e7124.

26. Barini E., Miccoli A., Tinarelli F., Mulholland K., Kadri H., Khanim F., Stojanovski L., Read K.D., Burness K., Blow J.J., Mehellou Y., Muqit M.M.K. The Anthelmintic Drug Niclosamide and Its Analogues Activate the Parkinson's Disease Associated Protein Kinase PINK1 // Chembiochem : a European journal of chemical biology. – 2017. – V. 19. – № 5. – P. 425-429.

27. Beristain-Castillo E., Martinez-Vazquez M., Camacho-Carranza R., Espinosa-Aguirre J.J. CYP1A1 and Cnr nitroreductase bioactivated niclosamide in vitro // Mutagenesis. – 2013. – V. 28. – № 6. – P. 645-651.

28. Bhattacharyya J., Ren X.R., Mook R.A., Wang J., Spasojevic I., Premont R.T., Li X., Chilkoti A., Chen W. Niclosamide-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit Wnt signaling and colon cancer growth // Nanoscale. – 2017. – V. 9. – № 34. – P. 12709-12717.

29. Bhushan B., Dubey P., Kumar S.U., Sachdev A., Matai I., Gopinath P. Bionanotherapeutics: niclosamide encapsulated albumin nanoparticles as a novel drug delivery system for cancer therapy // RSC Advances. – 2015. – V. 5. – № 16. – P. 12078-12086.

30. Borggrefe T., Liefke R. Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway // Cell cycle. – 2012. – V. 11. – № 2. – P. 264-276.

31. Cairns D.M., Boorgu D., Levin M., Kaplan D.L. Niclosamide rescues microcephaly in a humanized in vivo model of Zika infection using human induced neural stem cells // Biology open. – 2018. – V. 7. – № 1. – P. bio031807.

32. Carpenter R.L., Lo H.W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers // Cancers. – 2014. – V. 6. – № 2. – P. 897-925.

33. Carrella D., Manni I., Tumaini B., Dattilo R., Papaccio F., Mutarelli M., Sirci F., Amoreo C.A., Mottolese M., Iezzi M., Ciolfi L., Aria V., Bosotti R., Isacchi A., Loreni F., Bardelli A., Avvedimento V.E., di Bernardo D., Cardone L. Computational drugs repositioning identifies inhibitors of oncogenic PI3K/AKT/P70S6K-dependent pathways among FDA-approved compounds // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 37. – P. 58743-58758.
34. Cerles O., Benoit E., Chereau C., Chouzenoux S., Morin F., Guillaumot M.A., Coriat R., Kavian N., Loussier T., Santulli P., Marcellin L., Saidu N.E., Weill B., Batteux F., Nicco C. Niclosamide Inhibits Oxaliplatin Neurotoxicity while Improving Colorectal Cancer Therapeutic Response // Mol Cancer Ther. – 2017. – V. 16. – № 2. – P. 300-311.
35. Chae H.D., Cox N., Dahl G.V., Lacayo N.J., Davis K.L., Capolicchio S., Smith M., Sakamoto K.M. Niclosamide suppresses acute myeloid leukemia cell proliferation through inhibition of CREB-dependent signaling pathways // Oncotarget. – 2018. – V. 9. – № 4. – P. 4301-4317.
36. Chang X., Zhen X., Liu J., Ren X., Hu Z., Zhou Z., Zhu F., Ding K., Nie J. The antihelmenthic phosphate niclosamide impedes renal fibrosis by inhibiting homeodomain-interacting protein kinase 2 expression // Kidney Int. – 2017. – V. 92. – № 3. – P. 612-624.
37. 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. Pharmacokinetics of Anti-SARS-CoV Agent Niclosamide and Its Analogs in Rats // Journal of Food and Drug Analysis. – 2006. – V. 14. – № 4. – P. 329-333.
38. Chen B., Wei W., Ma L., Yang B., Gill R.M., Chua M.S., Butte A.J., So S. Computational Discovery of Niclosamide Ethanolamine, a Repurposed Drug Candidate That Reduces Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and in Mice by Inhibiting Cell Division Cycle 37 Signaling // Gastroenterology. – 2017. – V. 152. – № 8. – P. 2022-2036.
39. Chen H., Yang Z., Ding C., Chu L., Zhang Y., Terry K., Liu H., Shen Q., Zhou J. Discovery of O-Alkylamino Tethered Niclosamide Derivatives as Potent and

Orally Bioavailable Anticancer Agents // ACS medicinal chemistry letters. – 2013. – V. 4. – № 2. – P. 180-185.

40. Chen L., Wang L., Shen H., Lin H., Li D. Anthelminthic drug niclosamide sensitizes the responsiveness of cervical cancer cells to paclitaxel via oxidative stress-mediated mTOR inhibition // Biochemical and biophysical research communications. – 2017. – V. 484. – № 2. – P. 416-421.

41. Chen M., Wang J., Lu J., Bond M.C., Ren X.R., Lyerly H.K., Barak L.S., Chen W. The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled1 signaling // Biochemistry. – 2009. – V. 48. – № 43. – P. 10267-10274.

42. Chen W., Chen M., Barak L.S. Development of small molecules targeting the Wnt pathway for the treatment of colon cancer: a high-throughput screening approach // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2010. – V. 299. – № 2. – P. G293-300.

43. Chen W., Mook R.A., Jr., Premont R.T., Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug // Cellular signalling. – 2017. – V. 41. – P. 89-96.

44. Cheng B., Morales L.D., Zhang Y., Mito S., Tsin A. Niclosamide induces protein ubiquitination and inhibits multiple pro-survival signaling pathways in the human glioblastoma U-87 MG cell line // PloS one. – 2017. – V. 12. – № 9. – P. e0184324.

45. Cheon Y.H., Kim J.Y., Baek J.M., Ahn S.J., So H.S., Oh J. Niclosamide suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and prevents LPS-induced bone loss // Biochemical and biophysical research communications. – 2016. – V. 470. – № 2. – P. 343-349.

46. Chikara S., Reindl K.M. Notch signaling: a hero or villain in the war against cancer? // Translational lung cancer research. – 2013. – V. 2. – № 6. – P. 449-451.

47. Choi S.Y., Park S.K., Yoo H.W., Pi J.H., Kang C.J. Charged Amino Acid-rich Leucine Zipper-1 (Crlz-1) as a Target of Wnt Signaling Pathway Controls Pre-B Cell Proliferation by Affecting Runx/CBFbeta-targeted VpreB and lambda5 Genes // The Journal of biological chemistry. – 2016. – V. 291. – № 29. – P. 15008-15019.

48. Chou T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies // Pharmacological reviews. – 2006. – V. 58. – № 3. – P. 621-681.
49. Chou T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method // Cancer research. – 2010. – V. 70. – № 2. – P. 440-446.
50. Chowdhury M.K., Turner N., Bentley N.L., Das A., Wu L.E., Richani D., Bustamante S., Gilchrist R.B., Morris M.J., Shepherd P.R., Smith G.C. Niclosamide reduces glucagon sensitivity via hepatic PKA inhibition in obese mice: Implications for glucose metabolism improvements in type 2 diabetes // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – P. srep40159.
51. Chowdhury M.K., Wu L.E., Coleman J.L., Smith N.J., Morris M.J., Shepherd P.R., Smith G.C. Niclosamide blocks glucagon phosphorylation of Ser552 on beta-catenin in primary rat hepatocytes via PKA signalling // The Biochemical journal. – 2016. – V. 473. – № 9. – P. 1247-1255.
52. Circu M.L., Dykes S.S., Carroll J., Kelly K., Galiano F., Greer A., Cardelli J., El-Osta H. Correction: A Novel High Content Imaging-Based Screen Identifies the Anti-Helminthic Niclosamide as an Inhibitor of Lysosome Anterograde Trafficking and Prostate Cancer Cell Invasion // PloS one. – 2016. – V. 11. – № 3. – P. e0151718.
53. Circu M.L., Dykes S.S., Carroll J., Kelly K., Galiano F., Greer A., Cardelli J., El-Osta H. A Novel High Content Imaging-Based Screen Identifies the Anti-Helminthic Niclosamide as an Inhibitor of Lysosome Anterograde Trafficking and Prostate Cancer Cell Invasion // PloS one. – 2016. – V. 11. – № 1. – P. e0146931.
54. Clevers H., Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease // Cell. – 2012. – V. 149. – № 6. – P. 1192-1205.
55. Cortinas de Nava C., Espinosa J., Garcia L., Zapata A.M., Martinez E. Mutagenicity of antiamebic and anthelmintic drugs in the *Salmonella typhimurium* microsomal test system // Mutation research. – 1983. – V. 117. – № 1-2. – P. 79-91.
56. Costabile G., d'Angelo I., Rampioni G., Bondi R., Pompili B., Ascenzioni F., Mitidieri E., d'Emmanuele di Villa Bianca R., Sorrentino R., Miro A., Quaglia F., Imperi F., Leoni L., Ungaro F. Toward Repositioning Niclosamide for Antivirulence

Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections: Development of Inhalable Formulations through Nanosuspension Technology // Molecular pharmaceutics. – 2015. – V. 12. – № 8. – P. 2604-2617.

57. Crunkhorn S. Metabolic disease: Mitochondrial uncoupler reverses diabetes // Nature reviews. Drug discovery. – 2014. – V. 13. – № 12. – P. 885.

58. Curnock A.P., Thomson T.A., Westwood R., Kuo E.A., Williamson R.A., Yea C.M., Ruuthb E. Inhibition of stimulated Jurkat cell adenosine 3',5'-cyclic monophosphate synthesis by the immunomodulatory compound HR325 // Biochemical pharmacology. – 2001. – V. 61. – № 2. – P. 227-235.

59. Datta G., Bera T. The effects of clofazimine, niclosamide & amphotericin B, on electron transport of *Leishmania donovani* promastigotes // The Indian journal of medical research. – 2000. – V. 112. – № – P. 15-20.

60. Datta G., Bera T. Transplasma membrane electron transport in *Leishmania donovani* promastigotes // The Journal of eukaryotic microbiology. – 2002. – V. 49. – № 1. – P. 24-29.

61. de Carvalho L.P., Darby C.M., Rhee K.Y., Nathan C. Nitazoxanide Disrupts Membrane Potential and Intrabacterial pH Homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis* // ACS medicinal chemistry letters. – 2011. – V. 2. – № 11. – P. 849-854.

62. De Filippo E., Manga P., Schiedel A.C. Identification of Novel G Protein-Coupled Receptor 143 Ligands as Pharmacologic Tools for Investigating X-Linked Ocular Albinism // Investigative ophthalmology & visual science. – 2017. – V. 58. – № 7. – P. 3118-3126.

63. de la Torre R.A., de la Rua Barcelo R., Hernandez G., Espinosa J.J., Cortinas de Nava C. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans* // Mutation research. – 1989. – V. 222. – № 4. – P. 337-341.

64. de Vrieze E., Zethof J., Schulte-Merker S., Flik G., Metz J.R. Identification of novel osteogenic compounds by an ex-vivo sp7:luciferase zebrafish scale assay // Bone. – 2015. – V. 74. – № – P. 106-113.

65. Dehdashti S.J., Abbott J., Nguyen D.T., McKew J.C., Williamson P.R., Zheng W. A high-throughput screening assay for assessing the viability of

*Cryptococcus neoformans* under nutrient starvation conditions // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2013. – V. 405. – № 21. – P. 6823-6829.

66. Deng Y., Wang Z., Zhang F., Qiao M., Yan Z., Wei Q., Wang J., Liu H., Fan J., Zou Y., Liao J., Hu X., Chen L., Yu X., Haydon R.C., Luu H.H., Qi H., He T.C., Zhang J. A Blockade of IGF Signaling Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to the Anthelmintic Niclosamide-Induced Anti-Proliferative and Anticancer Activities // Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. – 2016. – V. 39. – № 3. – P. 871-888.

67. Devarakonda B., Hill R.A., Liebenberg W., Brits M., de Villiers M.M. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins // International journal of pharmaceutics. – 2005. – V. 304. – № 1-2. – P. 193-209.

68. DiRenzo D.M., Chaudhary M.A., Shi X., Franco S.R., Zent J., Wang K., Guo L.W., Kent K.C. A crosstalk between TGF-beta/Smad3 and Wnt/beta-catenin pathways promotes vascular smooth muscle cell proliferation // Cellular signalling. – 2016. – V. 28. – № 5. – P. 498-505.

69. Dole M., Nunez G., Merchant A.K., Maybaum J., Rode C.K., Bloch C.A., Castle V.P. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma // Cancer research. – 1994. – V. 54. – № 12. – P. 3253-3259.

70. Douch P.G., Gahagan H.M. The metabolism of niclosamide and related compounds by *Moniezia expansa*, *Ascaris lumbricoides* var suum, and mouse- and sheep-liver enzymes // Xenobiotica. – 1977. – V. 7. – № 5. – P. 301-307.

71. Dubey P., Gopinath P. Fabrication of electrospun poly(ethylene oxide)-poly(capro lactone) composite nanofibers for co-delivery of niclosamide and silver nanoparticles exhibits enhanced anti-cancer effects in vitro // Journal of Materials Chemistry B. – 2016. – V. 4. – № 4. – P. 726-742.

72. El-Mofty M., Reuber M., El-Sebae A., I. S. Introduction of neoplastic lesions in toads (*Bufo regularis*) with Bayluscid (Bayer 73). International Symposium on the Prevention of Occupational Cancer; 1982 21-24 April; Helsinki, Finland; 1982. p. 427-436.

73. Espinosa-Aguirre J.J., Aroumir C., Meza M.T., Cienfuegos E., Cortinas de Nava C. Genotoxicity of amebicide and antihelmintic drugs in *Escherichia coli* pol A+/pol A // Mutation research. – 1987. – V. 188. – № 2. – P. 111-120.
74. Espinosa-Aguirre J.J., Ramirez Santos J., Cortinas de Nava C. Influence of the Uvr repair system on the mutagenicity of antiparasitic drugs // Mutation research. – 1989. – V. 222. – № 3. – P. 161-166.
75. Espinosa-Aguirre J.J., Reyes R.E., Cortinas de Nava C. Mutagenic activity of 2-chloro-4-nitroaniline and 5-chlorosalicylic acid in *Salmonella typhimurium*: two possible metabolites of niclosamide // Mutation research. – 1991. – V. 264. – № 3. – P. 139-145.
76. Fang J., Sun L., Peng G., Xu J., Zhou R., Cao S., Chen H., Song Y. Identification of three antiviral inhibitors against Japanese encephalitis virus from library of pharmacologically active compounds 1280 // PloS one. – 2013. – V. 8. – № 11. – P. e78425.
77. Firsanov D.V., Solovjeva L.V., Svetlova M.P. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues // Clinical epigenetics. – 2011. – V. 2. – № 2. – P. 283-297.
78. Fomovska A., Wood R.D., Mui E., Dubey J.P., Ferreira L.R., Hickman M.R., Lee P.J., Leed S.E., Auschwitz J.M., Welsh W.J., Sommerville C., Woods S., Roberts C., McLeod R. Salicylanilide inhibitors of *Toxoplasma gondii* // Journal of medicinal chemistry. – 2012. – V. 55. – № 19. – P. 8375-8391.
79. 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., Tee A.R., Duong F., Andersen R.J., Orlowski J., Numata M., Sonenberg N., Roberge M. Structure-activity analysis of niclosamide reveals potential role for cytoplasmic pH in control of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling // The Journal of biological chemistry. – 2012. – V. 287. – № 21. – P. 17530-17545.
80. Furtek S.L., Matheson C.J., Backos D.S., Reigan P. Evaluation of quantitative assays for the identification of direct signal transducer and activator of

transcription 3 (STAT3) inhibitors // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 47. – P. 77998-78008.

81. Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M., Cecconi F., Choi A.M., Chu C.T., Codogno P., Colombo M.I., Cuervo A.M., Debnath J., Deretic V., Dikic I., Eskelinen E.L., Fimia G.M., Fulda S., Gewirtz D.A., Green D.R., Hansen M., Harper J.W., Jaattela M., Johansen T., Juhasz G., Kimmelman A.C., Kraft C., Ktistakis N.T., Kumar S., Levine B., Lopez-Otin C., Madeo F., Martens S., Martinez J., Melendez A., Mizushima N., Munz C., Murphy L.O., Penninger J.M., Piacentini M., Reggiori F., Rubinsztein D.C., Ryan K.M., Santambrogio L., Scorrano L., Simon A.K., Simon H.U., Simonsen A., Tavernarakis N., Tooze S.A., Yoshimori T., Yuan J., Yue Z., Zhong Q., Kroemer G. Molecular definitions of autophagy and related processes // The EMBO journal. – 2017. – V. 36. – № 13. – P. 1811-1836.

82. Gies E., Wilde I., Winget J.M., Brack M., Rotblat B., Novoa C.A., Balgi A.D., Sorensen P.H., Roberge M., Mayor T. Niclosamide prevents the formation of large ubiquitin-containing aggregates caused by proteasome inhibition // PloS one. – 2010. – V. 5. – № 12. – P. e14410.

83. Giovannini L., Bianchi S. Role of nutraceutical SIRT1 modulators in AMPK and mTOR pathway: Evidence of a synergistic effect // Nutrition. – 2017. – V. 34. – № – P. 82-96.

84. Giri A.K., Adhikari N., Khan K.A. Comparative genotoxicity of six salicylic acid derivatives in bone marrow cells of mice // Mutation research. – 1996. – V. 370. – № 1. – P. 1-9.

85. Gomez-Orte E., Saenz-Narciso B., Moreno S., Cabello J. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway // Trends in genetics : TIG. – 2013. – V. 29. – № 9. – P. 545-553.

86. Gönnert R., Schraufstätter E. A new molluscicide: molluscicide Bayer 73 International congress on tropical medicine and malaria (6th). Lisbon; 1959. p. 197-202.

87. Gooyit M., Janda K.D. Reprofiled anthelmintics abate hypervirulent stationary-phase Clostridium difficile // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – № – P. 33642.

88. Greco W.R., Bravo G., Parsons J.C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective // Pharmacological reviews. – 1995. – V. 47. – № 2. – P. 331-385.
89. Guo J., Tao H., Alasadi A., Huang Q., Jin S. Niclosamide piperazine prevents high-fat diet-induced obesity and diabetic symptoms in mice // Eating and weight disorders : EWD. – 2017. – P. s40519.
90. Gwisai T., Hollingsworth N.R., Cowles S., Tharmalingam N., Mylonakis E., Fuchs B.B., Shukla A. Repurposing niclosamide as a versatile antimicrobial surface coating against device-associated, hospital-acquired bacterial infections // Biomedical materials. – 2017. – V. 12. – № 4. – P. 045010.
91. Hamdoun S., Jung P., Efferth T. Drug Repurposing of the Anthelmintic Niclosamide to Treat Multidrug-Resistant Leukemia // Frontiers in pharmacology. – 2017. – V. 8. – P. fphar110.
92. Hsu C.W., Huang R., Khuc T., Shou D., Bullock J., Grooby S., Griffin S., Zou C., Little A., Astley H., Xia M. Identification of approved and investigational drugs that inhibit hypoxia-inducible factor-1 signaling // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 7. – P. 8172-8183.
93. Hsu J.T., Kuo C.J., Hsieh H.P., Wang Y.C., Huang K.K., Lin C.P., Huang P.F., Chen X., Liang P.H. Evaluation of metal-conjugated compounds as inhibitors of 3CL protease of SARS-CoV // FEBS letters. – 2004. – V. 574. – № 1-3. – P. 116-120.
94. Huang L., Yang M., Yuan Y., Li X., Kuang E. Corrigendum to "Niclosamide inhibits lytic replication of Epstein-Barr virus by disrupting mTOR activation" [(Antivir. Res.) 138 (2017) 68-78] // Antiviral research. – 2017. – V. 140. – № – P. 164-165.
95. Huang L., Yang M., Yuan Y., Li X., Kuang E. Niclosamide inhibits lytic replication of Epstein-Barr virus by disrupting mTOR activation // Antiviral research. – 2017. – V. 138. – № – P. 68-78.
96. Huang M., Qiu Q., Zeng S., Xiao Y., Shi M., Zou Y., Ye Y., Liang L., Yang X., Xu H. Niclosamide inhibits the inflammatory and angiogenic activation of

human umbilical vein endothelial cells // Inflamm Res. – 2015. – V. 64. – № 12. – P. 1023-1032.

97. Huang M., Zeng S., Qiu Q., Xiao Y., Shi M., Zou Y., Yang X., Xu H., Liang L. Niclosamide induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes // International immunopharmacology. – 2016. – V. 31. – № – P. 45-49.

98. Huang S., Chen J., Tian R., Wang J., Xie C., Gao H., Shan Y., Hong J., Zhang Z., Xu M., Gu S. Down-regulation of dishevelled-2 inhibits cell proliferation and invasion in hepatoblastoma // Pediatric blood & cancer. – 2018. – V. 65. – № 7. – P. e27032.

99. Iacobino A., Piccaro G., Giannoni F., Mustazzolu A., Fattorini L. Mycobacterium tuberculosis Is Selectively Killed by Rifampin and Rifapentine in Hypoxia at Neutral pH // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2017. – V. 61. – № 3. – P. e02296-02216.

100. Imperi F., Massai F., Ramachandran Pillai C., Longo F., Zennaro E., Rampioni G., Visca P., Leoni L. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 2. – P. 996-1005.

101. Ivnitski-Steele I., Larson R.S., Lovato D.M., Khawaja H.M., Winter S.S., Oprea T.I., Sklar L.A., Edwards B.S. High-throughput flow cytometry to detect selective inhibitors of ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporters // Assay Drug Dev Technol. – 2008. – V. 6. – № 2. – P. 263-276.

102. Jin B., Wang C., Li J., Du X., Ding K., Pan J. Anthelmintic Niclosamide Disrupts the Interplay of p65 and FOXM1/beta-catenin and Eradicates Leukemia Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2017. – V. 23. – № 3. – P. 789-803.

103. Jin B., Wang C., Shen Y., Pan J. Anthelmintic niclosamide suppresses transcription of BCR-ABL fusion oncogene via disabling Sp1 and induces apoptosis in imatinib-resistant CML cells harboring T315I mutant // Cell death & disease. – 2018. – V. 9. – № 2. – P. s41419.

104. Jin Y., Lu Z., Ding K., Li J., Du X., Chen C., Sun X., Wu Y., Zhou J., Pan J. Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species // *Cancer research.* – 2010. – V. 70. – № 6. – P. 2516-2527.
105. Johnson D.E., O'Keefe R.A., Grandis J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer // *Nature reviews. Clinical oncology.* – 2018. – V. 15. – № 4. – P. 234-248.
106. Jurgeit A., McDowell R., Moese S., Meldrum E., Schwendener R., Greber U.F. Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects // *PLoS pathogens.* – 2012. – V. 8. – № 10. – P. e1002976.
107. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? // *Nature reviews. Drug discovery.* – 2014. – V. 13. – № 7. – P. 513-532.
108. Kanim F.L., Merrick B.A., Giles H.V., Jankute M., Jackson J.B., Giles L.J., Birtwistle J., Bunce C.M., Drayson M.T. Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production // *Blood Cancer J.* – 2011. – V. 1. – № 10. – P. e39.
109. Kim M., Cooper D.D., Hayes S.F., Spangrude G.J. Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux // *Blood.* – 1998. – V. 91. – № 11. – P. 4106-4117.
110. Kim M.O., Choe M.H., Yoon Y.N., Ahn J., Yoo M., Jung K.Y., An S., Hwang S.G., Oh J.S., Kim J.S. Antihelminthic drug niclosamide inhibits CIP2A and reactivates tumor suppressor protein phosphatase 2A in non-small cell lung cancer cells // *Biochemical pharmacology.* – 2017. – V. 144. – № – P. 78-89.
111. King M.L., Lindberg M.E., Stodden G.R., Okuda H., Ebers S.D., Johnson A., Montag A., Lengyel E., MacLean Ii J.A., Hayashi K. WNT7A/beta-catenin signaling induces FGF1 and influences sensitivity to niclosamide in ovarian cancer // *Oncogene.* – 2015. – V. 34. – № 26. – P. 3452-3462.
112. Kosheleva L.I., Bekhli A.F. Polymorphic modifications of phenasal and their IR spectra // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 1974. – V. 8. – № 9. – P. 576-578.

113. Kumar S.U., Gopinath P. Controlled delivery of bPEI-niclosamide complexes by PEO nanofibers and evaluation of its anti-neoplastic potentials // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2015. – V. 131. – № – P. 170-181.
114. Lee S.L., Son A.R., Ahn J., Song J.Y. Niclosamide enhances ROS-mediated cell death through c-Jun activation // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2014. – V. 68. – № 5. – P. 619-624.
115. Li J., Li H., Zhan D., Xiang M., Yang J., Zuo Y., Yu Y., Zhou H., Jiang D., Luo H., Chen Z., Yu Z., Xu Z. Niclosamide sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation by downregulating Ku70/80 expression // Journal of Cancer. – 2018. – V. 9. – № 4. – P. 736-744.
116. Li M., Khambu B., Zhang H., Kang J.H., Chen X., Chen D., Vollmer L., Liu P.Q., Vogt A., Yin X.M. Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity // The Journal of biological chemistry. – 2013. – V. 288. – № 50. – P. 35769-35780.
117. 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. Niclosamide overcomes acquired resistance to erlotinib through suppression of STAT3 in non-small cell lung cancer // Mol Cancer Ther. – 2013. – V. 12. – № 10. – P. 2200-2212.
118. Li R., You S., Hu Z., Chen Z.G., Sica G.L., Khuri F.R., Curran W.J., Shin D.M., Deng X. Inhibition of STAT3 by niclosamide synergizes with erlotinib against head and neck cancer // PloS one. – 2013. – V. 8. – № 9. – P. e74670.
119. Li S.L., Yan J., Zhang Y.Q., Zhen C.L., Liu M.Y., Jin J., Gao J.L., Xiao X.L., Shen X., Tai Y., Hu N., Zhang X.Z., Sun Z.J., Dong D.L. Niclosamide ethanolamine inhibits artery constriction // Pharmacological research. – 2017. – V. 115. – № – P. 78-86.
120. Li X., Ding R., Han Z., Ma Z., Wang Y. Targeting of cell cycle and let-7a/STAT3 pathway by niclosamide inhibits proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2017. – V. 96. – № – P. 434-442.

121. Li X., Yang Z., Han Z., Wen Y., Ma Z., Wang Y. Niclosamide acts as a new inhibitor of vasculogenic mimicry in oral cancer through upregulation of miR-124 and downregulation of STAT3 // Oncology reports. – 2018. – V. 39. – № 2. – P. 827-833.
122. Li Y., Li P.K., Roberts M.J., Arend R.C., Samant R.S., Buchsbaum D.J. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug // Cancer letters. – 2014. – V. 349. – № 1. – P. 8-14.
123. Li Y., Oliver P.G., Lu W., Pathak V., Sridharan S., Augelli-Szafran C.E., Buchsbaum D.J., Suto M.J. SRI36160 is a specific inhibitor of Wnt/beta-catenin signaling in human pancreatic and colorectal cancer cells // Cancer letters. – 2017. – V. 389. – № – P. 41-48.
124. Li Z., Brecher M., Deng Y.Q., Zhang J., Sakamuru S., Liu B., Huang R., Koetzner C.A., Allen C.A., Jones S.A., Chen H., Zhang N.N., Tian M., Gao F., Lin Q., Banavali N., Zhou J., Boles N., Xia M., Kramer L.D., Qin C.F., Li H. Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction // Cell research. – 2017. – V. 27. – № 8. – P. 1046-1064.
125. Li Z., Li Q., Wang G., Huang Y., Mao X., Zhang Y., Wang X. Inhibition of Wnt/beta-catenin by anthelmintic drug niclosamide effectively targets growth, survival, and angiogenesis of retinoblastoma // American journal of translational research. – 2017. – V. 9. – № 8. – P. 3776-3786.
126. Li Z., Yu Y., Sun S., Qi B., Wang W., Yu A. Niclosamide inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell lines by inducing apoptosis and cell cycle arrest // Oncology reports. – 2015. – V. 33. – № 4. – P. 1763-1768.
127. Liang L., Huang M., Xiao Y., Zen S., Lao M., Zou Y., Shi M., Yang X., Xu H. Inhibitory effects of niclosamide on inflammation and migration of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis // Inflamm Res. – 2015. – V. 64. – № 3-4. – P. 225-233.
128. Liao Z., Nan G., Yan Z., Zeng L., Deng Y., Ye J., Zhang Z., Qiao M., Li R., Denduluri S., Wang J., Wei Q., Geng N., Zhao L., Lu S., Wang X., Zhou G., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C., Wang Z. The Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits the

Proliferative Activity of Human Osteosarcoma Cells by Targeting Multiple Signal Pathways // Curr Cancer Drug Targets. – 2015. – V. 15. – № 8. – P. 726-738.

129. Lin C.K., Bai M.Y., Hu T.M., Wang Y.C., Chao T.K., Weng S.J., Huang R.L., Su P.H., Lai H.C. Preclinical evaluation of a nanoformulated antihelminthic, niclosamide, in ovarian cancer // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 8. – P. 8993-9006.

130. Liu C., Armstrong C., Zhu Y., Lou W., Gao A.C. Niclosamide enhances abiraterone treatment via inhibition of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 22. – P. 32210-32220.

131. Liu C., Armstrong C.M., Lou W., Lombard A.P., Cucchiara V., Gu X., Yang J.C., Nadiminty N., Pan C.X., Evans C.P., Gao A.C. Niclosamide and bicalutamide combination treatment overcomes enzalutamide and bicalutamide resistant prostate cancer // Mol Cancer Ther. – 2017. – V. 16. – № 8. – P. 1521-1530.

132. Liu C., Lou W., Armstrong C., Zhu Y., Evans C.P., Gao A.C. Niclosamide suppresses cell migration and invasion in enzalutamide resistant prostate cancer cells via Stat3-AR axis inhibition // The Prostate. – 2015. – V. 75. – № 13. – P. 1341-1353.

133. Liu C., Lou W., Zhu Y., Nadiminty N., Schwartz C.T., Evans C.P., Gao A.C. Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2014. – V. 20. – № 12. – P. 3198-3210.

134. Liu C., Lou W., Zhu Y., Nadiminty N., Schwartz C.T., Evans C.P., Gao A.C. Correction: Niclosamide Inhibits Androgen Receptor Variants Expression and Overcomes Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2017. – V. 23. – № 1. – P. 323.

135. Liu F.L., Chen C.L., Lee C.C., Wu C.C., Hsu T.H., Tsai C.Y., Huang H.S., Chang D.M. The Simultaneous Inhibitory Effect of Niclosamide on RANKL-Induced Osteoclast Formation and Osteoblast Differentiation // International journal of medical sciences. – 2017. – V. 14. – № 9. – P. 840-852.

136. Liu J., Chen X., Ward T., Mao Y., Bockhorn J., Liu X., Wang G., Pegram M., Shen K. Niclosamide inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in lapatinib-resistant human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2016. – V. 71. – № – P. 12-23.
137. Liu J., Chen X., Ward T., Pegram M., Shen K. Combined niclosamide with cisplatin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in cisplatin-resistant triple-negative breast cancer // Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2016. – V. 37. – № 7. – P. 9825-9835.
138. Liu X.L., Zhang X.T., Meng J., Zhang H.F., Zhao Y., Li C., Sun Y., Mei Q.B., Zhang F., Zhang T. ING5 knockdown enhances migration and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via EGFR/PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways // Oncotarget. – 2017. – V. 33. – № 8. – P. 54265-54276.
139. Liu Z., Li Y., Lv C., Wang L., Song H. Anthelmintic drug niclosamide enhances the sensitivity of chronic myeloid leukemia cells to dasatinib through inhibiting Erk/Mnk1/eIF4E pathway // Biochemical and biophysical research communications. – 2016. – V. 478. – № 2. – P. 893-899.
140. Londono-Joshi A.I., Arend R.C., Aristizabal L., Lu W., Samant R.S., Metge B.J., Hidalgo B., Grizzle W.E., Conner M., Forero-Torres A., Lobuglio A.F., Li Y., Buchsbaum D.J. Effect of niclosamide on basal-like breast cancers // Mol Cancer Ther. – 2014. – V. 13. – № 4. – P. 800-811.
141. Lu J.M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P.H., Yao Q., Chen C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology // Expert Rev Mol Diagn. – 2009. – V. 9. – № 4. – P. 325-341.
142. Lu W., Lin C., Roberts M.J., Waud W.R., Piazza G.A., Li Y. Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/beta-catenin pathway // PloS one. – 2011. – V. 6. – № 12. – P. e29290.

143. Ma R., Ma Z.G., Zhen C.L., Shen X., Li S.L., Li L., Zheng Y.F., Dong D.L., Sun Z.J. Design, synthesis and characterization of poly (methacrylic acid-niclosamide) and its effect on arterial function // Materials science & engineering. C, Materials for biological applications. – 2017. – V. 77. – № – P. 352-359.
144. MacDonald M.L., Lamerdin J., Owens S., Keon B.H., Bilter G.K., Shang Z., Huang Z., Yu H., Dias J., Minami T., Michnick S.W., Westwick J.K. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells // Nat Chem Biol. – 2006. – V. 2. – № 6. – P. 329-337.
145. Manuel A.M., Walla M.D., Faccenda A., Martin S.L., Tanis R.M., Piroli G.G., Adam J., Kantor B., Mutus B., Townsend D.M., Frizzell N. Succination of Protein Disulfide Isomerase Links Mitochondrial Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in the Adipocyte During Diabetes // Antioxidants & redox signaling. – 2017. – V. 27. – № 16. – P. 1281-1296.
146. Matsui W.H. Cancer stem cell signaling pathways // Medicine. – 2016. – V. 95. – № 1 Suppl 1. – P. S8-S19.
147. Meng J., Zhang X.T., Liu X.L., Fan L., Li C., Sun Y., Liang X.H., Wang J.B., Mei Q.B., Zhang F., Zhang T. WSTF promotes proliferation and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways // Cellular signalling. – 2016. – V. 28. – № 11. – P. 1673-1682.
148. Mercer-Haines N., Fioravanti C.F. *Hymenolepis diminuta*: mitochondrial transhydrogenase as an additional site for anaerobic phosphorylation // Experimental parasitology. – 2008. – V. 119. – № 1. – P. 24-29.
149. Mercer N.A., McKelvey J.R., Fioravanti C.F. *Hymenolepis diminuta*: catalysis of transmembrane proton translocation by mitochondrial NADPH-->NAD transhydrogenase // Experimental parasitology. – 1999. – V. 91. – № 1. – P. 52-58.
150. Merschjohann K., Steverding D. In vitro trypanocidal activity of the anti-helminthic drug niclosamide // Experimental parasitology. – 2008. – V. 118. – № 4. – P. 637-640.
151. Mirkovic N., Voehringer D.W., Story M.D., McConkey D.J., McDonnell T.J., Meyn R.E. Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is

reversed by depleting cellular thiols // Oncogene. – 1997. – V. 15. – № 12. – P. 1461-1470.

152. Misra S.K., Jensen T.W., Pan D. Enriched inhibition of cancer and stem-like cancer cells via STAT-3 modulating niclocelles // Nanoscale. – 2015. – V. 7. – № 16. – P. 7127-7132.

153. Mohammad H., AbdelKhalek A., Abutaleb N.S., Seleem M.N. Repurposing niclosamide for intestinal decolonization of vancomycin-resistant enterococci // International journal of antimicrobial agents. – 2018. – V. 51. – № 6. – P. 897-904.

154. Monin M.B., Krause P., Stelling R., Bocuk D., Niebert S., Klemm F., Pukrop T., Koenig S. The anthelmintic niclosamide inhibits colorectal cancer cell lines via modulation of the canonical and noncanonical Wnt signaling pathway // J Surg Res. – 2016. – V. 203. – № 1. – P. 193-205.

155. Mook R.A., Jr., Chen M., Lu J., Barak L.S., Lyerly H.K., Chen W. Small molecule modulators of Wnt/beta-catenin signaling // Bioorg Med Chem Lett. – 2013. – V. 23. – № 7. – P. 2187-2191.

156. Mook R.A., Jr., Ren X.R., Wang J., Piao H., Barak L.S., Kim Lyerly H., Chen W. Benzimidazole inhibitors from the Niclosamide chemotype inhibit Wnt/beta-catenin signaling with selectivity over effects on ATP homeostasis // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2017. – V. 25. – № 6. – P. 1804-1816.

157. Mook R.A., Jr., Wang J., Ren X.R., Chen M., Spasojevic I., Barak L.S., Lyerly H.K., Chen W. Structure-activity studies of Wnt/beta-catenin inhibition in the Niclosamide chemotype: Identification of derivatives with improved drug exposure // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2015. – V. 23. – № 17. – P. 5829-5838.

158. Morin F., Kavian N., Nicco C., Cerles O., Chereau C., Batteux F. Improvement of Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease in Mice by Niclosamide // The Journal of investigative dermatology. – 2016. – V. 136. – № 11. – P. 2158-2167.

159. Morin F., Kavian N., Nicco C., Cerles O., Chereau C., Batteux F. Niclosamide Prevents Systemic Sclerosis in a Reactive Oxygen Species-Induced Mouse Model // Journal of immunology. – 2016. – V. 197. – № 8. – P. 3018-3028.

160. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of immunological methods. – 1983. – V. 65. – № 1-2. – P. 55-63.
161. Mudduluru G., Walther W., Kobelt D., Dahlmann M., Treese C., Assaraf Y.G., Stein U. Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets // Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. – 2016. – V. 26. – P. 10-27.
162. Napetschnig J., Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling // Annual review of biophysics. – 2013. – V. 42. – P. 443-468.
163. Naqvi S., Mohiyuddin S., Gopinath P. Niclosamide loaded biodegradable chitosan nanocargoes: an in vitro study for potential application in cancer therapy // Royal Society open science. – 2017. – V. 4. – № 11. – P. rsos.170611.
164. Natarajan R., Singal V., Benes R., Gao J., Chan H., Chen H., Yu Y., Zhou J., Wu P. STAT3 modulation to enhance motor neuron differentiation in human neural stem cells // PloS one. – 2014. – V. 9. – № 6. – P. e100405.
165. Neamati N., Hong H., Owen J.M., Sunder S., Winslow H.E., Christensen J.L., Zhao H., Burke T.R., Jr., Milne G.W., Pommier Y. Salicylhydrazine-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for a selective chelation in the integrase active site // Journal of medicinal chemistry. – 1998. – V. 41. – № 17. – P. 3202-3209.
166. Neuzil J., Dong L.F., Rohlena J., Truksa J., Ralph S.J. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria // Mitochondrion. – 2013. – V. 13. – № 3. – P. 199-208.
167. Ono M., Yin P., Navarro A., Moravek M.B., Coon V.J., Druschitz S.A., Gottardi C.J., Bulun S.E. Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth // Fertil Steril. – 2014. – V. 101. – № 5. – P. 1441-1449.
168. Ormerod M.G. Flow Cytometry - A Basic Introduction: Privately published; 2008.
169. Osada T., Chen M., Yang X.Y., Spasojevic I., Vandeusen J.B., Hsu D., Clary B.M., Clay T.M., Chen W., Morse M.A., Lyerly H.K. Antihelminth compound

niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations // Cancer research. – 2011. – V. 71. – № 12. – P. 4172-4182.

170. Osório J. Antihelminthic drug for T2DM therapy? // Nature Reviews Endocrinology. – 2014. – V. 10. – P. 702.

171. Ostadhossein F., Misra S.K., Mukherjee P., Ostadhossein A., Daza E., Tiwari S., Mittal S., Gryka M.C., Bhargava R., Pan D. Defined Host-Guest Chemistry on Nanocarbon for Sustained Inhibition of Cancer // Small. – 2016. – V. 42. – № 12. – P. 5845-5861.

172. Ostrosky-Wegman P., García G., Montero R., Pérez Romero B., Alvarez Chacón R., Cortinas de Nava C. Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed in vitro and in vivo // Mutation Research Letters. – 1986. – V. 173. – № 1. – P. 81-87.

173. P J., Ch V., A L., V G.M.N., Ch N., N S. Isolation, characterization using LC-ESI-QTOF, NMR and in vitro cytotoxicity assay of niclosamide forced degradation products // J Pharm Biomed Anal. – 2017. – V. 136. – № – P. 148-155.

174. Pardhi V., Chavan R.B., Thipparaboina R., Thatikonda S., Naidu V., Shastri N.R. Preparation, characterization, and cytotoxicity studies of niclosamide loaded mesoporous drug delivery systems // International journal of pharmaceutics. – 2017. – V. 528. – № 1-2. – P. 202-214.

175. Pardhi V., Chavan R.B., Thipparaboina R., Thatikonda S., Naidu V.G.M., Shastri N.R. Corrigendum to "Preparation, characterization, and cytotoxicity studies of niclosamide loaded mesoporous drug delivery systems" [Int. J. Pharm. 528 (2017) 202-214] // International journal of pharmaceutics. – 2018. – V. 544. – № 1. – P. 304-306.

176. Park J.P., Fioravanti C.F. Catalysis of NADH-->NADP+ transhydrogenation by adult *Hymenolepis diminuta* mitochondria // Parasitol Res. – 2006. – V. 98. – № 3. – P. 200-206.

177. Park S.J., Shin J.H., Kang H., Hwang J.J., Cho D.H. Niclosamide induces mitochondria fragmentation and promotes both apoptotic and autophagic cell death // BMB Rep. – 2011. – V. 44. – № 8. – P. 517-522.

178. Pathak V., Augelli-Szafran C.E., Wei H.X., Li Y., Oliver P.G., Lu W., Buchsbaum D.J., Suto M.J. Design and Synthesis of Novel Cyclic Amine Benzimidazoles for the Treatment of Pancreatic Cancer // Journal of medicinal chemistry. – 2017. – V. 60. – № 17. – P. 7615–7615.
179. Piccaro G., Giannoni F., Filippini P., Mustazzolu A., Fattorini L. Activities of drug combinations against *Mycobacterium tuberculosis* grown in aerobic and hypoxic acidic conditions // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 3. – P. 1428-1433.
180. Prather G.R., MacLean J.A., 2nd, Shi M., Boadu D.K., Paquet M., Hayashi K. Niclosamide As a Potential Nonsteroidal Therapy for Endometriosis That Preserves Reproductive Function in an Experimental Mouse Model // Biology of reproduction. – 2016. – V. 95. – № 4. – P. biolreprod.116.140236.
181. Rajamuthiah R., Fuchs B.B., Conery A.L., Kim W., Jayamani E., Kwon B., Ausubel F.M., Mylonakis E. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus* // PloS one. – 2015. – V. 10. – № 4. – P. e0124595.
182. Rehman M.U., Khan M.A., Khan W.S., Shafique M., Khan M. Fabrication of Niclosamide loaded solid lipid nanoparticles: in vitro characterization and comparative in vivo evaluation // Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2017. – V. 46. – № 8. – P. 1926-1934.
183. Ren X., Duan L., He Q., Zhang Z., Zhou Y., Wu D., Pan J., Pei D., Ding K. Identification of Niclosamide as a New Small-Molecule Inhibitor of the STAT3 Signaling Pathway // ACS medicinal chemistry letters. – 2010. – V. 1. – № 9. – P. 454-459.
184. Renner S.W., Walker L.M., Forsberg L.J., Sexton J.Z., Brenman J.E. Carbonic anhydrase III (Car3) is not required for fatty acid synthesis and does not protect against high-fat diet induced obesity in mice // PloS one. – 2017. – V. 12. – № 4. – P. e0176502.
185. Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer // Nature. – 2005. – V. 434. – № 7035. – P. 843-850.

186. Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 // The Journal of biological chemistry. – 1998. – V. 273. – № 10. – P. 5858-5868.
187. Russo A., Pellosi D.S., Pagliara V., Milone M.R., Pucci B., Caetano W., Hioka N., Budillon A., Ungaro F., Russo G., Quaglia F. Biotin-targeted Pluronic((R)) P123/F127 mixed micelles delivering niclosamide: A repositioning strategy to treat drug-resistant lung cancer cells // International journal of pharmaceutics. – 2016. – V. 511. – № 1. – P. 127-139.
188. Sabatini D.M. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – V. 114. – № 45. – P. 11818-11825.
189. Sack U., Walther W., Scudiero D., Selby M., Kobelt D., Lemm M., Fichtner I., Schlag P.M., Shoemaker R.H., Stein U. Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer // J Natl Cancer Inst. – 2011. – V. 103. – № 13. – P. 1018-1036.
190. Sahlin S., Hed J., Rundquist I. Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay // J Immunol Methods. – 1983. – V. 60. – № 1-2. – P. 115-124.
191. Satoh K., Zhang L., Zhang Y., Chelluri R., Boufraqech M., Nilubol N., Patel D., Shen M., Kebebew E. Identification of Niclosamide as a Novel Anticancer Agent for Adrenocortical Carcinoma // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2016. – V. 22. – № 14. – P. 3458-3466.
192. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease // Cell. – 2017. – V. 168. – № 6. – P. 960-976.
193. Senkowski W., Zhang X., Olofsson M.H., Isacson R., Hoglund U., Gustafsson M., Nygren P., Linder S., Larsson R., Fryknas M. Three-Dimensional Cell Culture-Based Screening Identifies the Anthelmintic Drug Nitazoxanide as a Candidate for Treatment of Colorectal Cancer // Mol Cancer Ther. – 2015. – V. 14. – № 6. – P. 1504-1516.

194. Shi L., Zheng H., Hu W., Zhou B., Dai X., Zhang Y., Liu Z., Wu X., Zhao C., Liang G. Niclosamide inhibition of STAT3 synergizes with erlotinib in human colon cancer // Onco Targets Ther. – 2017. – V. 10. – № – P. 1767-1776.
195. Shie J.J., Fang J.M., Kuo C.J., Kuo T.H., Liang P.H., Huang H.J., Yang W.B., Lin C.H., Chen J.L., Wu Y.T., Wong C.H. Discovery of potent anilide inhibitors against the severe acute respiratory syndrome 3CL protease // Journal of medicinal chemistry. – 2005. – V. 48. – № 13. – P. 4469-4473.
196. Sigma-Aldrich. Niclosamide: fiche de données de sécurité [Электронный ресурс]. – 2016. – Режим доступа:  
<ftp://ftp.mrn.gouv.qc.ca/Public/Drf/FichesSignaletiques/MSDS/50-65-7.pdf>  
(дата обращения 18.04.2016).
197. Sliwoski G., Schubert M., Stichel J., Weaver D., Beck-Sickinger A.G., Meiler J. Discovery of Small-Molecule Modulators of the Human Y4 Receptor // PloS one. – 2016. – V. 11. – № 6. – P. e0157146.
198. Stachulski A.V., Pidathala C., Row E.C., Sharma R., Berry N.G., Lawrenson A.S., Moores S.L., Iqbal M., Bentley J., Allman S.A., Edwards G., Helm A., Hellier J., Korba B.E., Semple J.E., Rossignol J.F. Thiazolides as novel antiviral agents. 2. Inhibition of hepatitis C virus replication // Journal of medicinal chemistry. – 2011. – V. 54. – № 24. – P. 8670-8680.
199. Stewart R.L., Carpenter B.L., West D.S., Knifley T., Liu L., Wang C., Weiss H.L., Gal T.S., Durbin E.B., Arnold S.M., O'Connor K.L., Chen M. S100A4 drives non-small cell lung cancer invasion, associates with poor prognosis, and is effectively targeted by the FDA-approved anti-helminthic agent niclosamide // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 23. – P. 34630-34642.
200. 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. Protein tyrosine phosphatase Meg2 dephosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and suppresses tumor growth in breast cancer // Breast cancer research : BCR. – 2012. – V. 14. – № 2. – P. R38.
201. Sukumar U.K., Gopinath P. Field-actuated antineoplastic potential of smart and versatile PEO-bPEI electrospun scaffold by multi-staged targeted co-delivery of

magnetite nanoparticles and niclosamide-bPEI complexes // RSC Advances. – 2016. – V. 6. – № 52. – P. 46186-46201.

202. Suliman M.A., Zhang Z., Na H., Ribeiro A.L., Zhang Y., Niang B., Hamid A.S., Zhang H., Xu L., Zuo Y. Niclosamide inhibits colon cancer progression through downregulation of the Notch pathway and upregulation of the tumor suppressor miR-200 family // International journal of molecular medicine. – 2016. – V. 38. – № 3. – P. 776-784.

203. Sun Z., Zhang Y. Antituberculosis activity of certain antifungal and antihelmintic drugs // Tuberle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. – 1999. – V. 79. – № 5. – P. 319-320.

204. Tan H.K., Moad A.I., Tan M.L. The mTOR signalling pathway in cancer and the potential mTOR inhibitory activities of natural phytochemicals // Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. – 2014. – V. 15. – № 16. – P. 6463-6475.

205. Tang Z., Acuna U.M., Fernandes N.F., Chettiar S., Li P.K., EC D.E.B. Structure-Activity Relationship of Niclosamide Derivatives // Anticancer Res. – 2017. – V. 37. – № 6. – P. 2839-2843.

206. Tao H., Zhang Y., Zeng X., Shulman G.I., Jin S. Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice // Nature medicine. – 2014. – V. 20. – № 11. – P. 1263-1269.

207. Tharmalingam N., Port J., Castillo D., Mylonakis E. Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat Helicobacter pylori // Scientific reports. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 3701.

208. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi Y., Sugiyama T., Yamamoto S., Ishige N. Niclosamide suppresses migration of hepatocellular carcinoma cells and downregulates matrix metalloproteinase-9 expression // Oncology letters. – 2015. – V. 10. – № 6. – P. 3515-3518.

209. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi Y., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M., Yoshida T. Niclosamide suppresses Hepatoma cell proliferation via the Wnt pathway // Onco Targets Ther. – 2013. – V. 6. – № – P. 1685-1693.

210. Torres N.S., Abercrombie J.J., Srinivasan A., Lopez-Ribot J.L., Ramasubramanian A.K., Leung K.P. Screening a Commercial Library of Pharmacologically Active Small Molecules against *Staphylococcus aureus* Biofilms // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – V. 60. – № 10. – P. 5663-5672.
211. van Tonder E.C., Mahlatji M.D., Malan S.F., Liebenberg W., Caira M.R., Song M., de Villiers M.M. Preparation and physicochemical characterization of 5 niclosamide solvates and 1 hemisolvate // AAPS PharmSciTech. – 2004. – V. 5. – № 1. – P. E12.
212. van Tonder E.C., Maleka T.S., Liebenberg W., Song M., Wurster D.E., de Villiers M.M. Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates // International journal of pharmaceutics. – 2004. – V. 269. – № 2. – P. 417-432.
213. Vega S.G., Guzman P., Garcia L., Espinosa J., Cortinas de Nava C. Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide // Mutation research. – 1988. – V. 204. – № 2. – P. 269-276.
214. Walters Haygood C.L., Arend R.C., Gangrade A., Chettiar S., Regan N., Hassmann C.J., 2nd, Li P.K., Hidalgo B., Straughn J.M., Jr., Buchsbaum D.J. Niclosamide Analogs for Treatment of Ovarian Cancer // Int J Gynecol Cancer. – 2015. – V. 25. – № 8. – P. 1377-1385.
215. Wang A.M., Ku H.H., Liang Y.C., Chen Y.C., Hwu Y.M., Yeh T.S. The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells // J Cell Biochem. – 2009. – V. 106. – № 4. – P. 682-692.
216. Wang W., Qin Z., Zhu D., Wei Y., Li S., Duan L. Synthesis, Bioactivity Evaluation, and Toxicity Assessment of Novel Salicylanilide Ester Derivatives as Cercaricides against *Schistosoma japonicum* and Molluscicides against *Oncomelania hupensis* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – V. 60. – № 1. – P. 323-331.

217. Wang Y.C., Chao T.K., Chang C.C., Yo Y.T., Yu M.H., Lai H.C. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells // PloS one. – 2013. – V. 8. – № 9. – P. e74538.
218. Wang Y.M., Lu J.W., Lin C.C., Chin Y.F., Wu T.Y., Lin L.I., Lai Z.Z., Kuo S.C., Ho Y.J. Antiviral activities of niclosamide and nitazoxanide against chikungunya virus entry and transmission // Antiviral research. – 2016. – V. 135. – P. 81-90.
219. Wen C.C., Kuo Y.H., Jan J.T., Liang P.H., Wang S.Y., Liu H.G., Lee C.K., Chang S.T., Kuo C.J., Lee S.S., Hou C.C., Hsiao P.W., Chien S.C., Shyur L.F., Yang N.S. Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus // Journal of medicinal chemistry. – 2007. – V. 50. – № 17. – P. 4087-4095.
220. Wen S., Zhu D., Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach // Future medicinal chemistry. – 2013. – V. 5. – № 1. – P. 53-67.
221. Weng S., Zhou L., Deng Q., Wang J., Yu Y., Zhu J., Yuan Y. Niclosamide induced cell apoptosis via upregulation of ATF3 and activation of PERK in Hepatocellular carcinoma cells // BMC Gastroenterol. – 2016. – V. 16. – № – P. 25.
222. WHO. Model List of Essential Medicines (20th List) [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа:  
[http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th\\_EML2017\\_FINAL\\_amendedAug2017.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017_FINAL_amendedAug2017.pdf?ua=1) (дата обращения 24.05.2017)
223. WHO. Model List of Essential Medicines for Children (6th List) [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа:  
[http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/6th\\_EMLc2017\\_FINAL\\_amendedAug2017.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/6th_EMLc2017_FINAL_amendedAug2017.pdf?ua=1) (дата обращения 24.05.2017)
224. Wieland A., Trageser D., Gogolok S., Reinartz R., Hofer H., Keller M., Leinhaas A., Schelle R., Normann S., Klaas L., Waha A., Koch P., Fimmers R., Pietsch T., Yachnis A.T., Pincus D.W., Steindler D.A., Brustle O., Simon M., Glas M., Scheffler B. Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma // Clinical cancer

research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2013. – V. 19. – № 15. – P. 4124-4136.

225. Wong A.L.A., Hirpara J.L., Pervaiz S., Eu J.Q., Sethi G., Goh B.C. Do STAT3 inhibitors have potential in the future for cancer therapy? // Expert opinion on investigational drugs. – 2017. – V. 26. – № 8. – P. 883-887.

226. WHO. Specifications and evaluations for public health pesticides: Niclosamide [Электронный ресурс]. – 2002. – Режим доступа:  
<https://www.who.int/whopes/quality/en/Niclosamide.pdf> (дата обращения 11.02.2017)

227. Wu C.J., Jan J.T., Chen C.M., Hsieh H.P., Hwang D.R., Liu H.W., Liu C.Y., Huang H.W., Chen S.C., Hong C.F., Lin R.K., Chao Y.S., Hsu J.T. Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication by niclosamide // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – V. 48. – № 7. – P. 2693-2696.

228. Wu C.S., Li Y.R., Chen J.J., Chen Y.C., Chu C.L., Pan I.H., Wu Y.S., Lin C.C. Antihelminthic niclosamide modulates dendritic cells activation and function // Cell Immunol. – 2014. – V. 288. – № 1-2. – P. 15-23.

229. Wu H.H., Zhang S., Bian H., Li X.X., Wang L., Pu Y.F., Wang Y.X., Guo C.B. Bevacizumab Regulates Cancer Cell Migration by Activation of STAT3 // Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. – 2015. – V. 16. – № 15. – P. 6501-6506.

230. Xia Y., Shen S., Verma I.M. NF-kappaB, an active player in human cancers // Cancer immunology research. – 2014. – V. 2. – № 9. – P. 823-830.

231. Xiang D., Yuan Y., Chen L., Liu X., Belani C., Cheng H. Niclosamide, an anti-helminthic molecule, downregulates the retroviral oncoprotein Tax and pro-survival Bcl-2 proteins in HTLV-1-transformed T lymphocytes // Biochemical and biophysical research communications. – 2015. – V. 464. – № 1. – P. 221-228.

232. Xiang M., Chen Z., Yang D., Li H., Zuo Y., Li J., Zhang W., Zhou H., Jiang D., Xu Z., Yu Z. Niclosamide enhances the antitumor effects of radiation by inhibiting the hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor signaling pathway in human lung cancer cells // Oncology letters. – 2017. – V. 14. – № 2. – P. 1933-1938.

233. Xiao X.L., Hu N., Zhang X.Z., Jiang M., Chen C., Ma R., Ma Z.G., Gao J.L., Xuan X.C., Sun Z.J., Dong D.L. Niclosamide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries // British journal of pharmacology. – 2018. – V. 175. – № 10. – P. 1707-1718.
234. Xie J., Wang X., Proud C.G. mTOR inhibitors in cancer therapy // F1000Research. – 2016. – V. 5. – P. F1000-2078.
235. Xie Y., Yao Y. Octenylsuccinate hydroxypropyl phytoglycogen enhances the solubility and in-vitro antitumor efficacy of niclosamide // International journal of pharmaceutics. – 2018. – V. 535. – № 1-2. – P. 157-163.
236. Xiong T., Zhao Q.P., Xu X.J., Liu R., Jiang M.S., Dong H.F. Morphological and enzymatical observations in *Oncomelania hupensis* after molluscicide treatment: implication for future molluscicide development // Parasitol Res. – 2016. – V. 115. – № 11. – P. 4139-4152.
237. Xu M., Lee E.M., Wen Z., Cheng Y., Huang W.K., Qian X., Tcw J., Kouznetsova J., Ogden S.C., Hammack C., Jacob F., Nguyen H.N., Itkin M., Hanna C., Shinn P., Allen C., Michael S.G., Simeonov A., Huang W., Christian K.M., Goate A., Brennand K.J., Huang R., Xia M., Ming G.L., Zheng W., Song H., Tang H. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen // Nature medicine. – 2016. – V. 22. – № 10. – P. 1101-1107.
238. Yang F., Ye T., Liu Z., Fang A., Luo Y., wei W., Li Y., Li Y., Zeng A., Deng Y., Gou H., Xie Y., Zhang Y., Wei Y. Niclosamide induces colorectal cancer apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in vivo // RSC Advances. – 2016. – V. 6. – № 107. – P. 106019-106030.
239. Yang W., de Villiers M.M. Effect of 4-sulphonato-calix[n]arenes and cyclodextrins on the solubilization of niclosamide, a poorly water soluble anthelmintic // AAPS J. – 2005. – V. 7. – № 1. – P. E241-248.
240. 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. The anthelmintic drug niclosamide induces

apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer model // PloS one. – 2014. – V. 9. – № 1. – P. e85887.

241. Ye Y., Zhang X., Zhang T., Wang H., Wu B. Design and evaluation of injectable niclosamide nanocrystals prepared by wet media milling technique // Drug development and industrial pharmacy. – 2015. – V. 41. – № 9. – P. 1416-1424.

242. Yin L., Gao Y., Zhang X., Wang J., Ding D., Zhang Y., Zhang J., Chen H. Niclosamide sensitizes triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation in association with the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling // Oncotarget. – 2016. – V. 7. – № 27. – P. 42126-42138.

243. 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., Huang T., Yu M.H., Lai H.C. Growth inhibition of ovarian tumor-initiating cells by niclosamide // Mol Cancer Ther. – 2012. – V. 11. – № 8. – P. 1703-1712.

244. Yoshikawa T., Miyamoto M., Aoyama T., Soyama H., Goto T., Hirata J., Suzuki A., Nagaoka I., Tsuda H., Furuya K., Takano M. JAK2/STAT3 pathway as a therapeutic target in ovarian cancers // Oncology letters. – 2018. – V. 15. – № 4. – P. 5772-5780.

245. You S., Li R., Park D., Xie M., Sica G.L., Cao Y., Xiao Z.Q., Deng X. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer // Mol Cancer Ther. – 2014. – V. 13. – № 3. – P. 606-616.

246. Yu K., Wang T., Li Y., Wang C., Wang X., Zhang M., Xie Y., Li S., An Z., Ye T. Niclosamide induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in human thyroid cancer in vitro // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2017. – V. 92. – № – P. 403-411.

247. Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. Wnt signaling in cancer // Oncogene. – 2017. – V. 36. – № 11. – P. 1461-1473.

248. Zhang L.X., Zhao H.J., Sun D.L., Gao S.L., Zhang H.M., Ding X.G. Niclosamide attenuates inflammatory cytokines via the autophagy pathway leading to

improved outcomes in renal ischemia/reperfusion injury // Molecular medicine reports. – 2017. – V. 16. – № 2. – P. 1810-1816.

249. Zhang X., Zhang Y., Zhang T., Zhang J., Wu B. Significantly enhanced bioavailability of niclosamide through submicron lipid emulsions with or without PEG-lipid: a comparative study // J Microencapsul. – 2015. – V. 32. – № 5. – P. 496-502.

250. Zhang X.W., Yap Y.L. Old drugs as lead compounds for a new disease? Binding analysis of SARS coronavirus main proteinase with HIV, psychotic and parasite drugs // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2004. – V. 12. – № 10. – P. 2517-2521.

251. Zhao J., He Q., Gong Z., Chen S., Cui L. Niclosamide suppresses renal cell carcinoma by inhibiting Wnt/beta-catenin and inducing mitochondrial dysfunctions // Springerplus. – 2016. – V. 5. – № 1. – P. 1436.

252. Zhao Y., Tao L., Yi J., Song H., Chen L. The Role of Canonical Wnt Signaling in Regulating Radioresistance // Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. – 2018. – V. 48. – № 2. – P. 419-432.

253. Zhou J., Jin B., Jin Y., Liu Y., Pan J. The antihelminthic drug niclosamide effectively inhibits the malignant phenotypes of uveal melanoma in vitro and in vivo // Theranostics. – 2017. – V. 7. – № 6. – P. 1447-1462.

254. Zhu P.J., Hobson J.P., Southall N., Qiu C., Thomas C.J., Lu J., Inglese J., Zheng W., Leppla S.H., Bugge T.H., Austin C.P., Liu S. Quantitative high-throughput screening identifies inhibitors of anthrax-induced cell death // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2009. – V. 17. – № 14. – P. 5139-5145.

255. Zuo Y., Yang D., Yu Y., Xiang M., Li H., Yang J., Li J., Jiang D., Zhou H., Xu Z., Yu Z. Niclosamide enhances the cytotoxic effect of cisplatin in cisplatin-resistant human lung cancer cells via suppression of lung resistance-related protein and c-myc // Molecular medicine reports. – 2018. – V. 17. – № 3. – P. 3497-3502.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю доктору биологических наук, профессору Елизавете Юрьевне Москалёвой за постоянное внимание и поддержку, за помошь в планировании экспериментов и написании работы.

Автор также благодарит сотрудников лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт» за создание атмосферы творческого научного поиска и неподдельный интерес к результатам исследования. Отдельная благодарность Ю.П. Сёмочкиной за помошь в выполнении проточной цитофлуориметрии. Автор выражает благодарность коллективу химиков под руководством к.х.н. Е.А. Воронцова за предоставление полимерной формы никлозамида и флуоресцентно меченых полимерных частиц.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

**Приложение 1. Противоопухолевая активность никлозамида в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток человека и лабораторных животных, оцениваемая по значению  $IC_{50}^*$**

<b>Вид клеток</b>		<b>Линия клеток</b>	<b>Значение <math>IC_{50}</math>, мкМ</b>	<b>Метод определения</b>	<b>Длительность инкубации, ч</b>	<b>Ссылка</b>
Лейкозы и лимфомы	клетки хронического миелоидного лейкоза мыши	32D-BCR-ABL	0,33	MTS-тест	72	[103]
	клетки хронического миелоидного лейкоза мыши	32D-T315I-BCR-ABL	3,06	MTS-тест	72	[103]
	острый лимфобластный лейкоз	CCRF-CEM	0,67 0,51	использование резазурина использование люциферина	72 72	[91] [122]
	острый лимфобластный лейкоз	CEM/ADR5000 <sup>1</sup>	0,84	использование резазурина	72	[91]
	острый промиелоцитарный лейкоз	HL-60	0,48 0,14 0,28±0,03	MTS-тест использование люциферина использование люциферина	72 72 72	[104] [122] [35]
	острый миелоидный лейкоз	OCI-AML3	0,79	MTS-тест	72	[104]
	хронический миелоидный лейкоз	K562	7,99 <sup>#</sup> 0,18 2,31	MTS-тест использование люциферина MTS-тест	72 72 72	[139] [122] [103]

	хронический миелоидный лейкоз	KBM5	0,65	MTS-тест	72	[103]
	хронический миелоидный лейкоз	KBM5-T315I	0,58	MTS-тест	72	[103]
	хронический миелоидный лейкоз	KBM-7	7,40 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[139]
	хронический миелоидный лейкоз	KCL22	7,63 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[139]
	острый миелоидный лейкоз	KG1	0,33±0,02	использование люциферина	72	[35]
	хронический миелоидный лейкоз	KU812	5,71 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[139]
	острый моноцитарный лейкоз	Molm13	0,72 0,42±0,04	MTS-тест использование люциферина	72 72	[104] [35]
	острый лимфобластный лейкоз	MOLT-4	0,22	использование люциферина	72	[122]
	миеломоноцитарный лейкоз	MV4-11	1,00 0,56±0,07	MTS-тест использование люциферина	72 72	[104] [35]
	лимфома	Akata (+)	3,83±0,13	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[95]
	лимфома Беркитта	BJAB	1,49±0,04	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[95]
	лимфома Беркитта	P3HR-1	1,06±0,09	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[95]
	анапластическая крупноклеточная лимфома	SR	0,13	использование люциферина	72	[122]

	гистиоцитарная лимфома	U937	0,41 0,34±0,07	MTS-тест использование люциферина	72 72	[104] [35]
	лейкоз	ОКП <sup>2</sup>	0,01-0,72	MTS-тест	72	[104]
	острый миелоидный лейкоз	ОКП <sup>3</sup>	0,51±0,05	использование люциферина	96	[35]
Множественная миелома и злокачественные плазмоклеточные новообразования	плазмоцитома	H929	0,80 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	плазмоцитома	JJN3	1,40 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	миелома	LME-1	0,80 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	плазмоцитома	OPM1	0,90 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	плазмоцитома	RPMI8226	1,20 <sup>#</sup> 1,27 0,05	использование резазурина использование резазурина использование люциферина	72 72 72	[108] [91] [122]
	миелома	U226	1,20 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	миелома	UM1	1,20 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	плазмоцитома	UM3	1,30 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[108]
	миелома	ОКП <sup>4</sup>	0,60-5,00	проточная цитофлуориметрия	48	[108]
	злокачественные новообразования головного мозга	LN229	2,53	использование резазурина	120	[224]
	астроцитома	SF-268	0,53	использование люциферина	72	[122]
	gliобластома	SF-295	1,05	использование люциферина	72	[122]
	глиосаркома	SF-539	2,25	использование люциферина	72	[122]
	астроцитома	SNB-19	0,29	использование люциферина	72	[122]
	gliобластома	SNB-75	1,14	использование люциферина	72	[122]
	мультиформная gliобластома	T98G	2,35	использование резазурина	120	[224]

	глиобластома	U87	1,59 0,40 1,27 5,95 <sup>#</sup>	использование резазурина MTT-тест MTT-тест MTS-тест	120 120 96 24	[224] [144] [113] [44]
	астроцитома	U138	2,78	использование резазурина	120	[224]
	астроцитома	U251	0,34	использование люциферина	72	[122]
	астроцитома	U373	2,05	использование резазурина	120	[224]
	глиобластома	ОКП <sup>5</sup>	0,30-1,20	использование резазурина	120	[224]
Злокачественные новообразования бронхов и лёгкого	карцинома	A549	2,87 <sup>#</sup>	MTT-тест	24	[29]
			3,00±0,20	MTT-тест	72	[183]
			0,80 <sup>#</sup>	SRB-тест	72	[245]
			1,67	MTT-тест	96	[113]
			0,88 <sup>#</sup>	MTT-тест	72	[187]
			0,50 <sup>#</sup>	MTT-тест	72	[199]
			5,13	использование резазурина	72	[91]
			0,40	MTT-тест	120	[144]
			4,80±1,00	WST-8-тест	48	[124]
			0,96	использование люциферина	72	[122]
			0,99	WST-8-тест	48	[232]
			1,84	MTT-тест	24	[110]
			4,46	MTT-тест	48	[235]
			2,60±0,21	WST-8-тест	24	[255]

	карцинома	CPr-A549 <sup>6</sup> A549/DDP <sup>6</sup>	1,80 $1,15 \pm 0,18$	MTT-тест WST-8-тест	72 24	[187] [255]
	аденокарцинома	EKVX	0,50	использование люциферины	72	[122]
	немелкоклеточный рак (карцинома)	H1299	0,84 0,99	WST-8-тест MTT-тест	48 24	[232] [110]
	бронхоальвеолярная карцинома	H358	<0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	72	[199]
	аденокарцинома	HCC827	>0,50 <sup>#</sup>	SRB-тест	48	[117]
	аденокарцинома	HCC827/ER <sup>7</sup>	>0,50 <sup>#</sup>	SRB-тест	48	[117]
	аденокарцинома	HOP-62	0,41	использование люциферины	72	[122]
	немелкоклеточный рак (карцинома)	HOP-92	0,61	использование люциферины	72	[122]
	немелкоклеточный рак (аденокарцинома)	NCI-23	0,22	использование люциферины	72	[122]
	эпителиоидноклеточная мезотелиома плевры	NCI-H226	0,73	использование люциферины	72	[122]
	аденокарцинома	NCI-H322M	0,61	использование люциферины	72	[122]
	крупноклеточная карцинома	NCI-H460	0,86±0,07 0,16 0,71	MTT-тест использование люциферины MTT-тест	48 72 24	[174] [122] [110]
	немелкоклеточный рак (аденокарцинома)	NCI-H522	0,26	использование люциферины	72	[122]

Злокачественные новообразования поджелудочной железы	метастатическая аденокарцинома	AsPC1	1,47	MTS-тест	72	[39]
	карцинома	MIA PaCa-2	1,10	MTT-тест	120	[144]
	эпителиоидная карцинома	Panc-1	1,73	MTS-тест	72	[39]
	протоковая аденокарцинома	S2VP10	0,70	использование люциферины	72	[178]
	протоковая аденокарцинома	S2VP10/CIC <sup>8</sup>	0,05	использование люциферины	72	[178]
	протоковая аденокарцинома	Suit-2	7,50	использование люциферины	72	[178]
	протоковая аденокарцинома	Suit-2/CIC <sup>9</sup>	2,70	использование люциферины	72	[178]
Злокачественные новообразования печени и внутривеночных желчных протоков	печеночноклеточный рак	AVA5	10,00	использование НК	72	[198]
	печеночноклеточный рак	Hep3B	0,50 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[209]
			0,20	использование люциферины	72	[38]
	печеночноклеточный рак	Hep40	0,81	использование люциферины	72	[38]
	печеночноклеточный рак	HepG2	0,85 <sup>#</sup>	WST-8-тест	72	[221]
			0,85	использование люциферины	72	[38]
			2,60 <sup>#</sup>	WST-1-тест	24	[181]
			0,83 <sup>#</sup>	MTS-тест	16	[87]
			12,23	WST-1-тест	24	[207]
			7,00	WST-8-тест	48	[98]
	печеночноклеточный рак	HLF	10,00	MTS-тест	72	[208]

	гепатобластома	Huh-6	0,23 <sup>#</sup> 6,60	MTS-тест WST-8-тест	72 48	[209] [98]
	печеночноклеточный рак	Huh7	0,74	использование люциферина	72	[38]
	карцинома	PLC/PRL/5	2,62 <sup>#</sup> 0,77	MTS-тест использование люциферина	72 72	[208] [38]
	печеночноклеточный рак	QGY7701	1,30 <sup>#</sup>	WST-8-тест	72	[221]
	печеночноклеточный рак	SNU-182	0,36	использование люциферина	72	[38]
	печеночноклеточный рак	SNU-398	0,24	использование люциферина	72	[38]
	плеоморфный печеночноклеточный рак	SNU-423	0,32	использование люциферина	72	[38]
	печеночноклеточный рак	SNU-449	0,67	использование люциферина	72	[38]
	печеночноклеточный рак	SNU-475	0,40	использование люциферина	72	[38]
Злокачественные новообразования головы и шеи	карцинома носоглотки	C666-1	0,25±0,10	MTT-тест	48	[95]
	карцинома носоглотки	CNE-2	1,15±0,04	WST-8-тест	48	[115]
	карцинома носоглотки	HNE1-2089	6,03±0,78	MTT-тест	48	[95]
	карцинома носоглотки	HONE-1	0,74±0,02	WST-8-тест	48	[115]
	плоскоклеточный рак ротовой полости	Tca83	>10,00 <sup>#</sup>	WST-8-тест	24	[120]
	плоскоклеточный рак головы и шеи	Tu212	>0,50 <sup>#</sup>	SRB-тест	48	[118]
	плоскоклеточный рак гортани	Tu686	>0,50 <sup>#</sup>	SRB-тест	48	[118]

	плоскоклеточный рак ротовой полости	WSU-HN6	>10,00 <sup>#</sup>	WST-8-тест	24	[120]
Злокачественные новообразования предстательной железы	карцинома	C4-2 AR-V7 <sup>10</sup>	<0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[133]
	карцинома	C4-2B AbiR <sup>11</sup>	<0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[130]
	карцинома	C4-2B MDVR <sup>12</sup>	0,48 <sup>#</sup> <0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup> подсчёт клеток <sup>47</sup>	48 48	[133] [130]
	карцинома	C4-2 neo <sup>13</sup>	<0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[133]
	карцинома	CWR22Rv1	0,50 <sup>#</sup> 0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup> подсчёт клеток <sup>47</sup>	48 48	[133] [130]
	карцинома	Du145	0,70±0,10 0,58 1,01 0,60	MTT-тест использование люциферины использование резазурина использование люциферины	72 72 24 72	[183] [142] [53] [122]
	аденокарцинома	LNCaP-s17 <sup>14</sup>	>0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[132]
	аденокарцинома	PC3	11,70±2,30 0,71 0,41±0,02 1,68 <sup>#</sup> 0,62 18,13	MTT-тест использование люциферины MTT-тест MTT-тест использование люциферины MTT-тест	72 72 120 48 72 48	[183] [142] [144] [174] [122] [235]
Колоректальный рак	аденокарцинома ободочной кишки	Caco-2	0,65 <sup>#</sup>	MTT-тест	72	[169]

	аденокарцинома толстой кишки крысы	CC531	3,17 <sup>#</sup>	MTS-тест	24	[154]
	аденокарцинома толстой кишки	COLO-205	0,98	использование люциферины	72	[122]
	аденокарцинома толстой кишки	DLD-1	3,83 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[13]
	аденокарцинома толстой кишки	HCC-2998	1,25	использование люциферины	72	[122]
	карцинома толстой кишки	HCT116	0,46 <sup>#</sup> 2,20 $0,45\pm0,05$ 1,24 <sup>#</sup> $1,67\pm0,46$ 2,08 <sup>#</sup> $0,40\pm0,20$ 2,55 <sup>#</sup> $6,37\pm0,80$ $0,48\pm0,02$ 0,37 0,94	MTT-тест использование резазурина MTS-тест использование флуоресцеина использование люциферины MTT-тест MTT-тест подсчёт клеток <sup>47</sup> MTT-тест MTT-тест использование люциферины MTS-тест	72 24 72 72 72 72 72 48 72 48 72 72 72 72 72	[169] [189] [157] [193] [92] [202] [194] [13] [238] [174] [122] [28]
	аденокарцинома толстой кишки	HCT-15	1,56 <sup>#</sup> 1,06	MTT-тест использование люциферины	48 72	[174] [122]

	карцинома толстой кишки	HT-29	7,20±1,20	MTT-тест использование флуоресцеина использование резазурина MTT-тест MTT-тест использование люциферина	72	[183]
			4,57 <sup>#</sup>		72	[169]
			1,50		72	[193]
			8,06		72	[91]
			8,10±1,40		72	[194]
			2,21±0,40		72	[238]
			4,17		72	[122]
	карцинома толстой кишки	KM12	1,07	использование люциферина	72	[122]
	аденокарцинома толстой кишки	LoVo	1,99 <sup>#</sup>	MTT-тест MTT-тест	72	[202]
			0,70		120	[144]
	аденокарцинома толстой кишки	SW480	0,53 <sup>#</sup>	MTS-тест подсчёт клеток <sup>47</sup>	24	[154]
			1,91 <sup>#</sup>		48	[13]
	аденокарцинома толстой кишки	SW620	0,52 <sup>#</sup>	MTS-тест MTT-тест MTT-тест MTT-тест использование люциферина	24	[154]
			2,60 <sup>#</sup>		72	[202]
			2,90±0,60		72	[194]
			8,73±0,90		72	[238]
			0,54		72	[122]
	колоректальный рак	ОКП <sup>15</sup>	0,15-10,00	MTT-тест	72	[169]
	карцинома толстой кишки мыши	CT26	2,28±0,50	MTT-тест	72	[238]
Злокачественные новообразования костей и	остеосаркома	143B	0,21 <sup>#</sup>	использование КФ	72	[128]
	остеосаркома	MG-63	0,76 <sup>#</sup> 0,47 <sup>#</sup>	WST-8-тест использование КФ	48 72	[126] [128]

суставных хрящей	остеосаркома	U2OS	0,76 <sup>#</sup>	WST-8-тест	48	[126]
Злокачественные новообразования молочной железы	аденокарцинома	2LMP	0,44±0,29	использование люциферина	48	[140]
	аденокарцинома	2LMP NAAE <sup>16</sup>	0,29±0,19	использование люциферина	48	[140]
	протоковый рак	BT474	1,97 <sup>#</sup>	WST-8-тест	48	[136]
	протоковый рак	BT474-LR <sup>17</sup>	0,74 <sup>#</sup>	WST-8-тест	48	[136]
	протоковый рак	BT-549	0,86	использование люциферина	72	[122]
	протоковый рак	HCC1143	1,10±0,12	использование люциферина	48	[140]
	протоковый рак	HCC1143 NAAE <sup>18</sup>	0,17±0,09	использование люциферина	48	[140]
	протоковый рак	HCC1187	1,90±1,15	использование люциферина	48	[140]
	протоковый рак	HCC1187 NAAE <sup>19</sup>	0,18±0,06	использование люциферина	48	[140]
	протоковый рак	HS578T	0,43	использование люциферина	72	[122]
аденокарцинома	MCF-7	0,92 <sup>#</sup>	MTT-тест	24	[29]	
		1,05	MTT-тест	72	[240]	
		0,63 <sup>#</sup>	MTT-тест	48	[79]	
		1,06	MTS-тест	72	[39]	
		6,64 <sup>#</sup>	использование люциферина	72	[217]	
		20,00±3,00	MTT-тест	72	[152]	
		45,00±4,00	MTT-тест	48	[171]	
		0,38	использование люциферина	72	[122]	
аденокарцинома	MDA-MB-231	0,75	использование люциферина	72	[142]	
		0,95	MTT-тест	72	[240]	
		0,79	MTS-тест	72	[39]	
		5,93 <sup>#</sup>	использование люциферина	72	[217]	

			30,00±5,00 1,42 <sup>#</sup> 2,44 2,39 <sup>#</sup> 0,86	MTT-тест использование резазурина использование резазурина MTT-тест использование люциферины	72 48 72 48 72	[152] [137] [91] [174] [122]
	аденокарцинома	MDA-MB-231-CR <sup>20</sup>	3,49 <sup>#</sup>	использование резазурина	48	[137]
	аденокарцинома	MDA-MB-468	1,88 0,24	MTT-тест использование люциферины	72 72	[240] [122]
	аденокарцинома	SKBR3	2,86 <sup>#</sup>	WST-8-тест	48	[136]
	аденокарцинома	SKBR3-LR <sup>21</sup>	0,54 <sup>#</sup>	WST-8-тест	48	[136]
	тройной негативный рак	SUM159	0,33±0,04	использование люциферины	48	[140]
	тройной негативный рак	SUM159 NAAE <sup>22</sup>	0,18±0,09	использование люциферины	48	[140]
	протоковый рак	T-47D	0,33 0,43	использование люциферины использование люциферины	72 72	[142] [122]
	тройной негативный рак	ОКП <sup>23</sup>	0,22-2,65 <sup>#</sup>	использование люциферины	48	[140]
	карцинома молочной железы мыши	4T1	2,00 <sup>#</sup>	MTT-тест	72	[240]
Злокачественные новообразования яичника	эндометриоидная аденокарцинома	A2780	0,90 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[111]
	эндометриоидная аденокарцинома	A2780cp20	0,56	использование люциферины	48	[20]
	эндометриоидная аденокарцинома	A2780ip2	0,59	использование люциферины	48	[20]

	эндометриоидная аденокарцинома	CP70 <sup>24</sup>	>3,00 <sup>#</sup> 4,63 <sup>#</sup> 4,80	использование люциферины MTS-тест MTS-тест	24 72 72	[243] [129] [24]
	эндометриоидная аденокарцинома	CP70sps <sup>25</sup>	1,93 <sup>#</sup>	MTS-тест	48	[243]
	серозная аденокарцинома	HeyA8	0,40 <sup>#</sup>	WST-1-тест	72	[66]
	эндометриоидная аденокарцинома	IGR-OV1	1,01	использование люциферины	72	[122]
	светлоклеточная карцинома	KK	1,62 <sup>#</sup>	MTT-тест	120	[244]
	серозная аденокарцинома	NCI/ADR-RES	0,38	использование люциферины	72	[122]
	серозная аденокарцинома	OVCAR-3	0,35	использование люциферины	72	[122]
	серозная аденокарцинома	OVCAR-4	0,61	использование люциферины	72	[122]
	серозная аденокарцинома	OVCAR-5	0,76	использование люциферины	72	[122]
	серозная аденокарцинома	OVCAR-8	0,81	использование люциферины	72	[122]
	аденокарцинома	SKOV3	0,83 <sup>#</sup> 4,63 <sup>#</sup> >12,00 0,72	WST-1-тест MTS-тест MTS-тест использование люциферины	72 72 72 72	[66] [129] [24] [122]
	аденокарцинома	SKOV3.ip1	1,00 1,20 1,83	использование люциферины подсчёт клеток <sup>47</sup> использование люциферины	48 48 48	[22] [111] [20]
	аденокарцинома	SKOV3TRip2	1,13	использование люциферины	48	[20]
	рак яичников	ОКП <sup>26</sup>	<3,00 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[243]

	рак яичников	ОКП <sup>27</sup>	0,10-4,00	использование люциферина	48	[22]
	рак яичников	ОКП <sup>28</sup>	0,10-5,00	использование люциферина	48	[214]
	рак яичников	ОКП <sup>29</sup>	0,50-3,00	использование люциферина	48	[214]
	рак яичников	ОКП <sup>30</sup>	1,17-1,52 <sup>#</sup>	использование люциферина	48	[20]
	рак яичников	ОКП <sup>31</sup>	0,07-1,52 <sup>#</sup>	использование люциферина	48	[20]
Злокачественные новообразования шейки матки	карцинома	C-33A	2,49 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[40]
	эпидермоидная карцинома	CaLo	7,10 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[40]
	эпидермоидная карцинома	CasKi	6,84 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[40]
	карцинома	DoTc2	2,93 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[40]
	эпителиоидная карцинома	HeLa	1,40±0,20 1,00 <sup>#</sup> 1,09±0,90 8,25 <sup>#</sup> 5,57	MTT-тест WST-8-тест MTT-тест MTS-тест MTT-тест	72 120 24 72 48	[183] [177] [80] [40] [235]
	эпидермоидная карцинома	ME-180	2,04	использование люциферина	72	[92]
	эпидермоидная карцинома	SiHa	7,06 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[40]
	эпидермоидная карцинома	ViBo	2,93 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[40]
Другие типы опухолевых клеток	эпидермоидная карцинома кожи	A431	8,80±0,90	MTT-тест	72	[183]
	уvealная меланома	92.1	1,18	MTS-тест	72	[253]
	меланома кожи	C32	4,00±1,00	MTT-тест	72	[152]
	амеланотическая меланома	LOX-IMVI	0,60	использование люциферина	72	[122]
	амеланотическая меланома	M14	0,74	использование люциферина	72	[122]

меланома	MALME-3M	0,74	использование люциферина	72	[122]
uveальная меланома	Mel270	1,35	MTS-тест	72	[253]
амеланотическая меланома	MDA-MB-435	0,52	использование люциферина	72	[122]
uveальная меланома	Omm1	0,58	MTS-тест	72	[253]
uveальная меланома	Omm2.3	1,00	MTS-тест	72	[253]
меланома	SK-MEL-2	1,32	использование люциферина	72	[122]
меланома кожи	SK-MEL-5	0,40	использование люциферина	72	[122]
меланома кожи	SK-MEL-28	0,95	использование люциферина	72	[122]
меланома	UACC-62	0,22	использование люциферина	72	[122]
меланома	UACC-257	1,07	использование люциферина	72	[122]
ретинобластома	RB116	0,79 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[125]
ретинобластома	WERI-Rb-1	0,59 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[125]
ретинобластома	Y79	0,72 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[125]
аденокарцинома почки	786-0	1,01	использование люциферина	72	[122]
карцинома почки	A-498	2,46 <sup>#</sup> 0,52	MTS-тест использование люциферина	72 72	[251] [122]
аденокарцинома почки	ACHN	0,54	использование люциферина	72	[122]
светлоклеточный почечноклеточный рак	CAKI-1	1,11	использование люциферина	72	[122]
карцинома почки	RXF393	0,86	использование люциферина	72	[122]
карцинома почки	SN12C	0,58	использование люциферина	72	[122]
светлоклеточный почечноклеточный рак	SW-839	1,79 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[251]

	светло-клеточный рак почки	TK-10	0,51	использование люциферина	72	[122]
	карцинома почки	UO-31	0,55	использование люциферина	72	[122]
	адренокортический рак	BD140A	0,12	использование красителя CyQUANT GR	48	[191]
	карцинома коры надпочечников	NCI-H295R	0,53	использование красителя CyQUANT GR	48	[191]
	мелкоклеточный рак коры надпочечников	SW-13	0,15	использование красителя CyQUANT GR	48	[191]
	анапластическая карцинома щитовидной железы	ACT-1	2,08 <sup>#</sup>	MTT-тест	72	[246]
	папиллярная карцинома щитовидной железы	BCPAP	14,86	MTT-тест	72	[246]
	папиллярная карцинома щитовидной железы	TPC-1	7,86	MTT-тест	72	[246]
	плоскоклеточный рак пищевода	EC9076	4,74	MTS-тест	24	[241]
	аденокарцинома желудка	AGS	12,23	WST-1-тест	24	[207]
Лейомиома матки	ОКП <sup>32</sup>		0,33 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[167]
Нормальные клетки	астроциты <sup>33</sup>		7,08 <sup>#</sup>	использование люциферина	25	[237]
	HCK <sup>34</sup>	H9.2p58	1,70	использование резазурина	120	[224]
	HCK	K048	4,12 <sup>#</sup> 3,64 <sup>#</sup>	WST-1-тест WST-1-тест	72 72	[164] [164]

	HCK <sup>35</sup>	PKI-3	1,82	использование резазурина	120	[224]
	эпителиальные клетки бронхов	CFBE41o-	>1000,00	MTT-тест	3	[56]
	эпителиальные клетки молочной железы	HBL-100	>5,00 <sup>#</sup>	WST-8-тест	48	[136]
			>5,00 <sup>#</sup>		48	[137]
	MCF10A	hTERT-HME1	>10,00 <sup>#</sup>	использование резазурина	72	[33]
			>0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[140]
			>5,00 <sup>#</sup>	использование люциферины	48	[136]
			>10,00 <sup>#</sup>	WST-8-тест	72	[33]
			>5,00 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[137]
	клетки почки эмбриона	HEK293	0,70	использование люциферины	72	[123]
			1,80	MTT-тест	48	[216]
	первичные гепатоциты	Hu1651	3,58	использование люциферины	72	[38]
		Hu1748	3,64	использование люциферины	72	[38]
		Hu8216	4,31	использование люциферины	72	[38]
	клетки печени	LO2	9,00±0,30	MTT-тест	72	[238]
	эпителиальные клетки предстательной железы	PZ-HPV7	>0,50 <sup>#</sup>	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[133]
	эндотелиальные клетки пуповинной вены	HUVEC	>40,00	MTT-тест	24	[233]
	лёгочные фибробласты	LL47	1,30	использование люциферины	72	[123]
	лёгочные фибробласты	IMR90	88,60	MTT-тест	24	[110]

	нормальные фибробласты	4,54	MTS-тест	72	[104]
	КД <sup>36</sup>	6,20-16,30	MTS-тест	72	[104]
	КД <sup>37</sup>	>1,00 >80,00 >100,00 <sup>#</sup>	проточная цитофлуориметрия подсчёт клеток <sup>47</sup> ЛДГ-тест	168 48 0,5	[108] [95] [173]
	КД <sup>38</sup>	1,72	использование резазурина	120	[224]
	КД <sup>39</sup>	7,56 <sup>#</sup>	MTS-тест	24	[154]
	КД <sup>40</sup>	>1,00 <sup>#</sup>	MTT-тест	48	[97]
	КД <sup>41</sup>	>0,50 <sup>#</sup>	MTT-тест	48	[96]
миобlastы мыши	C2C12	2,30	использование люциферины	72	[123]
эмбриональные фибробласты мыши	MEF NIH3T3	5,78 2,43 <sup>#</sup>	MTS-тест MTT-тест	72 72	[104] [187]
предшественники В- лимфоцитов мыши	PD36	>0,75	подсчёт клеток <sup>47</sup>	48	[47]
первичные предшественники В-лимфоцитов мыши <sup>42</sup>		>0,50	подсчёт клеток <sup>47</sup>	72	[47]
макрофаги мыши	RAW264.7	>4,00 <sup>#</sup>	MTT-тест	24	[135]
первичные макрофаги мыши <sup>43</sup>		>4,00 <sup>#</sup>	MTT-тест	24	[135]
дendритные клетки мыши <sup>44</sup>		>2,50 <sup>#</sup>	WST-8-тест	18	[228]
предшественники остеобластов мыши	MC3T3-E1	1,00 <sup>#</sup>	MTT-тест	48	[135]
меланоциты мыши <sup>45</sup>	Melan-a	0,64 <sup>#</sup>	MTS-тест	72	[62]

	ГМК крысы <sup>46</sup>	A10	4,43 4,43	MTT-тест MTT-тест	24 24	[143] [233]
	первичные фибробласти крысы		>50,00 <sup>#</sup>	MTS-тест	24	[154]
	фибробласти почки сирийского хомячка	BHK21	43,26 >20,00	использование люциферина WST-8-тест	120 16	[76] [218]
	эпителиальные клетки почки зелёной африканской мартышки	Vero	12,73±0,50 250,00 22,10	MTT-тест MTS-тест MTT-тест	72 48 72	[238] [227] [219]

\* - IC<sub>50</sub> - концентрация препарата, при которой погибает 50% клеток; # - значение вычислено на основе графических данных авторов. В графах таблицы приведены данные по клеткам человека, если не указано иное. Сокращения: ОКП - опухолевые клетки пациентов, КД - клетки практически здоровых добровольцев, НСК - нейральные стволовые клетки, КФ – кристаллический фиолетовый, НК – нейтральный красный, ЛДГ - лактатдегидрогеназа. 1 - линия клеток СЕМ/ADR5000, устойчивая к доксорубицину, получена из клеток линии CCRF-СЕМ; 2 - получены от 81 пациента с острым миелобластным, острым лимфобластным и хроническим миелобластным лейкозом; 3 – клетки, полученные из костного мозга пациента с острым миелобластным лейкозом; 4 - мононуклеарные клетки, полученные из костного мозга 4 пациентов с первичной множественной миеломой; 5 - получены от 21 пациента с первичной глиобластомой; 6 - линии клеток CPr-A549 и A549/DDP, устойчивые к цисплатину, получены из клеток линии A549; 7 - линия клеток НСС827/ER, устойчивая к эрлотинибу, получена из клеток линии НСС827; 8 - клетки S2VP10/CIC с увеличенным содержанием ОСК (CIC - cancer-initiating cells) получены при культивировании клеток линии S2VP10 в условиях, препятствующих адгезии; 9 - клетки Suit-2/CIC с увеличенным содержанием ОСК (CIC - cancer-initiating cells) получены при культивировании клеток линии Suit-2 в условиях, препятствующих адгезии; 10 - линия клеток C4-2 AR-V7 получена из клеток линии C4-2 при стабильной трансфекции вектором AR-V7; 11 - линия клеток C4-2B AbiR, устойчивая к абиратерону, получена из

клеток линии C4-2B; 12 - линия клеток C4-2B MDVR, устойчивая к энзалутамиду, получена из клеток линии C4-2B; 13 - линия клеток C4-2 neo получена из клеток линии C4-2 при стабильной трансфекции вектором pcDNA3.1; 14 - линия клеток LNCaP-s17 получена из клеток линии LNCaP при стабильной трансфекции вектором IL6; 15 - получены от 3 пациентов с метастатическим колоректальным раком; 16 - клетки 2LMP NAAE с высоким уровнем экспрессии ALDH получены при культивировании клеток линии 2LMP в условиях, препятствующих адгезии; 17 - клетки BT474-LR, устойчивые к лапатинибу, получены из клеток линии BT474; 18 - HCC1143 NAAE с высоким уровнем экспрессии ALDH получены при культивировании клеток линии HCC1143 в условиях, препятствующих адгезии; 19 - HCC1187 NAAE с высоким уровнем экспрессии ALDH, получены при культивировании клеток линии HCC1187 в условиях, препятствующих адгезии; 20 - линия клеток MDA-MB-231-CR, устойчивая к цисплатину, получена из клеток линии MDA-MB-231; 21 - клетки SKBR3-LR, устойчивые к лапатинибу, получены из клеток линии SKBR3; 22 - клетки SUM159 NAAE с высоким уровнем экспрессии ALDH получены при культивировании клеток линии SUM159 в условиях, препятствующих адгезии; 23 - клетки, полученные из экссудата в плевральной полости 4 пациентов с тройным негативным раком молочной железы, культивируемые в условиях, препятствующих адгезии; 24 - линия клеток CP70, устойчивая к цисплатину, получена из клеток линии A2780; 25 - клетки CP70sps (side population spheroid) получены при культивировании клеток фракции SP (side population) линии CP70 в виде сфероидов; 26 - клетки, полученные из асцитической жидкости 4 пациентов с раком яичников, культивируемые в виде сфероидов; 27 - клетки, полученные из асцитической жидкости 34 пациентов с раком яичников при первом хирургическом вмешательстве, после неоадъювантной химиотерапии или во время рецидива болезни, культивируемые в виде сфероидов; 28 - клетки, полученные из асцитической жидкости 24 пациентов с раком яичников, не отвечающих на терапию препаратами платины, при первом хирургическом вмешательстве, после неоадъювантной химиотерапии или во время рецидива болезни, культивируемые в виде сфероидов; 29 - клетки, полученные от 6 пациентов с раком яичников, не отвечающих

на терапию препаратами платины, при первом хирургическом вмешательстве, после неоадьювантной химиотерапии или во время рецидива болезни, культивируемые в виде эксплантной культуры; 30 - клетки, полученные от пациента с резистентным раком яичников; 31 - клетки, полученные от пациента с резистентным раком яичников, культивируемые в условиях, препятствующих адгезии; 32 - клетки, полученные от 4 пациентов с лейомиомой матки, не получавших гормональные препараты и ранее не имевших злокачественных опухолей матки (приведено среднее значение IC<sub>50</sub>); 33 - астроциты, полученные путём дифференцировки нейральных прогениторных клеток переднего мозга, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток линии C1-2, полученных путём эпигенетического перепрограммирования фибробластов кожи человека линии BJ; 34 - нейральные стволовые клетки, полученные из эмбриональных стволовых клеток человека линии H9.2; 35 - нейральные стволовые клетки, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток линии PKa, полученных путём эпигенетического перепрограммирования фибробластов кожи человека; 36 - мононуклеарные клетки, полученные из костного мозга 4 практически здоровых добровольцев; 37 - мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови практически здоровых добровольцев; 38 - нейральные прогениторные клетки, полученные из гиппокампа практически здорового добровольца; 39 - первичные фибробласти кожи, полученные от практически здорового добровольца; 40 - фибробластоподобные синовиоциты, полученные от практически здоровых добровольцев, имеющих повреждение мениска или крестообразной связки коленного сустава; 41 - первичные эндотелиальные клетки пуповинной вены человека; 42 - первичные предшественники В-лимфоцитов, выделенные из костного мозга 5-недельной мыши линии FVB; 43 - первичные макрофаги, выделенные из костного мозга 8-10-недельной мыши линии DBA/1J; 44 - дендритные клетки, выделенные из костного мозга 4-6-недельной мыши линии C57BL/6; 45 - меланоциты, полученные из эпидермальных меланобластов эмбриона мыши линии C57BL; 46 - гладкомышечные клетки грудной части аорты эмбриона крысы; 47 - подсчёт количества живых клеток после окрашивания трипановым синим.

**Приложение 2. Копия патента на изобретение ПФН**

