Национальный исследовательский центр«Курчатовский институт»
Лаборатория молекулярной биологии и клеточной медицины

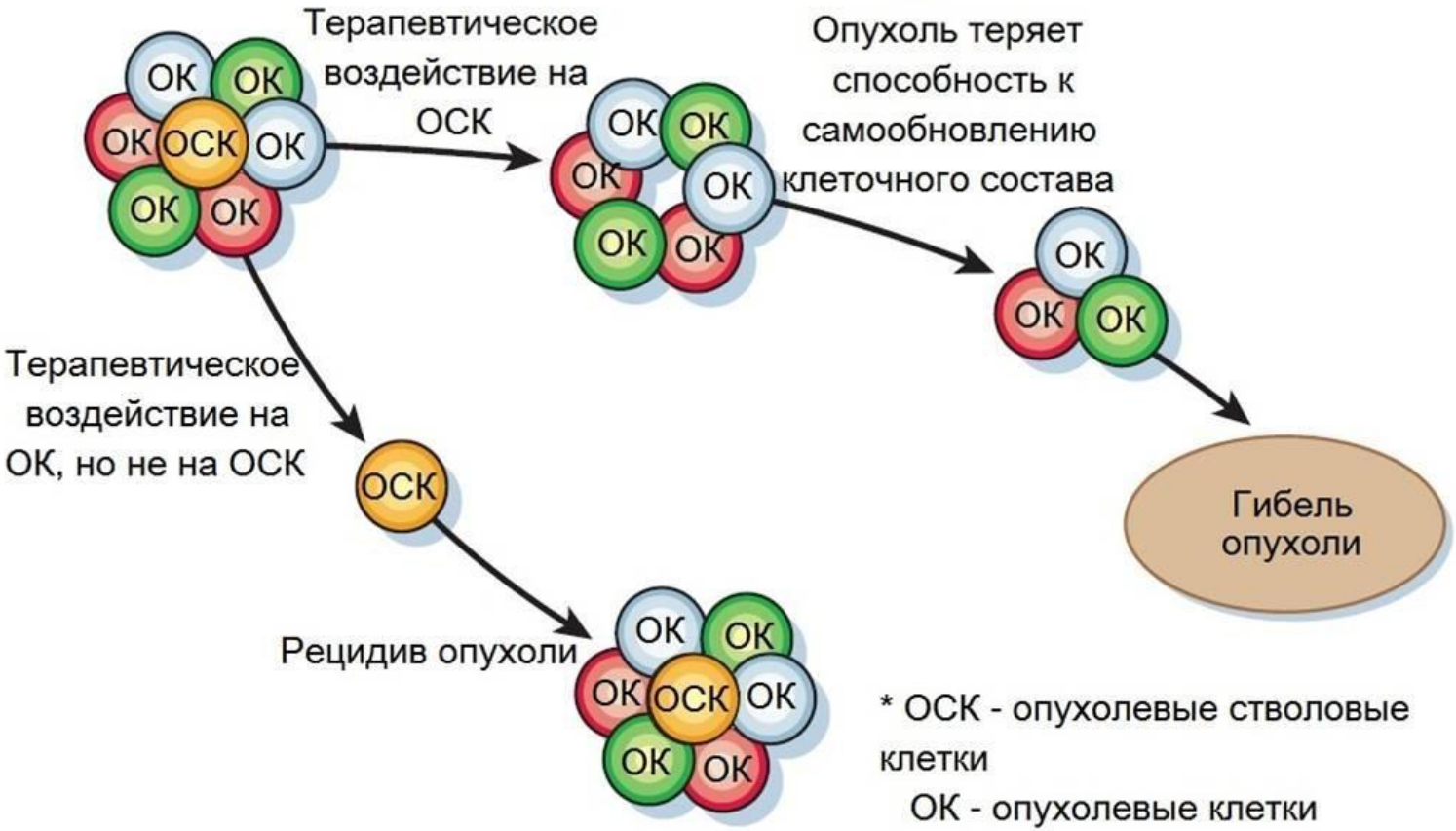
АНТИГЕЛЬМИНТНЫЙ ПРЕПАРАТ НИКЛОЗАМИД, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОР ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

В.Г. Шуватова, А.П. Кувырченкова, Ю.П. Сёмочкина, Е.Ю. Москалёва

Международная конференция
«Проблемы химической защиты и репарации при радиационных воздействиях»
30 и 31 мая 2018 г., г. Дубна

Роль опухолевых стволовых клеток (ОСК) в устойчивости опухолей

Содержание ОСК в разных типах опухолей: **0,1-2,5%**



Механизмы устойчивости ОСК к повреждающим факторам

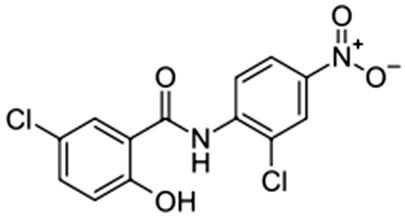
Химиотерапевтические препараты:

- Повышенная экспрессия генов, кодирующих АТФ-зависимые транспортеры (ABCG2, ABCB1 и ABCC1)
- Большая продолжительность жизни в состоянии покоя

Ионизирующее излучение:

- Высокий уровень репарации ДНК
- Высокий уровень антиоксидантов, в том числе глутатиона
- Активация сигнальных путей Notch, Wnt и Hedgehog

Противоопухолевая активность никлозамида и ее механизмы



5-хлор-N-(2-хлор-4-нитрофенил)-2-оксибензамид

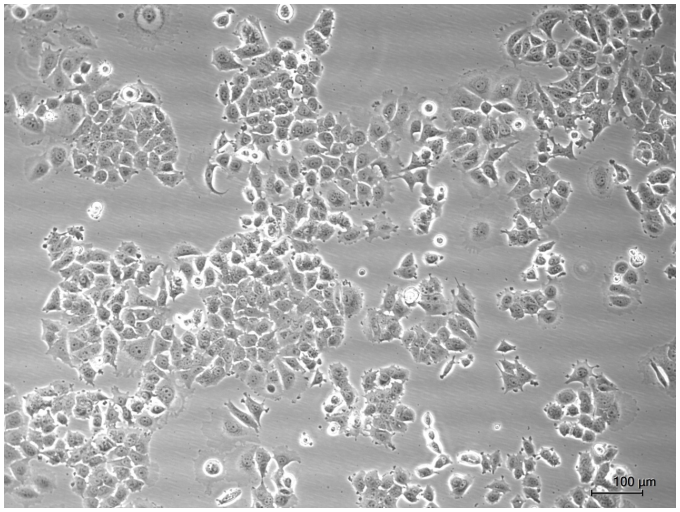
Вид опухоли	Обнаруженный механизм	Источник
Лейкоз	Подавление активности сигнального пути NF-kB. Образование активных метаболитов кислорода.	Jin Y., 2010.
Эритролейкоз	Подавление активности сигнального пути Notch.	Chikara Sh., 2013.
Множественная миелома	Образование активных метаболитов кислорода, в том числе, супероксидного аниона в митохондриях Подавление активности сигнальных путей NF-kB и STAT3.	Khanim F.L., 2011.
	Снижение митохондриального мембранного потенциала и разобщение окислительного фосфорилирования.	Park J.P., 2006.
Глиобластома	Подавление активности сигнальных путей WNT/β-катенин, Notch, mTOR и NF-kB.	Wieland A., 2013.
Гепатома	Подавление активности сигнального пути Wnt.	Tomizawa M., 2013.
Рак толстой кишки	Подавление активности сигнального пути Wnt.	Osada T., 2011.
Рак яичника	Подавление активности сигнального пути WNT7A/β-катенин.	King M.L., 2015.
Рак головы и шеи	Подавление активности сигнального пути STAT3.	Li R., 2013.
Немелкоклеточный рак лёгкого	Подавление активности сигнального пути STAT3/Bcl2/Bcl-XL.	Li R., 2013.
Рак молочной железы	Подавление активности сигнального пути STAT3.	Wang Y.C., 2013.

Е.Ю. Москалева, В.Г. Перевозчикова, А.С. Жирник, С.Е. Северин. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности никлозамида. Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 6, с. 680-693

Цель:

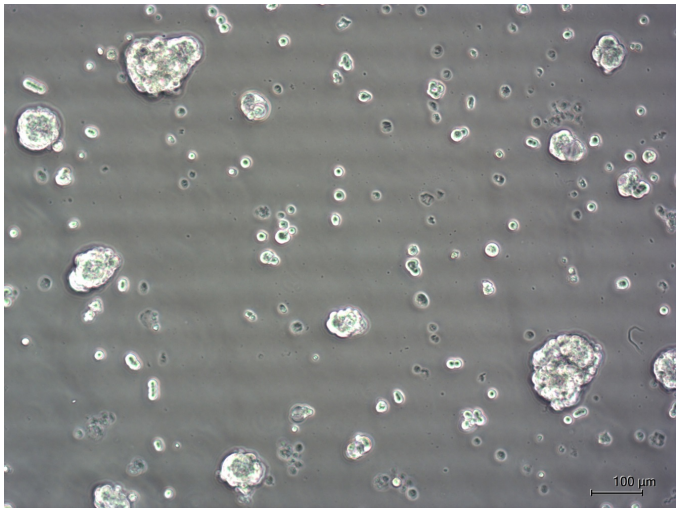
Изучение молекулярных механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7.

Обогащение культуры клеток линии MCF-7 ОСК



Адгезионная культура:

Культуральная среда DMEM
+ 10% фетальной бычьей сыворотки
+ 50 мкг/мл гентамицина

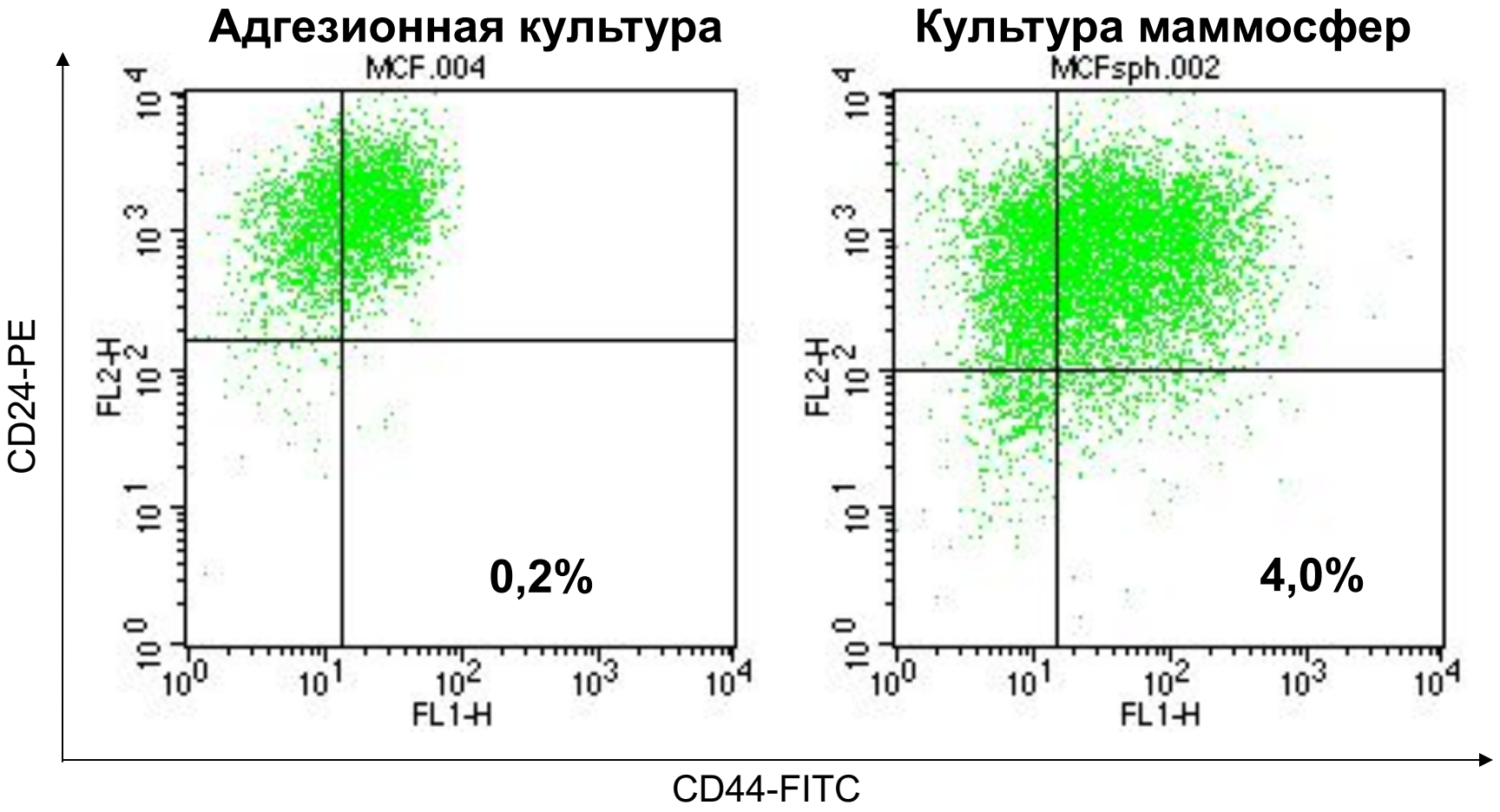


Культура маммосфер, обогащенная ОСК:

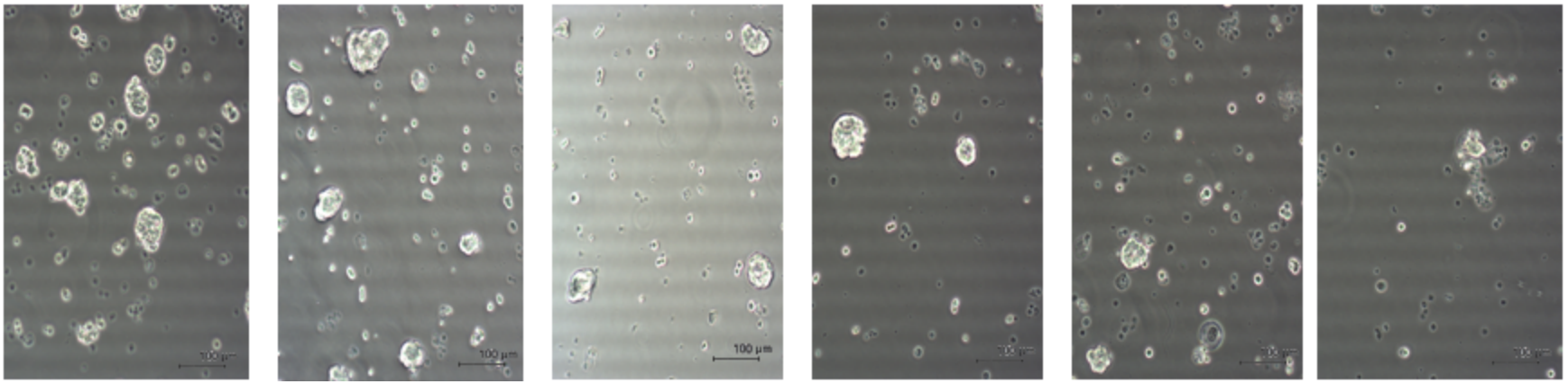
Среда DMEM/F12 без фенолового красного
+ 20 нг/мл EGF, 10 нг/мл bFGF
+ 2% B27
+ 10 мкг/мл инсулина
+ 4 мкг/мл гепарина
+ 50 мкг/мл гентамицина

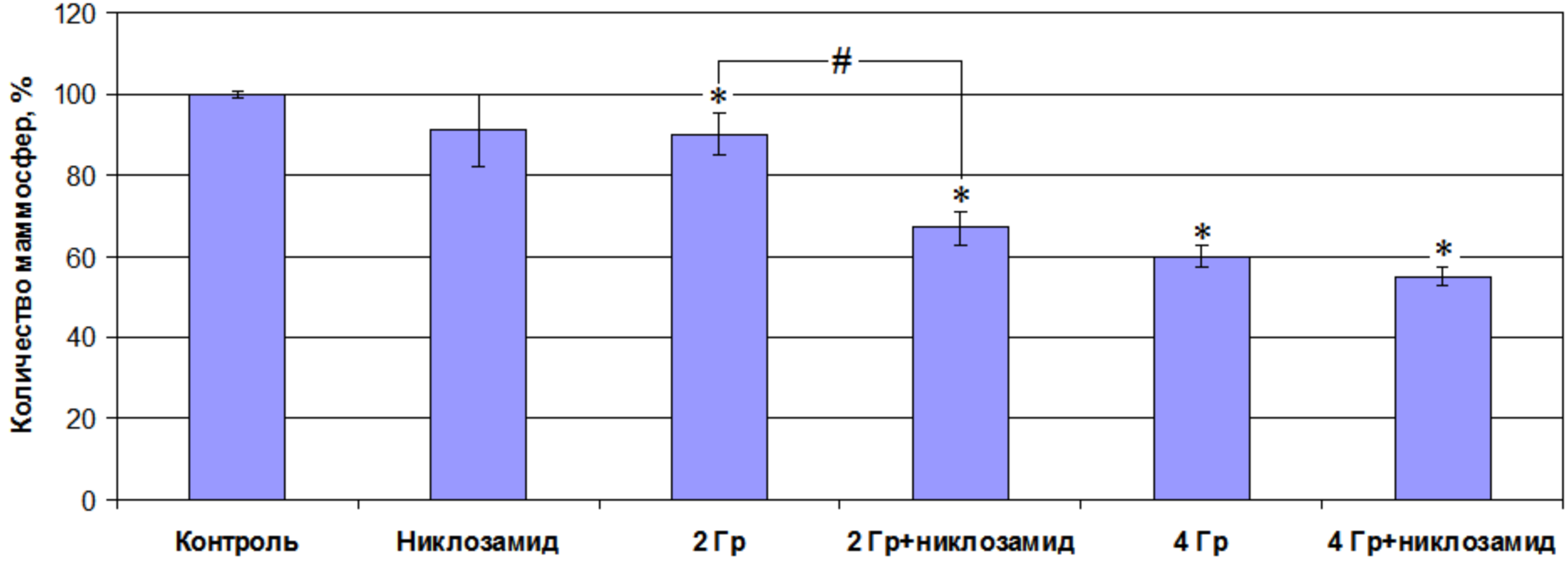
Доля ОСК в адгезионной культуре и культуре маммосфер линии MCF-7

Фенотип ОСК линии MCF-7: **CD44^{+}/CD24$^{-/low}$**



Влияние никлозамида и γ-излучения на количество маммосфер линии MCF-7 через 7 суток после облучения

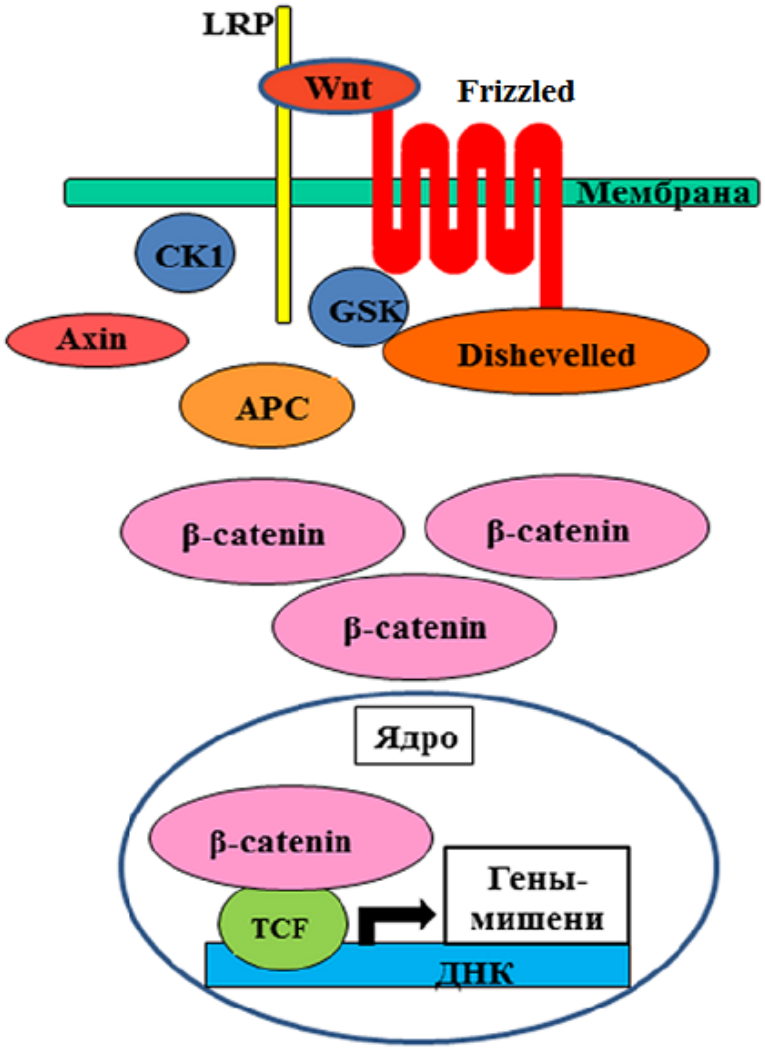




* Отличия от контроля значимы, $p < 0,05$

\# Отличия между группами значимы, $p < 0,05$.

Механизм активации канонического сигнального пути Wnt, основные этапы



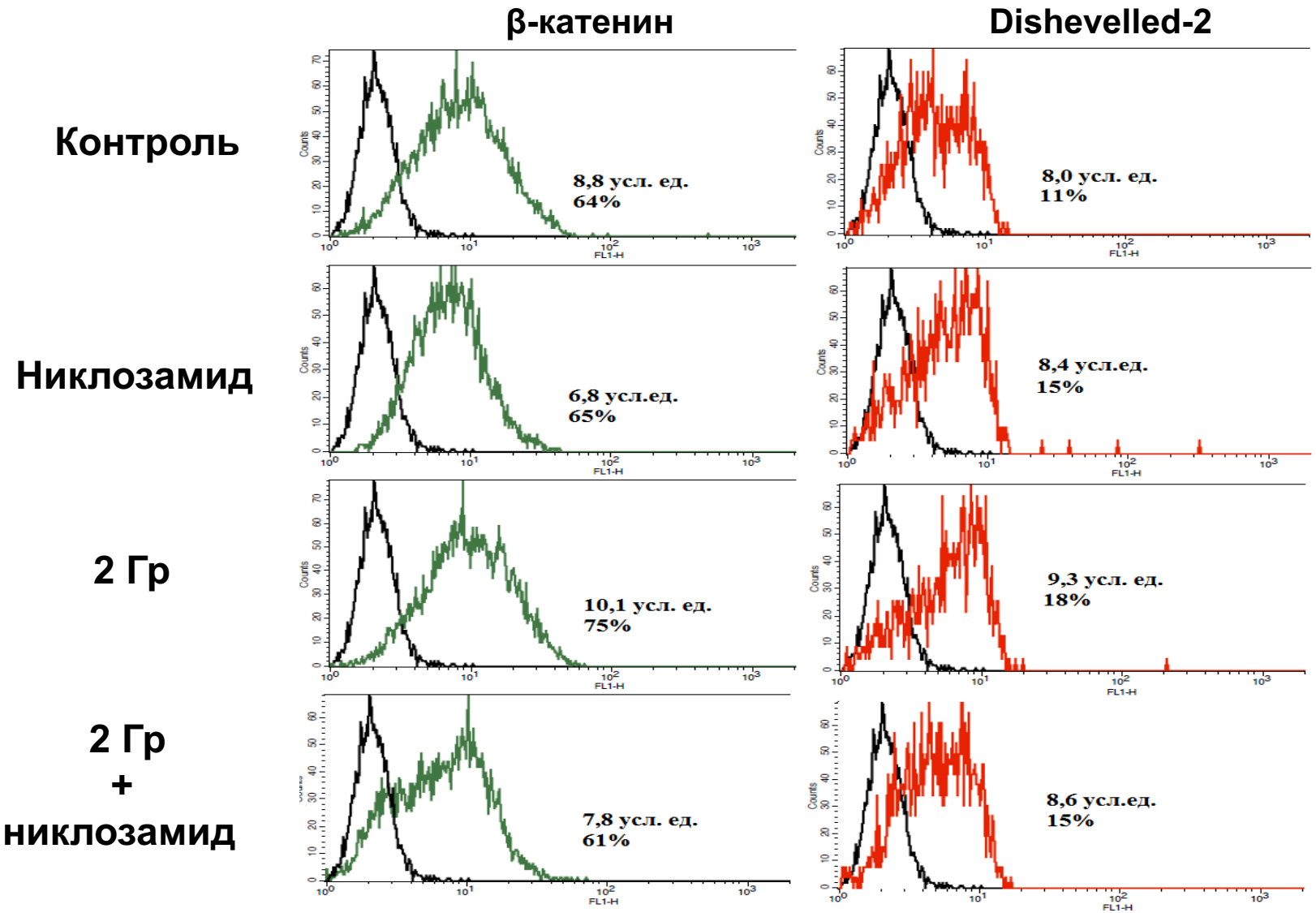
1. Белки Wnt взаимодействуют с рецептором Frizzled, и ко-рецептором LRP 5/6.

2. Белок Dishevelled (Dvl) перемещается к мембране, взаимодействует с рецептором Frizzled и образует полимерный комплекс.

3. Разрушается комплекс белков, обеспечивающих деградацию β-катенина.

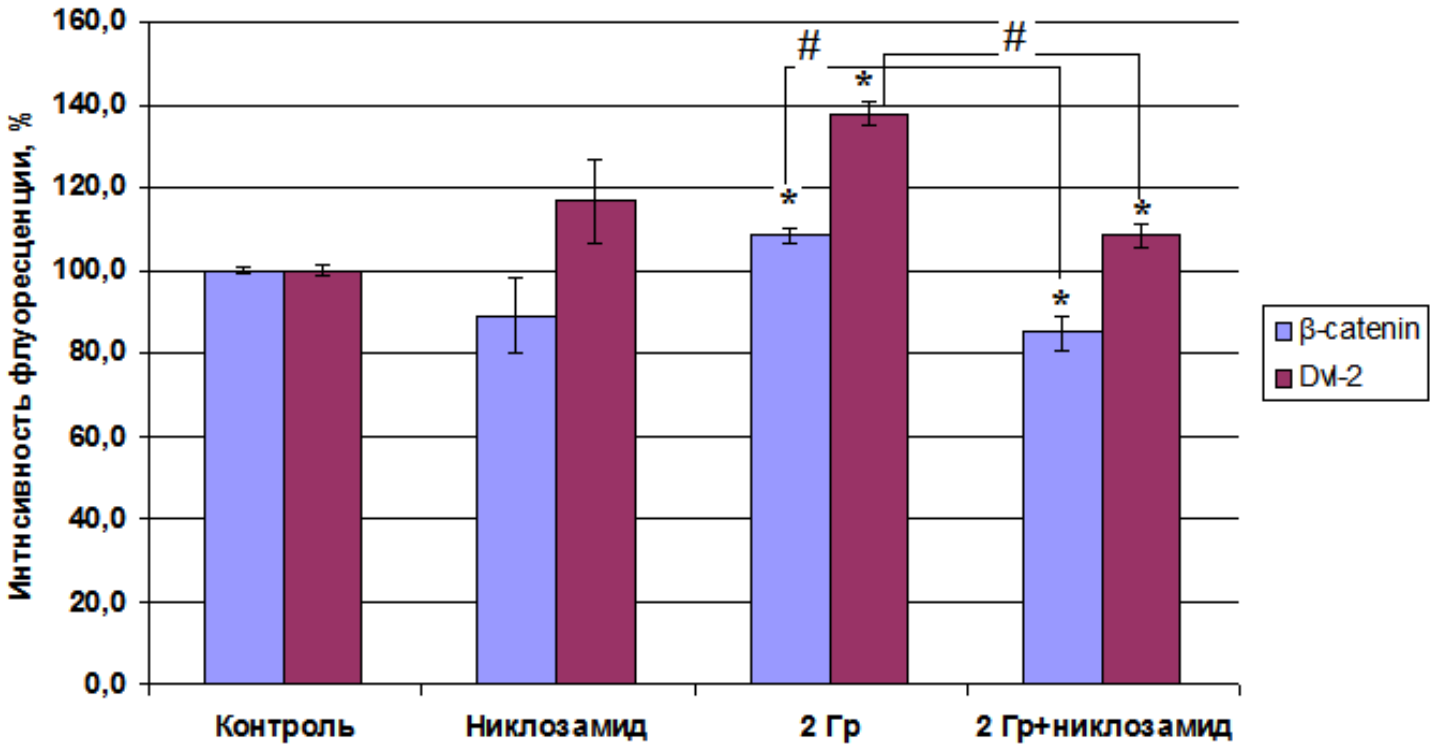
4. β-катенин накапливается в цитоплазме и транслоцируется в ядро, где связывается с факторами транскрипции семейства TCF/LEF и активирует экспрессию других мишеней сигнального пути Wnt, включая циклины, C-myc и костные морфогенетические белки.

Влияние никлозамида и облучения на активность сигнального пути Wnt в маммосферах MCF-7 через 24 часа после облучения



Черный пик – аутофлуоресценция;
Зеленый пик – флуоресценция клеток, окрашенных антителами к β-катенину
Красный пик – флуоресценция клеток, окрашенных антителами к белку Dishevelled-2

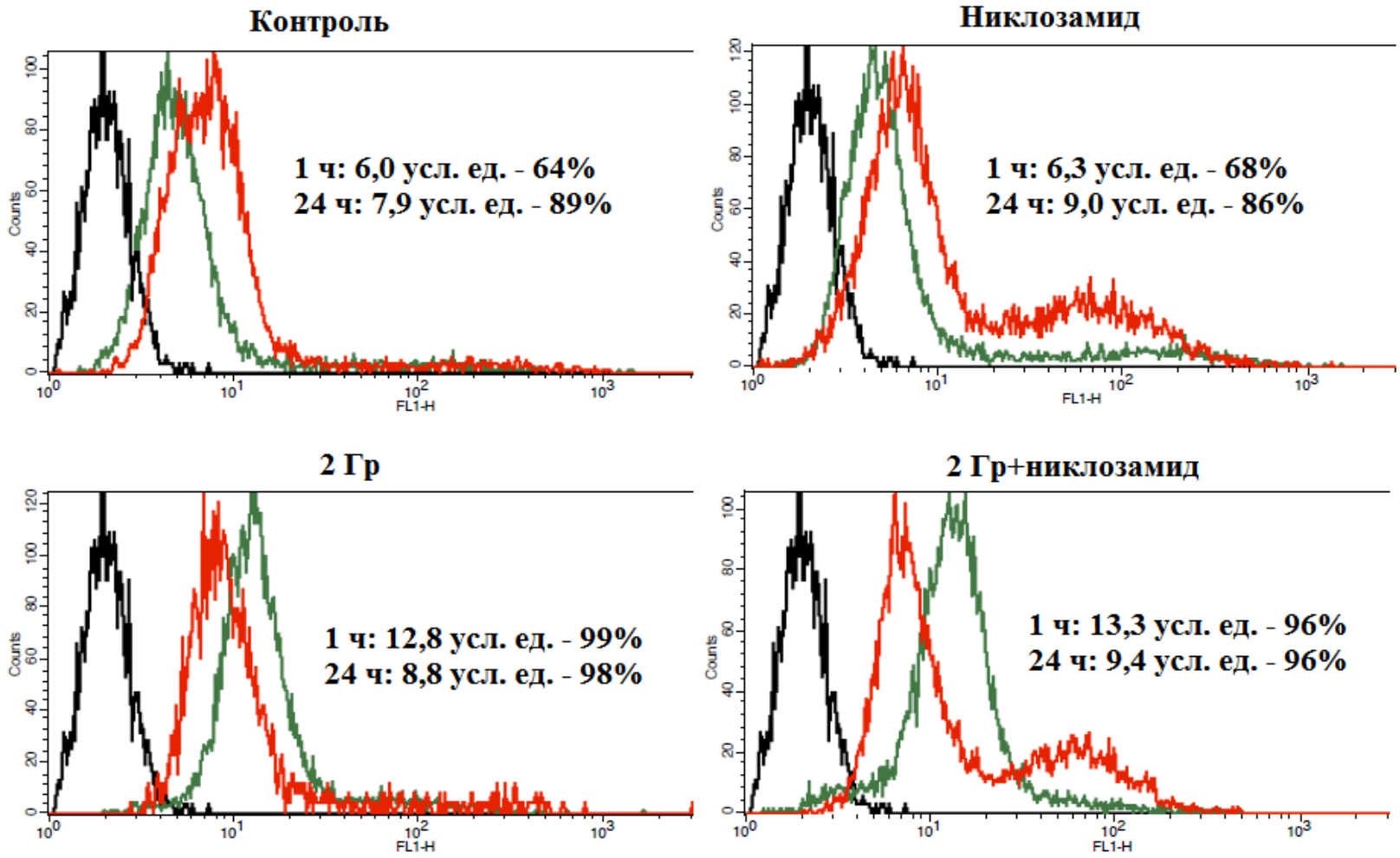
Влияние никлозамида и облучения на активность сигнального пути Wnt в маммосферах MCF-7 через 24 часа после облучения



* Отличия от контроля значимы, $p < 0,05$

\# Отличия между группами значимы, $p < 0,05$.

Влияние никлозамида и облучения на образование двунитевых разрывов ДНК в маммосферах MCF-7 через 1 час и 24 часа после облучения

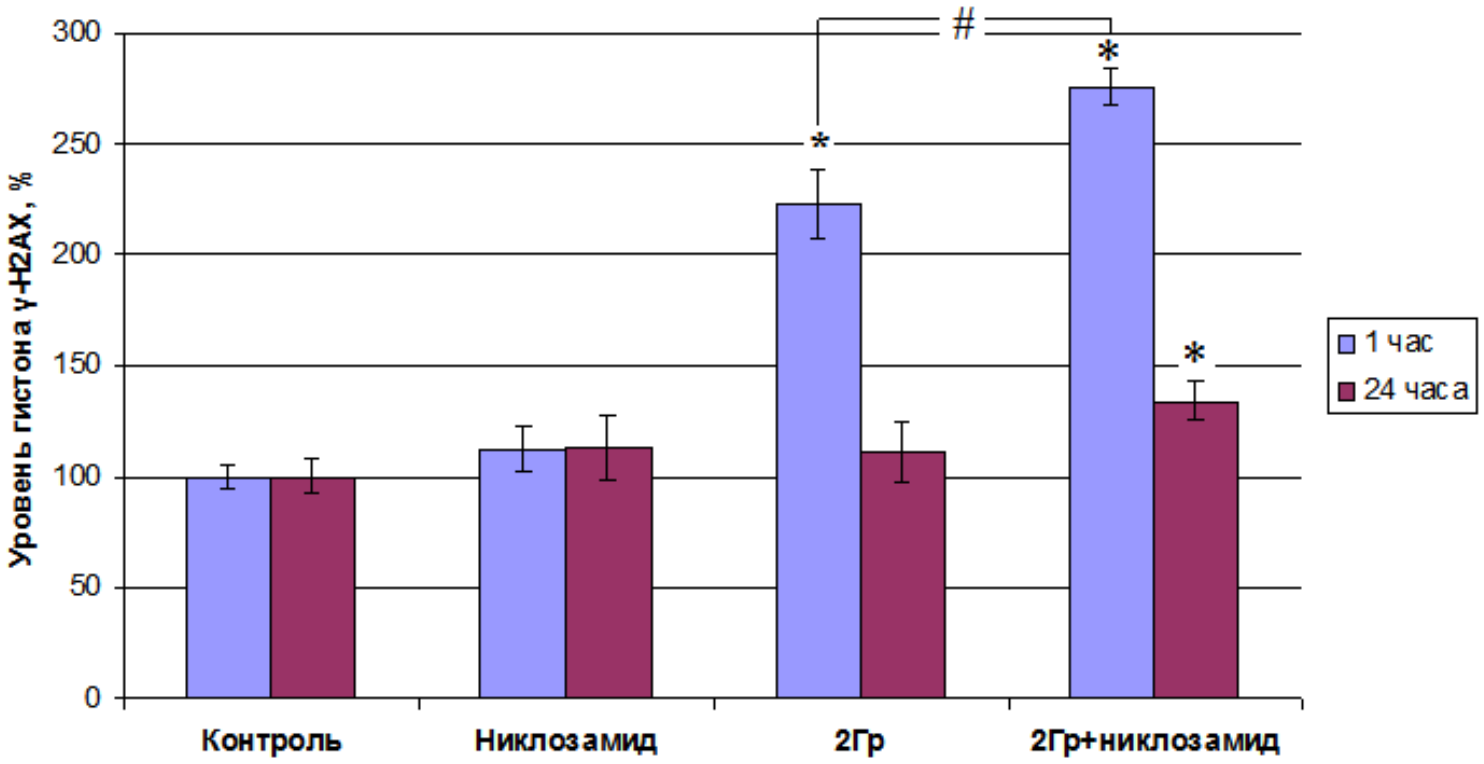


Черный пик – аутофлуоресценция;

Зеленый пик – флуоресценция клеток, окрашенных антителами к гистону γH2AX через 1 час после облучения;

Красный пик – флуоресценция клеток, окрашенных антителами к гистону γH2AX через 24 часа после облучения

Влияние никлозамида и облучения на образование двунитевых разрывов ДНК в маммосферах MCF-7 через 1 час и 24 часа после облучения



* Отличия от контроля значимы, $p < 0,05$

\# Отличия между группами значимы, $p < 0,05$.

Выводы:

1. Показано, что никлозамид повышает чувствительность клеток линии MCF-7, культивируемых в виде маммосфер, к действию γ-излучения.

2. Показано, что γ-излучение повышает активность пути Wnt в клетках линии MCF-7, культивируемых в виде маммосфер, тогда как никлозамид при совместном действии с γ-излучением подавляет этот сигнальный путь.

3. Через 1 час после совместного действия никлозамида и γ-излучения обнаружено более высокое количество ДР ДНК в клетках маммосфер линии MCF-7, оцениваемое по уровню гистона γH2AX, чем при действии этих факторов по отдельности.

4. Обнаружено, что никлозамид приводит к снижению скорости восстановления ДР ДНК в клетках маммосфер линии MCF-7, через 24 часа после облучения.