

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ИОНОФОРНОГО АНТИБИОТИКА САЛИНОМИЦИНА: МИШЕНЬ – ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Е.Ю. Москалева, доктор биологических наук, профессор,
С.Е. Северин, доктор химических наук, член-корреспондент РАМН

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

E-mail: moskalevaey@mail.ru

В обзоре рассмотрены последние сведения об опухолевых стволовых клетках (ОСК), механизмах их лекарственной устойчивости и о разработке новых подходов, направленных на элиминацию ОСК. Результаты исследований, выполненных в последние годы, позволяют полагать, что полиэфирный ионофорный антибиотик салиномицин обладает избирательной токсичностью в отношении ОСК. Этот препарат способен снизить долю ОСК в 100 раз эффективнее, чем паклитаксель – препарат, обычно используемый для лечения рака молочной железы. В исследованиях последних лет показано, что салиномицин может проявлять активность ингибитора белка Pgp и благодаря этому преодолевать множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток человека. Салиномицин индуцирует апоптоз в опухолевых клетках при раке предстательной железы, вызывая повышение концентрации активных метаболитов кислорода, повреждение ДНК и деполаризацию мембраны митохондрий. Этот препарат блокирует резистентность опухолевых клеток и повышает их чувствительность к доксорубину, этопозиду и излучению, вызывает апоптоз, индуцированный накоплением поврежденных ДНК и снижением уровня белка p21. Кроме того, салиномицин ингибирует сигнальный путь Wnt и избирательно вызывает апоптоз опухолевых клеток. Поэтому в настоящее время салиномицин рассматривается как перспективный препарат для лечения рака.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, салиномицин, противоопухолевые препараты

ANTITUMOR ACTIVITY OF IONOPHORE ANTIBIOTIC SALINOMYCIN: THE TARGET – CANCER STEM CELLS

E. Yu. Moskaleva, S.E. Severin

National Research Centre «Kurchatov Institute» NBICS-Centre

In this review the recent data regarding cancer stem cells (CSCs), the mechanisms of their drug resistance and the development of novel anti-CSC therapies are summarized. Recent studies suggest that salinomycin has selective toxicity for CSCs. Salinomycin is a polyether antibiotic with properties of an ionophore. This compound reduces the proportion of CSCs by >100-fold relative to paclitaxel, a commonly used breast cancer chemotherapeutic drug. All very recently performed studies have shown that salinomycin can function as a P-gp inhibitor to overcome drug resistance in human cancer cells. Salinomycin induced apoptosis of human prostate cancer cells owing to accumulation of reactive oxygen species, DNA damage and mitochondrial membrane depolarization. This drug also inhibits chemoresistant cancer cells and sensitizes DOX- or ETO-treated or irradiated cancer cells by increasing apoptosis causing DNA damage and reducing p21 protein level. Salinomycin inhibits Wnt signalling and selectively induces apoptosis in tumor cells. Therefore, at present salinomycin is considered to be a potential anticancer drug for cancer therapy.

Key words: cancer stem cells, salinomycin, antitumor drugs

Исследования последнего десятилетия способствовали появлению новых представлений о биологии опухолей. Стало понятно, что опухоли содержат специфическую популяцию клеток, названных опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) [1, 5, 9, 51]. При этом оказалось, что при трансплантации опухолевых клеток животным инициировать рост новых опухолей, соответствующих по клеточному составу исходной, могут только ОСК. Эти клетки, как и нормальные стволовые клетки (СК), особенно устойчивы к химическим и физическим воздействиям. Поэтому множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) может определяться не только и не столько особенностями основной популяции клеток опухолевой массы, а сохранением при разных типах лече-

ния минорной фракции высокорезистентных ОСК, которые присутствуют в опухоли и обеспечивают рецидив болезни.

Следует отметить, что многие авторы с осторожностью относятся к термину «ОСК» и предпочитают оперировать таким понятием, как туморогенные клетки или клетки, инициирующие опухоль (tumorigenic cells). Несмотря на это, в настоящее время понятие ОСК становится общепринятым. Обсуждая эту проблему, P. Dalerda и соавт. [9] справедливо подчеркивают, что термин «ОСК» является рабочим понятием и используется именно для определения клеток, способных инициировать опухоль, аналогичную по клеточному составу той опухолевой ткани, из которой они были получены.

В настоящее время проводятся исследования, направленные на поиск новых способов воздействия и новых лекарственных препаратов, которые могли бы наиболее избирательно действовать не просто на опухолевые клетки, составляющие основную массу опухоли, но и на ОСК, или повышать чувствительность последних к действию противоопухолевых препаратов. Поиск таких средств идет как путем скрининга различных препаратов для выявления соединений, обладающих высокой избирательной цитотоксической активностью в отношении ОСК, так и в направлении поиска препаратов, стимулирующих дифференцировку ОСК, или препаратов, ингибирующих сигнальные пути, регулирующие пролиферацию ОСК.

В 2009 г. Р. Gupta и соавт. показали, что ОСК высокочувствительны к действию ионофорного антибиотика салиномицина [20]. Полученные ими данные стимулировали исследования, направленные на изучение салиномицина как потенциального противоопухолевого препарата [22].

Цель настоящего обзора – анализ экспериментальных данных, касающихся противоопухолевой активности салиномицина, его способности преодолевать МЛУ опухолевых клеток и вызывать гибель ОСК.

ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ОСОБЕННОСТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

ОСК возникают, скорее всего, в результате накопления мутаций в соматических СК или приобретения свойств СК мутировавшими клетками других типов.

Как отмечалось выше, в соответствии с моделью развития опухоли, исходящей из существования ОСК, рост опухоли *in vivo* способна инициировать и поддерживать только специфическая субпопуляция опухолевых клеток, а именно популяция, представленная долгоживущими и медленно пролиферирующими ОСК, в то время как другие субпопуляции более дифференцированных клеток этой способностью не обладают. Полагают, что способность опухоли образовывать метастазы также определяется ОСК, приобретающими ряд новых свойств и превращающихся в метастатические ОСК [30].

ОСК сохраняют многие свойства нормальных СК, в том числе те, которые делают СК устойчивыми ко внешним воздействиям. Это

экспрессия генов нескольких типов АТФ-зависимых транспортеров, высокая способность к репарации ДНК, низкий уровень активных метаболитов кислорода, высокий уровень антиоксидантов (глутатиона) и устойчивость к апоптозу [3, 10, 24, 42, 49, 57]. Гиперэкспрессия генов, кодирующих трансмембранные белки семейства АВС-транспортеров (АТФ-binding cassette transporters, АТФ-зависимые транспортеры), специализирующихся на выбросе молекул различных типов при их транспорте через цитоплазматическую мембрану или из примембранной области цитоплазмы с использованием энергии АТФ, является одним из основных механизмов развития МЛУ [8, 10].

В таблице приведены сведения об АВС-транспортерах, определяющих устойчивость клеток к различным препаратам. Используя энергию гидролиза АТФ, эти транспортеры выводят из клеток липофильные, в том числе многие токсичные вещества и некоторые флюоресцирующие красители.

ОСК разного происхождения, как и нормальные СК, при инкубации с флюоресцентными красителями Хехст 33342 и родамин-123 благодаря высокой активности соответствующих АВС-транспортеров обладают способностью удалять их из клеток, поэтому данные клетки не накапливают такие красители. При исследовании с помощью проточной цитофлюориметрии эти клетки выявляются как очень небольшая популяция слабо окрашивающихся клеток,

АВС-ТРАНСПОРТЕРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК К РАЗЛИЧНЫМ ПРЕПАРАТАМ (ПО [15, 25, 55])

Ген	Белок	Удаляемые АВС-транспортерами вещества
ABCA2	ABCA2	Эстрамустин
ABCB1	PGP/MDR1	Колхицин, доксорубин, этопозид, винбластин, паклитаксель, дигоксин
ABCB5	ABCB5	Доксорубин, паклитаксель, доцетаксель, родамин-123
ABCC1	MRP1	Доксорубин, даунорубин, винкристин, этопозид, колхицин, камптотecin, метотрексат, родамин
ABCC2	MRP2	Винбластин, цисплатин, доксорубин, метотрексат, сульфипиразон
ABCC3	MRP3	Метотрексат, этопозид
ABCC4	MRP4	6-Меркаптопурин, 6-тиогуанин и его метаболиты, метотрексат, цАМФ, цГМФ
ABCC5	MRP5	6-Меркаптопурин, 6-тиогуанин и его метаболиты, цАМФ, цГМФ
ABCC6	MRP6	Этопозид
ABCC11	MRP11	5-Фторурацил, цАМФ, цГМФ
ABCG2	MXP/BCRP*	Митоксантрон, топотекан, доксорубин, даунорубин, иринотекан, иматинит, метотрексат

Примечание. * – BCRP – белок устойчивости рака молочной железы; MDR – множественная лекарственная устойчивость; MRP – белок, связанный с MDR, MXP – белок устойчивости к митоксантрону.

расположенных чуть ниже и левее основной популяции, и получивших поэтому название побочной (или боковой) популяции – side population (SP) [17, 21]. Способность образовывать SP считают суррогатным маркером СК.

В опухолевых клетках обнаружены гены ABCG2, ABCB1, ABCB5 и ABCC1, кодирующие белки, которые осуществляют транспорт не только гидрофобных, но и некоторых гидрофильных соединений из клеток в среду [8, 18, 25].

Таким образом, резистентность опухолей ко многим типам противоопухолевых препаратов определяется тем, что именно ОСК характеризуются высокой устойчивостью к разным типам воздействий благодаря активной экспрессии генов белков-транспортеров, обеспечивающих выброс цитотоксических лекарств из клетки, высокой способности к репарации и устойчивости к развитию апоптоза.

СТРОЕНИЕ, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ И ТОКСИЧНОСТЬ САЛИНОМИЦИНА

Салиномицин относится к группе полиэфирных антибиотиков, молекулы которых содержат тетрагидропирановые и(или) тетрагидрофурановые циклы. В неполярных средах и в кристаллической форме антибиотики полиэфирной структуры предпочтительно существуют в псевдоциклической форме за счет замыкания устойчивой водородной связи между карбоксильной группой, расположенной на одном конце молекулы, и находящейся на противоположном конце гидроксильной или NH-группой кетопиррольного фрагмента. Антибиотики данной группы образуют хелатные комплексы с катионами металлов. Все гидрофильные группы, необходимые для образования комплекса с катионом, обращены внутрь, а снаружи остаются только углеводородные фрагменты. Благодаря такому строению комплексов указанные антибиотики способны проникать через биологические и искусственные мембраны и переносить через них 1- и 2-валентные катионы. Поэтому такие антибиотики получили название ионофорных [44].

Ионофорный антибиотик салиномицин (рис. 1) является карбоксильным полиэфирным ионофором, который продуцируется стрептомицетами *Streptomyces albus*. Салиномицин и его соли существуют в виде псевдоциклической структуры благодаря образова-

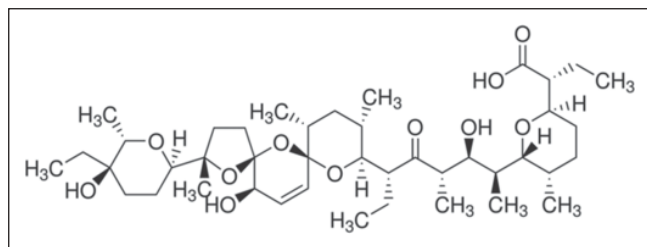


Рис. 1. Структурная формула салиномицина (по [39])

нию водородных связей между карбоксильной группой на одном конце молекулы и 2 гидроксильными группами – на другом [41]. В такой форме салиномицин способен образовывать комплексы с катионами металлов [12]. Липофильные свойства молекулы салиномицина обеспечивают перенос комплексов с ионами металлов через клеточные мембраны [36, 40].

Натриевая соль салиномицина получена из продуктов ферментации *S. albus*. Салиномицин был выделен, очищен и подробно охарактеризован Y. Miyazaki и соавт. [39]. Он хорошо растворим во всех органических растворителях; в воде его растворимость составляет 3,4 мг/см³.

Аффинность салиномицина убывает в ряду K^+ , Na^+ , Cs^+ , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Более эффективно осуществляется транспорт одновалентных катионов, включая H^+ , из водных растворов в органический растворитель [38]. При этом салиномицин, так же как монензин и нигерицин, относится к электронейтральным ионофорам; в анионной форме он связывает катион, который затем обменивается на H^+ или другой катион, при этом суммарный заряд молекулы не меняется. На перенос ионов с участием салиномицина может влиять трансмембранный градиент концентрации протонов и катионов. Салиномицин благодаря липофильным свойствам легко проникает через плазматическую мембрану в клетку и через внутриклеточные мембраны – в различные органеллы клетки, что нарушает внутриклеточный баланс катионов и в конечном итоге может привести к гибели клетки.

До последнего времени салиномицин использовался только для профилактики и лечения кокцидиоза (инфекционное заболевание, вызываемое кокцидиями, паразитирующими в желудочно-кишечном тракте – ЖКТ) у кур, и как стимулятор роста молодняка в птицеводстве и свиноводстве. Благодаря исследованиям по использованию салиномицина в ветеринарии подробно изучена его токсичность у животных разных видов. По данным, приведенным Комитетом по питанию животных, при изучении острой токсичности этого препарата на мышах, цыплятах, кроликах, собаках, свиньях, быках и лошадях при пероральном введении значение ЛД₅₀ составляло от 21 до 60 мг/кг массы тела. При этом у мышей, цыплят и кроликов в основном отмечалась нейротоксичность. Свиньи, быки и лошади были более чувствительны к этому антибиотику, а токсичность была обусловлена преимущественно поражением печени и миокарда. При действии на кожу в экспериментах на крысах салиномицин вызывал умеренное воспаление, он не обладал антигенной активностью и не вызывал реакций гиперчувствительности. При исследовании субхронической токсичности салиномицина было обнаружено, что наиболее чувствительными органами у мышей и крыс являются печень и селезенка (нетоксичная доза

соответственно 3,75 и 2,5 мг/кг), у собак – нервная система (нетоксичная доза 1,0 мг/кг) у свиней – печень (нетоксичная доза 2,5 мг/кг) [45].

Использование салиномицина в ветеринарии стало возможным благодаря тому, что животным его вводят перорально, и препарат оказывает действие на паразитов непосредственно в просвете ЖКТ. Но и при пероральном введении в случае передозировки препарата развиваются нейротоксические реакции, страдают почки, возникает мышечная слабость, наблюдается миоглобинурия [43]. Высокой чувствительностью к салиномицину обладают верблюды [2]. Сообщалось о случайном отравлении людей салиномицином [52].

Нейротоксичность салиномицина, по-видимому, в первую очередь обусловлена тем, что под действием этого препарата нарушается ионный баланс клетки. Показано, что в нейронах корешков спинного ганглия крыс в культуре и в клетках Шванна при действии салиномицина в концентрации 1–10 мкМ в цитоплазме клеток увеличивается содержание ионов Na, что приводит к повышению уровня ионов Ca²⁺ из-за активации Na/Ca-транслоказы плазматической и митохондриальной мембран клеток, действующих из-за повышения концентрации ионов Na в «обратном» направлении. Это в свою очередь вызывает активацию кальпаина. Последний, являясь специфической нейтральной протеазой, определяет индукцию апоптоза клеток по каспазозависимому пути. Процесс сопровождается активацией каспаз-12, 9 и 3. Ингибирование активности кальпаина и Na/Ca-транслоказы в митохондриях позволяет снизить токсическое действие салиномицина на нервные клетки [6]. Кроме того, на изолированных митохондриях показано, что салиномицин может ингибировать дыхание митохондрий и нарушать трансмембранный потенциал ($\Delta\psi$), что в свою очередь может вызвать выход цитохрома C из межмембранного пространства митохондрий, активацию с его участием каспазы-9 и развитие апоптоза.

В клинической практике ионофорные антибиотики, несмотря на широкий спектр биологической активности (а они обладают антибактериальной, противогрибковой, антипаразитарной, противомаларийной активностью и способны убивать опухолевые клетки), до сих пор не нашли применения из-за их токсичности при парентеральном введении.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ САЛИНОМИЦИНА

Для проведения скрининговых исследований цитотоксической активности различных препаратов в отношении ОСК Р. Gupta и соавт. [20] была использована специальная модельная клеточная система. Это был необходимый шаг для решения поставленной задачи, так как доля ОСК в общей массе опухолевых клеток различных линий и в первичных опухолях со-

ставляет, как правило, доли процента, что не позволяет проводить скрининговые исследования.

При создании своей модели ОСК авторы исходили из данных S. Mani и соавт. [35], которые показали, что при индукции эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial–mesenchymal transition – EMT) и для нормальных, и для опухолевых клеток происходит обогащение клеточной популяции клетками, обладающими свойствами стволовых. Поэтому для повышения доли ОСК в популяции культивируемых *in vitro* опухолевых клеток рака молочной железы авторы индуцировали EMT-клеток. Они использовали линию нормальных эпителиальных клеток молочной железы человека (human mammary epithelial cells – HMEC) и линию злокачественных трансформированных «опухолевых» клеток. Для их получения клетки линии HMEC трансфицировали в соответствии с описанным ранее подходом [13] 3 генами: геном большого Т-антигена вируса SV40 (LT), геном каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* и геном онкопротеина H-Ras, что приводило к злокачественной трансформации клеток. Туморогенность полученной линии клеток зависела от уровня экспрессии гена *ras*. Линия клеток, полученная из клеток линии HMEC в результате трансформации указанными генами, получила название линии HMLER. Злокачественная трансформация клеток HMLER определялась следующими событиями: инактивацией белков p53 и pRB под действием гена *LT*; сохранением теломер достаточной длины, благодаря активности гена *hTERT*, и постоянному митогенному сигналу, благодаря действию онкогена H-ras – продукта гена *ras*. В качестве immortalizированных, но не опухолевых клеток авторы использовали клетки молочной железы линии HMLE, которые также были получены из клеток линии HMEC, но отличались от клеток HMLER тем, что не были трансфицированы онкопротеином H-Ras.

EMT в клетках HMLER и HMLE индуцировали с помощью ингибирования экспрессии гена *CDH1*, кодирующего E-кадгерин. Для подавления экспрессии этого гена использовали короткие шпилечные РНК (short hairpin RNA – shРНК) к гену E-кадгерина (*Ecad*). Оказалось, что в результате EMT доля клеток с фенотипом CD44^{high}/CD24^{low}, характерным для ОСК молочной железы, была в 10 раз выше в клетках HMLER^{shEcad}, чем в контрольных клетках HMLER^{shContr} (90 против 8%). Аналогичное увеличение CD44⁺/CD24⁻ клеток наблюдали, когда EMT индуцировали путем трансфекции гена *Twist* – транскрипционного фактора, программирующего EMT [13, 54].

Известно, что культивирование клеток в виде сфероидов, что достигается путем создания специальных условий культивирования, приводит к обогащению культуры СК. У клеток HMLER^{shEcad} в результате EMT способность образовывать сфероиды (маммосферы) при культивировании в суспензионной культуре в обычных условиях культивирования эти клетки ра-

стут в виде прикрепляющейся к пластиковой подложке культуры) возросла в 100 раз. Эти клетки при их трансплантации животным индуцировали опухоли в 100 раз эффективнее, чем клетки HMLER^{shContr}. Опухоли у мышей возникали уже при введении 1000 клеток HMLER^{shEcad}, что в 100 раз меньше, чем доза клеток HMLER^{shContr}, которую необходимо было ввести мышам для индукции развития опухоли. Перечисленные свойства позволили рассматривать клетки HMLER^{shEcad} как клетки, обогащенные ОСК. Для скрининга соединений, действующих избирательно на ОСК, использовали полученные линии клеток HMLER^{shEcad} и HMLER^{shContr}.

При подробном изучении действия салиномицина с использованием рассмотренных клеточных линий авторами было показано, что:

1) чувствительность клеток рака молочной железы различных линий к салиномицину коррелирует с относительным содержанием клеток с фенотипом ОСК CD44⁺/CD24⁻ в этих линиях;

2) салиномицин снижает долю CD44⁺/CD24⁻ клеток в 20 раз (паклитаксель увеличивал ее в 18 раз), при этом относительный размер фракции клеток CD44⁺/CD24⁻ был в 360 раз меньше, чем при действии паклитакселя;

3) салиномицин снижал образование сфероидов (туморосфер или маммосфер) в 10 раз (паклитаксель не влиял на их количество);

4) при действии салиномицина на иммортализованные нетуморогенные клетки линии HMLE фракция клеток с фенотипом CD44⁺/CD24⁻ снижалась только в 4 раза;

5) иммортализованные нетуморогенные клетки линии HMLE^{shEcad} с инактивированным геном кадгерина и клетки HMLE^{Twist} были более чувствительны к действию салиномицина, этопозида, абамеатина и нигерицина, чем контрольные клетки HMLE^{shContr} и HMLE^{Twist}, в то время как злокачественные клетки HMLER^{shEcad}, обогащенные ОСК, были более чувствительны, чем соответствующие контрольные клетки HMLER^{shContr}, только к салиномицину.

При обработке опухолевых клеток различных линий клеток рака молочной железы (MCF7^{Ras}, 4T1) салиномицином *in vitro* было обнаружено существенное снижение их туморогенной активности.

Анализ экспрессии набора генов, специфичных для ОСК, показал, что обработка опухолевых клеток салиномицином приводит к подавлению их экспрессии.

При лечении мышей в модельных экспериментах с привитой опухолью из клеток карциномы молочной железы человека линии Sum 159 салиномицин (введение внутрибрюшинное, доза 5 мг/кг) вызывал такое же ингибирование роста опухоли, как паклитаксель [20]. Представленные результаты убедительно свидетельствуют о перспективности создания противоопухолевых препаратов на основе салиномицина.

В недавно опубликованном сообщении Y. Zhang и соавт. [56] приводят данные о более высокой эффективности мицеллярной формы салиномицина и об очень высокой активности комбинированного действия салиномицина и паклитакселя, особенно при использовании обоих препаратов в мицеллярной форме. Использовать полимерные носители лекарств целесообразно для плохо растворимых в водной среде соединений, какими являются и салиномицин, и паклитаксель. Полимерная форма препаратов обеспечивает депонирование и увеличение поступления препаратов в опухоль.

Для получения мицелл, нагруженных паклитакселем, и мицелл, нагруженных салиномицином, в цитируемом исследовании был использован биodeградируемый блок-сополимер поли(этиленгликоль)-поли(β-капролактон). Размер мицелл составлял 25–30 нм, эффективность включения – более 90%. Мицеллярный салиномицин не только более эффективно, чем свободный, подавлял рост опухолей, но и более эффективно снижал долю ОСК в опухолях, полученных у иммунодефицитных мышей при прививке клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF7. Важно отметить, что при этом через 13 и 18 сут после действия салиномицина и в свободной, и в мицеллярной форме доля ОСК с фенотипом CD44⁺/CD24⁻ в опухолях экспериментальных животных была существенно ниже, чем в контроле.

МЕХАНИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ САЛИНОМИЦИНА

Механизмы противоопухолевой активности салиномицина и его действия на опухолевые клетки до конца не изучены.

Показано, что салиномицин вызывает апоптоз в разных типах опухолевых клеток человека. В том числе даже в тех, которые обладают высокой устойчивостью к действию противоопухолевых препаратов благодаря высокому уровню антиапоптотического белка Bcl-2 (клетки Т-клеточного лейкоза линии Jurkat), белка MDR1 (клетки саркомы матки линии MES-SA/Dx) или благодаря высокой протеолитической активности протеасом (клетки линии Namalva), появившейся в результате адаптации к ингибитору протеасом бортезомибу [16]. Представленные данные свидетельствуют о том, что салиномицин позволяет преодолевать множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток, обусловленную разными механизмами. В этом же исследовании обнаружена избирательность действия салиномицина в отношении опухолевых клеток. В частности, было показано, что Т-лимфоциты с фенотипом CD4⁺, полученные у больных лейкозом (опухолевые клетки), были значительно более чувствительны к действию этого препарата, чем CD4⁺ Т-лимфоциты здоровых людей [16]. Авторы не наблюдали при действии салиномицина ни блока клеточного цикла, ни актива-

ции каспаз (через 24 ч инкубации), а развитие апоптоза не зависело от присутствия белка p53. Нужно отметить, что более высокая чувствительность опухолевых клеток по сравнению с нормальными была обнаружена также и при сравнении действия салиномицина (концентрации 0,15 – 0,45 мкМ) на опухолевые, в том числе гормонально-резистентные (линия PC3), и нормальные клетки предстательной железы. В качестве нормальных эпителиальных клеток предстательной железы авторы использовали линию RWPE-1 [27].

Механизм индукции апоптоза при действии салиномицина подробно изучен в этой же работе на клетках рака предстательной железы. Авторы убедительно показали, что уже через 24 ч после действия салиномицина наблюдаются такие морфологические признаки апоптоза, как сморщивание клеток и ядер и конденсация хроматина. В этот же период появляются открепившиеся клетки. С помощью проточной цитофлюориметрии при окрашивании клеток ФИТЦ-меченным аннексином V авторы подтвердили развитие апоптоза в обработанных салиномицином клетках и показали, что при более высоких концентрациях салиномицина (4 мкМ) возможно развитие некроза. Через 48 ч после действия препарата отмечены повышение уровня проапоптотического белка Вах и дозозависимое снижение содержания антиапоптотического белка Bcl-2, фрагментация белка PARP-1 и снижение уровня проказпазы-3, что сопровождалось ростом активности каспазы-3.

В механизме повреждения клеток при действии салиномицина ведущую роль играло повышение концентрации активных метаболитов кислорода (АМК), которое регистрировалось уже через 15 мин инкубации с препаратом и ингибировалось антиоксидантом N-ацетилцистеином. В обработанных салиномицином клетках наблюдали снижение мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$), которое можно было предотвратить с помощью N-ацетилцистеина, что свидетельствует о важной роли АМК в снижении $\Delta\psi$ и последующей транслокации Вах в митохондрии и образовании пор в митохондриальных мембранах. Высвобождение цитохрома С и других проапоптотических факторов (например, апоптозиндуцирующего фактора) из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму может приводить к развитию апоптоза как по каспадозависимому, так и по каспазонезависимому пути.

Важным свойством салиномицина является его способность обеспечивать преодоление резистентности опухолевых клеток, обусловленной действием ABC-транспортеров [15]. В экспериментах на клетках промиелобластного лейкоза линии KG-1a с высоким содержанием белков MDR1/ABCB1, BCRP/ABCG2 и MRP8/ABCC11 авторы показали способность салиномицина (в отличие от топотекана, бортезомиба, этопозида, гемцитабина, 5-фторурацила,

цитозинарабинозида и доксорубицина) индуцировать высокий уровень апоптоза, несмотря на высокую активность ABC-транспортеров этих 3 типов. В этой же работе показано, что в процессе селекции не удается получить резистентные к салиномицину клетки. Обнаружено, что способностью ингибировать активность белка MDR1 обладает не только салиномицин, но и другие ионофорные антибиотики – нигерицин [48] и абамектин (его производное – ивермектин) [11], которые, кроме того, эффективно действуют на ОСК, но, в отличие от салиномицина, одинаково токсичны в отношении модельных «нормальных» СК и ОСК [20].

Показано [29], что салиномицин является субстратом белка MDR1/ABCB1, но не транспортеров BCRP/ABCG2 и MRP2/ABCC2, и что MDR1/ABCB1 обеспечивает транспорт салиномицина через клеточные мембраны. Важно отметить, что ABC-транспортеры ABCB1, ABCG2 и ABCC2 обнаружены в апикальных мембранах клеток, формирующих эпителиальные барьеры, и в мембранах гепатоцитов, обращенных в просвет канальцев. Полагают, что они обеспечивают выведение ряда токсичных метаболитов-субстратов этих транспортеров через печень, кишечник и почки, а также могут ограничивать всасывание некоторых веществ через слизистую оболочку тонкой кишки при их введении *per os*. Так, у мышей, дефицитных по гену белка ABCB1, обнаружено значительно более высокое содержание салиномицина в плазме крови при пероральном введении препарата. Эти же транспортеры присутствуют в клетках, формирующих гематоэнцефалический барьер, барьер в семенниках и фетоплацентарный барьер, что делает мозг, семенники и плод труднодоступными для действия многих фармакологических препаратов [7]. Поэтому салиномицин может изменять фармакокинетику некоторых вводимых *per os* лекарств.

Помимо прямой противоопухолевой активности, салиномицин обладает способностью сенсibilизировать клетки, устойчивые к действию доксорубицина и этопозида [26]. J.-H. Kim и соавт. [56] показали, что уже через 4 ч после обработки клеток рака молочной железы линии Hs578T доксорубицином и салиномицином возрастала степень повреждения ДНК опухолевых клеток, что регистрировалось с помощью метода комет, а также по увеличению содержания фосфорилированных по остаткам серина белков pH2AX и p53 (через 3 ч, 10 мкМ салиномицина) и снижению количества циклина D1, а также антиапоптотического белка p21 и белка pRb. Индуцированные салиномицином повреждения ДНК стимулировали развитие апоптоза опухолевых клеток. Содержание антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и IAP и проапоптотического белка Вах при этом не изменялось. При одновременном действии доксорубицина и салиномицина на клетки рака молочной железы и клетки саркомы матки через 48 ч обнаружена более

интенсивная гибель клеток, чем при действии только доксорубина. Эффект был более выраженным при высокой плотности клеток. В клетках некоторых линий сенсibiliзирующее действие салиномицина было очень слабым. Кроме того, как отмечалось выше, в экспериментах на животных обнаружено повышение противоопухолевой активности паклитакселя и способности элиминировать ОСК при совместном действии с салиномицином [56].

Салиномицин обладает, кроме того, способностью сенсibiliзировать опухолевые клетки (рак молочной железы, линии клеток MCF7 и Hs578T) к действию облучения [28]. Совместное воздействие облучения (4 Гр) и салиномицина (5 мкМ) сопровождалось развитием апоптоза, снижением выживаемости клеток и появлением блока в G2-фазе клеточного цикла уже через 24 ч после воздействия. При этом усиление повреждения ДНК наблюдали уже через 1 ч, а через 6 ч регистрировалось снижение уровня белка p21, оказывающего антиапоптотическое действие. Именно усиление повреждения ДНК при совместном действии салиномицина и облучения приводит к задержке клеточного цикла опухолевых клеток в G2-фазе.

Таким образом, салиномицин усиливает действие факторов, вызывающих повреждение ДНК (антрациклиновых антибиотиков и ионизирующего излучения), а кроме того, и действие таксанов (паклитакселя), что, безусловно, может иметь важное клиническое значение.

Выше мы отмечали, что при поиске препаратов, ингибирующих рост опухолей, привлекают внимание такие соединения, которые могли бы ингибировать сигнальные пути, регулирующие пролиферацию ОСК. Недавно выяснилось, что салиномицин обладает способностью ингибировать сигнальный путь Wnt [33].

Известно, что регуляция процессов пролиферации в ОСК находится под контролем тех же сигнальных путей, что и в нормальных СК. Эти пути получили свое название по названию морфогенетических белков, которые их активируют: это сигнальные системы Hedgehog (Hh), Notch и Wnt [4, 14, 19, 23, 31, 37, 53].

Белки-лиганды семейства Wnt взаимодействуют со своим рецептором, получившим название Frizzled, и корецептором LRP 5/6 [23, 46]. При взаимодействии Wnt с рецептором происходит образование сложного сигнального комплекса, что приводит к активации канонического сигнал-передающего пути β -катенин/TCF и нескольких иных путей, включая пути, опосредованные N-концевой киназой Jun или ионами кальция [23].

В отсутствие белков Wnt β -катенин связывается цитоплазматическими белками, которые его фосфорилируют и тем самым подготавливают к убиквитинированию и последующей деградации в протеасомах.

При связывании Wnt с рецептором происходит дестабилизация комплекса, разрушающего β -катенин

и, соответственно, стабилизация β -катенина. Он транслируется в ядро, где связывается с факторами транскрипции семейства TCF/LEF (Т-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор) и активирует экспрессию других, более отдаленных мишеней сигнального пути Wnt, включая циклины, С-мус, и некоторых других. Активация сигнального пути, индуцируемого Wnt, обнаружена при раке различной локализации.

При исследовании влияния салиномицина на клетки линии HEK293 было обнаружено, что этот препарат блокирует фосфорилирование белка-коррецептора LRP6 и вызывает его деградацию, что приводит к снижению уровня β -катенина. Такое же действие оказывал и другой ионофорный антибиотик — нигерцин. Показано, что в опухолевых клетках хронического лимфолейкоза с высоким конститутивным уровнем активности системы Wnt салино-

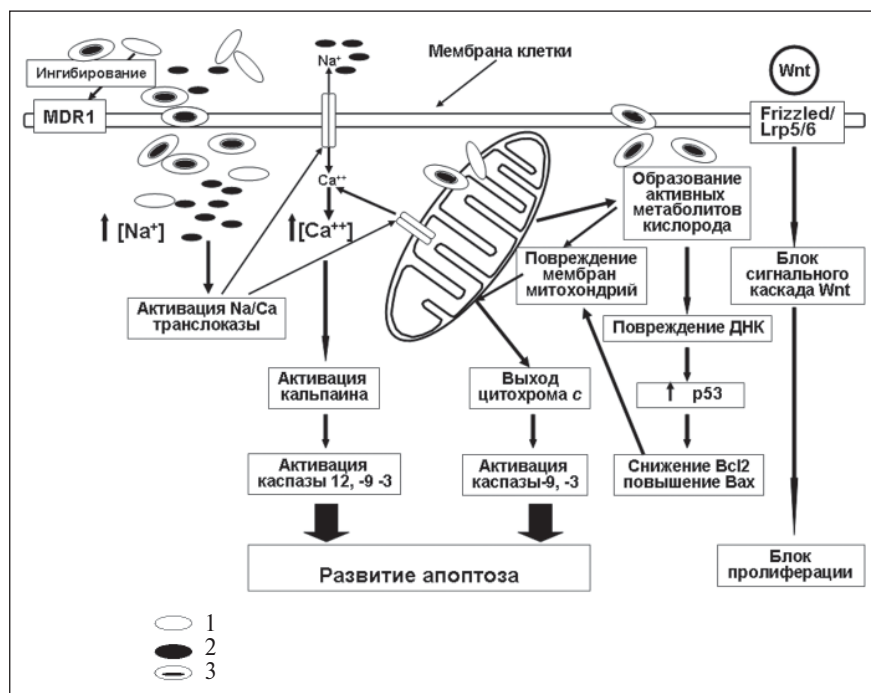


Рис. 2. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности салиномицина: 1 – салиномицин; 2 – ионы натрия; 3 – комплекс салиномицина с ионами натрия (соль)

мицин вызывал подавление экспрессии таких Wnt-зависимых генов, как LEF1, cyclin D1 и фибронектин, снижал уровень LRP6, а также выживаемость клеток. Нормальные лимфоциты при этом были устойчивы к действию салиномицина. Уровень апоптоза при действии салиномицина на эти клетки не превышал 20% при тех высоких концентрациях препарата (100 – 10000 нМ), которые вызывали апоптоз 100 % опухолевых лимфоцитов [33].

Ингибирование сигнального каскада Wnt/LRP6 при действии салиномицина может быть, по крайней мере частично, связано со способностью этого препарата вызывать повышение уровня внутриклеточного кальция [32]. Важно отметить, что способностью ингибировать сигнальный каскад Wnt/LRP6 обладают и другие ионофорные препараты, в том числе нигерицин [53], кальцимицин [50] и некоторые лекарственные препараты. Так обнаружено, что препарат никлозамид, который используется в медицине более 50 лет как противогельминтное средство, обладает, кроме того, высокой эффективностью в отношении колоректального рака и способностью ингибировать каскад Wnt/LRP6, что может определять его противоопухолевую активность [34].

На рис. 2 представлены схемы возможных механизмов развития цитотоксического действия салиномицина на опухолевые клетки. Как следует из представленной схемы, важной составляющей его действия является ионофорная активность, в результате которой в клетках-мишенях развиваются сложные изменения метаболических процессов, приводящие клетку к гибели. Так, в развитии повреждения клеток, как уже отмечалось при обсуждении механизма нейротоксического действия салиномицина, важную роль играет активация Na/Ca-транслоказы. Повышение активности этого фермента вызывается ростом в цитоплазме концентрации ионов натрия, возникающим в результате его переноса салиномицином через клеточную и митохондриальную мембрану. Функционирование фермента происходит в «обратном» направлении, что приводит к повышению концентрации ионов кальция и искажению

многих биохимических процессов в клетке, включая активацию капсаз и развитие апоптоза. Под действием салиномицина, кроме того, происходит нарушение структуры мембран митохондрий и их функционирования, что сопровождается повышенным образованием активных метаболитов кислорода. Действие последних приводит как к повреждению ДНК и индукции апоптоза с участием белка p53, так и к усилению повреждения митохондрий и развитию апоптоза, обусловленного выходом цитохрома С из межмембранного пространства и последующей активацией капсаз. Ингибирование активности MDR1 салиномицином будет сенсibiliзировать опухолевые клетки к действию многих противоопухолевых препаратов, ингибирование сигнальной системы Wnt будет обеспечивать ингибирование пролиферации ОСК.

Очевидно, что эффекты салиномицина во многом будут зависеть от особенностей биохимических систем конкретных клеток, что определит их чувствительность к действию этого препарата. Накопленные сведения позволяют констатировать более высокую чувствительность к салиномицину опухолевых клеток, чем нормальных, и ОСК по сравнению с нормальными СК. Для снижения неспецифической токсичности могут быть созданы специальные депонированные формы салиномицина на основе биodeградируемых носителей, которые обеспечат его эффективное локальное действие благодаря созданию высоких концентраций только в зоне мишени.

Анализ приведенных данных позволяет полагать, что салиномицин обладает противоопухолевой активностью, в основе которой лежит новый для противоопухолевых препаратов механизм действия – ионофорная активность этого антибиотика. С использованием салиномицина могут быть разработаны новые подходы для лечения опухолей, особенно характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью, а также более эффективные методы противоопухолевой терапии, основанные на элиминации ОСК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Москалева Е.Ю., Северин С.Е. Опухолевые стволовые клетки человека В кн. «Биология стволовых клеток и клеточные технологии». Т.1. / Под ред. М.А. Пальцева. – М.: Издательство «Медицина», «Шико», 2009. – С. 206–23.
2. Al-Nazawi M., Homeida A. Kinetics and tolerance of salinomycin in camels // Res. J. Pharmacol. – 2009; 3: 48–51.
3. Bao S., Wu Q., McLendon R. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // Nature. – 2006; 444: 756–60.
4. Behrens J., Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis // Int. J. Dev. Biol. – 2004; 48: 477–87.
5. Bjerkvig R., Tysnes B., Aboody K. et al. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights // Nat. Rev. Cancer. – 2005; 5: 899–904.
6. Boehmerlen W., Endres M. Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death // Cell Death Dis. – 2011; 2, e168; doi:10.1038/cddis.2011.46.
7. Borst P., Eiferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease // Ann. Rev. Biochem. – 2002; 1: 37–92.
8. Choi C. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal // Cancer. Cell. Int. – 2005; 4: 5–30.
9. Dalerba P., Cho R., Clarke M. Cancer stem cells: models and concepts // Annu. Rev. Med. – 2007; 58: 267–84.
10. Dean M., Fojo T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance // Nat. Rev. Cancer. – 2005; 5: 275–84.
11. Didier A., Loor F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor // Anticancer Drugs. – 1996; 7 (7): 745–51.
12. Dutton C., Banks B., Cooper C. Polyether ionophores // Nat Prod Rep. – 1995; 12: 165–81.
13. Elenbaas B., Spirio L., Koerner F. et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells // Genes. Dev. – 2001; 15: 50–65.
14. Fan X., Matsui W., Khaki L. et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors // Cancer Res. – 2006; 66 (15): 7445–52.

15. Fuchs D., Daniel V., Sadeghi M. et al. Salinomycin overcomes ABC transporter – mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells // *Biochem Biophys Commun.* – 2010; 394: 1098–104.
16. Fuchs D., Heinold A., Opelz G. et al. Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009; 390: 743–9.
17. Goodell M., Rosenzweig M., Kim H. et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species // *Nat. Med.* – 1997; 3: 1337–45.
18. Gottesman M., Fojo T., Bates S. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002; 2: 48–58.
19. Grego-Bessa J., Diez J., Timmerman L. et al. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw // *Cell Cycle.* – 2004; 3: 718–21.
20. Gupta P., Onder T., Jiang G. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening // *Cell.* – 2009; 138: 645–59.
21. Hirschmann-Jax C., Foster A., Wulf G. et al. A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004; 101: 14228–33.
22. Huczynski A. Salinomycin – A New Cancer Drug Candidate // *Chem. Biol. Drug. Des.* – 2012; 79: 235–8.
23. Incassati A., Chanramouli A., Eelkema R. et al. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β -catenin // *Breast. Cancer. Res.* – 2010; 12: 213–27.
24. Kang M., Hur B., Ko M. et al. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci.* 2008; 9: 15. Published online 2008 January 30. doi: 10.1186/1471-2202-9-15.
25. Kawanobe T, Kogure S., Nakamura S. et al. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012; 418 (4): 736–41.
26. Kim J.-H., Chae M., Kim W. et al. Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein // *Br. J. Pharmacol.* – 2011; 162: 773–84.
27. Kim K-Y., Sun-Nyoung Y., Sun-Yi Lee et al. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011; 413 (1): 80–6.
28. Kim W., Kim J., Yoon K. et al. Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest // *Invest. New. Drugs.* – 2012; 30: 1311–18.
29. Lagas J., Sparidans R., van Waterschoot R. et al. P-glycoprotein limits oral availability, brain penetration, and toxicity of an anionic drug, the antibiotic salinomycin // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008; 52: 1034–9.
30. Li F., Tiede B., Massagué J. et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Res.* – 2007; 17: 3–14.
31. Lindvall C., Bu W., Williams B. et al. Wnt signaling, stem cells, and the cellular origin of breast cancer // *Stem. Cell. Rev.* – 2007; 3: 157–68.
32. Lu D., Carson D. Spiperone enhances intracellular calcium level and inhibits the Wnt signaling pathway. *BMC Pharmacology.* – 2009; 9: 13 doi:10.1186/1471-2210-9-13.
33. Lu D., Choi M., Yu J. et al. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011; 108: 13253–7.
34. Lu W., Lin C., Roberts M. et al. Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor Lrp6 degradation and inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway // *PLoS ONE.* – 2011; 6 (12): e29290. doi:10.1371.
35. Mani S., Guo W., Liao M. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // *Cell.* – 2008; 133 (4): 704–15.
36. Matsumori N., Morooka A., Murata M. Conformation and location of membrane-bound salinomycin-sodium complex deduced from NMR in isotropic micelles // *Am. Chem. Soc.* – 2007; 129: 14989–95.
37. Miele L. Notch Signaling // *Clin. Cancer. Res.* – 2006; 12 (4): 1074–9.
38. Mitani M., Yamanishi T., Miyazaki Y. Salinomycin: a new monovalent cation ionophore // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1975; 66: 1231–6.
39. Miyazaki Y., Shibuya M., Sugawara H. et al. Salinomycin, a new polyether antibiotic // *J. Antibiotics.* – 1974; 27 (11): 814–21.
40. Mronga S., Miller G., Fischer J. et al. A model for ion transport across membranes: solution structure of the ionophore metal complex salinomycin-Na determined by NMR and molecular dynamics calculations // *Am. Chem. Soc.* – 1993; 115: 8414–20.
41. Paulus E., Kurz M., Matter H. et al. Solid – state and solution structure of the salinomycin-sodium complex: stabilization of different conformers for an ionophore in different environments // *Am. Chem. Soc.* – 1998; 120: 8209–21.
42. Phillips T., McBride W., Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2006; 98 (24): 1777–85.
43. Plumlee K., Johnson B., Galey F. Acute salinomycin toxicosis of pigs // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 1995; 7: 419–20.
44. Pressman B. Ionophorous antibiotics as model for biological transport // *Fed. Proc.* – 1968; 27: 1283–8.
45. Report of the scientific committee for animal nutrition on the use of salinomycin-sodium in feedingstuffs for rabbits for fattening. – Opinion expressed: July, 1992.
46. Reya T., Clevers H. Wnt signaling in stem cells and cancer // *Nature.* – 2005; 434: 843–50.
47. Reya T., Morrison S., Clarke M. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature.* – 2001; 414: 105–11.
48. Riccioni R., Dupuis M., Bernabei M. et al. The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor // *Blood. Cells. Mol. Dis.* – 2010; 45 (1): 86–92.
49. Ropolo M., Daga A., Griffero F. et al. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures // *Mol. Cancer. Res.* – 2009; 7 (3): 383–92.
50. Sack U., Walther W., Scudiero D. et al. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/ β -catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells // *Mol. Biol. Cell.* – 2011; 22 (18): 3344–54.
51. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2004; 51: 1–28.
52. Story P., Doube A. A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic // *N Z Med J.* – 2004; 117: U799.
53. Visbal A., Lewis M. Hedgehog signaling in the normal and neoplastic mammary gland // *Curr. Drug. Targets.* – 2010; 11 (9): 1103–11.
54. Yang J., Mani S., Donaher J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis // *Cell.* – 2004; 117: 927–39.
55. Zabierowski S., Herlyn M. Learning the ABCs of Melanoma-Initiating Cells // *Cancer. Cell.* – 2008; 13: 85–187.
56. Zhang Y., Zhang H., Wang X. et al. The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octoethyl modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles // *Biomaterials.* – 2012; 33: 679–91.
57. Zhou S., Schuetz J., Bunting K. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype // *Nat. Med.* – 2001; 7: 1028–34.