

УДК 547.857.7; 616-006.66

# 7-Метилгуанин подавляет рост аденокарциномы толстой кишки *in vivo*

К. И. Кирсанов<sup>1,2</sup>, Т. И. Фетисов<sup>1</sup>, Е. Е. Антошина<sup>1</sup>, Т. Г. Горькова<sup>1</sup>, Л. С. Труханова<sup>1</sup>, С. И. Шрам<sup>3</sup>, И. Ю. Нагаев<sup>3</sup>, Ю. А. Золотарев<sup>3</sup>, Л. Або Кура<sup>1,2</sup>, В. С. Покровский<sup>1,2</sup>, М. Г. Якубовская<sup>1</sup>, В. К. Швядас<sup>4,5</sup>, Д. К. Нилов<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Научно-исследовательский институт канцерогенеза, Москва, 115478 Россия

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, Москва, 117198 Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

<sup>4</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

<sup>5</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119234 Россия

\*E-mail: nilovdm@gmail.com

Поступила в редакцию 08.05.2024

Принята к печати 26.06.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27422

**РЕФЕРАТ** 7-Метилгуанин (7-МГ) является природным ингибитором поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 и тРНК-гуанинтрансгликозилазы, ферментативная активность которых важна для пролиферации опухолевых клеток. Недавно в ряде доклинических тестов была продемонстрирована безопасность 7-МГ и подобрана доза для внутрижелудочного введения мышам. В представленной работе исследована фармакологическая активность 7-МГ на мышах BALB/c и BALB/c nude с перевитой опухолью. Показано, что 7-МГ эффективно проникает в опухолевую ткань и подавляет рост аденокарциномы толстой кишки в модели Акатол, а также в ксенографтной модели с использованием клеток человека HCT116.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** 7-метилгуанин, ингибитор, поли(ADP-рибозо)полимераза 1, тРНК-гуанинтрансгликозилаза, аденокарцинома толстой кишки, мыши BALB/c.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** в/б – внутривнутрибрюшинное введение; в/ж – внутривнутрижелудочное введение; 7-МГ – 7-метилгуанин; ПАРП-1 – поли(ADP-рибозо)полимераза 1; ТГТ – тРНК-гуанинтрансгликозилаза.

## ВВЕДЕНИЕ

7-Метилгуанин (7-МГ) является метаболитом нуклеиновых кислот, который в малом количестве обнаруживается в крови и моче человека [1]. Изучение 7-МГ как потенциального противоопухолевого ингибитора началось с работы по компьютерному скринингу природных азотистых оснований и их производных в отношении поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 (ПАРП-1) – ключевого фермента репарации ДНК [2]. Моделирование продемонстрировало комплементарность 7-МГ к активному центру ПАРП-1, дальнейшие *in vitro* исследования подтвердили предположение о конкурентном характере ингибирования [3–5]. 7-МГ также является ингибитором тРНК-гуанинтрансгликозилазы (ТГТ) – фермента, участвующего в механизме трансляции [6]. Показано, что при нокауте/нокадауне гена ТГТ снижается пролиферация и миграция опухолевых клеток [7].

Синтетические ингибиторы ПАРП-1 олапариб, рупапариб и нирапариб используются в медицине в качестве инновационных противоопухолевых пре-

паратов, однако обладают серьезными побочными эффектами (в частности, миелодиспластический синдром/острый миелоидный лейкоз) [8, 9]. В то же время природный ингибитор 7-МГ продемонстрировал безопасность в проведенном нами токсикологическом исследовании; была подобрана доза для его введения мышам – 50 мг/кг внутривнутрижелудочно (в/ж), 3 раза в неделю [10]. Наличие нескольких релевантных мишеней (ПАРП-1, ТГТ) и безопасность 7-МГ обуславливают перспективность дальнейших *in vivo* исследований. В представленной работе впервые описано противоопухолевое действие 7-МГ на моделях аденокарциномы толстой кишки.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши BALB/c (самцы, возраст 4 недели) были получены из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Образец мышинной аденокарциномы Акатол [11] был получен из коллекции опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Суспензию опухолевых клеток (0.5 мл, 0.1 г/мл) вводили подкожно в надло-

паточную область. Введение тестируемых веществ начинали на 5-й день после перевивки. Мышей разбивали на группы по 9 животных в каждой: контрольная группа I, вода (в/ж, 3 раза в неделю); группа II, цисплатин (2.5 мг/кг в/б, 2 раза в неделю в течение 1 недели); группа III, 7-МГ (50 мг/кг в/ж, 3 раза в неделю); группа IV, 7-МГ + цисплатин. Для приготовления суспензии 7-МГ (5 мг/мл) навеску вещества смешивали с дистиллированной водой, встряхивали на вортексе, после чего оставляли на 5 мин в ультразвуковой бане при температуре 45°C. Полученную суспензию 7-МГ вводили с помощью гастрального зонда. При комбинированном лечении 7-МГ вводили за 3 ч до цисплатина. После развития опухолевых узлов измеряли их объем по формуле:  $V = 1/2 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$ . Анализ результатов проводили по достижении среднего значения объема опухоли в контрольной группе 4000 мм<sup>3</sup>.

Фармакокинетический эксперимент проводили на самцах мышей BALB/c на 15-й день после перевивки опухоли Акатол. За 18 ч до проведения эксперимента мышей лишали доступа к корму. Животным однократно вводили 7-МГ (50 мг/кг в/ж) и затем производили забор крови и опухолевой ткани через 15 мин (2 мыши), 60 мин (2 мыши) и 180 мин (3 мыши). Полученные образцы замораживали и подвергали лиофилизации, механическому измельчению и последовательной экстракции растворителями (90% водным раствором ацетонитрила, содержащим 2% трифторуксусной кислоты, ацетоном и 0.1% водным раствором гептафтормасляной кислоты). Количественный анализ 7-МГ проводили с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа на приборе LCQ Advantage MAX (Thermo Electron Co., США), оснащенного хроматографом Surveyor Plus и источником ионизации ESI. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированный 7-МГ, полученный методом твердофазного изотопного обмена [12].

Иммунодефицитные мыши BALB/c nude (самки, возраст 6–7 недель) были получены из разведения лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Суспензию опухолевых клеток человека HCT116 (0.2 мл,  $1.2 \times 10^6$  кл/мл) вводили подкожно в правый и левый бок мыши. Введение тестируемых веществ начинали на 10-й день после перевивки. Мышей разбивали на группы по 4 животных в каждой: контрольная группа I, калий-фосфатный буфер (в/б, 3 раза в неделю); группа II, цисплатин (1 мг/кг в/б, 3 раза в неделю в течение 1 недели); группа III, 7-МГ (50 мг/кг в/ж, 3 раза в неделю); группа IV, 7-МГ + цисплатин. При комбинированном лечении 7-МГ вводили за 3 ч до цисплатина. Объем опухолевых узлов измеряли по формуле  $V = \pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{глубина}$ .

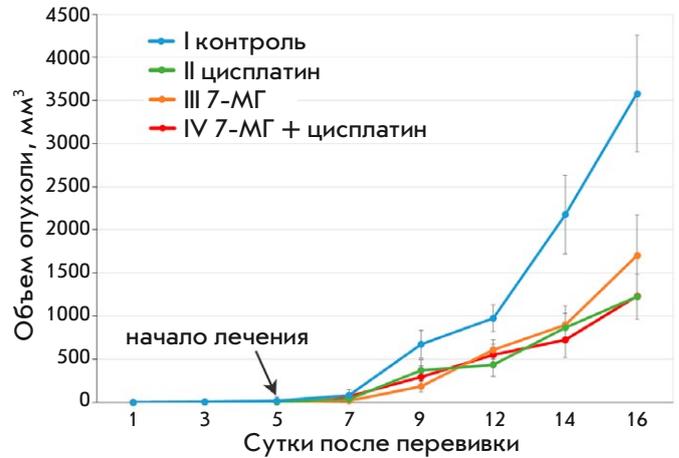


Рис. 1. Динамика роста аденокарциномы толстой кишки в модели Акатол

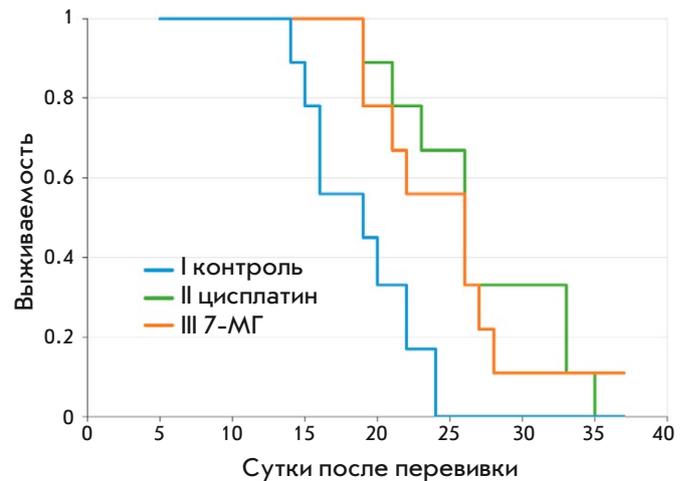


Рис. 2. Выживаемость мышей с перевитой опухолью Акатол (животное выбывало из группы по достижении размера опухоли 4000 мм<sup>3</sup>)

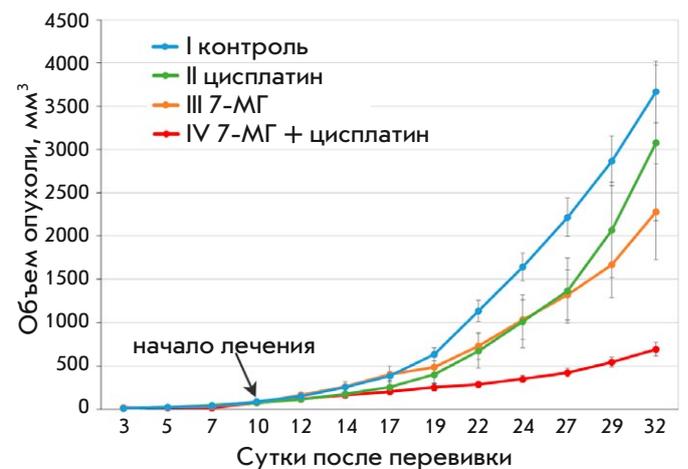


Рис. 3. Динамика роста аденокарциномы толстой кишки в ксенографтной модели

Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина по работе с животными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая активность ингибитора 7-МГ при в/ж введении была исследована на модели рака толстой кишки мыши Акатол. В качестве препарата сравнения использовали классический генотоксичный агент цисплатин, эффективность которого была ранее продемонстрирована в отношении модели Акатол. В результате показано существенное торможение роста опухоли в случае введения цисплатина (65.8%), 7-МГ (52.5%) и их комбинации (65.5%) на 16-е сутки эксперимента (рис. 1). Эффекты известного химиопрепарата цисплатина и обнаруженного ингибитора ПАРП-1 7-МГ оказались сопоставимы, а использование их комбинации не привело к усилению противоопухолевого действия.

Согласно регламенту работы с модельными мышами, при достижении критического размера опухоли (4000 мм<sup>3</sup>) животное может быть исключено из экспериментальной группы. Время, за которое опухоль достигает такого размера, можно условно принять за продолжительность жизни после перевивки. На рис. 2 показано выбывание мышей из группы по достижении критического размера опухоли, можно видеть заметное увеличение выживаемости при введении цисплатина и 7-МГ.

Для подтверждения накопления 7-МГ в перевитой опухоли Акатол был осуществлен фармакокинетический эксперимент. После в/ж введения 7-МГ его содержание в опухоли постепенно возрастало и через 15, 60 и 180 мин составило 218±13, 460±28 и 989±59 нг/г соответственно. При этом соотношение концентраций 7-МГ в опухоли и крови практически не зависело от времени и равнялось в среднем 0.44, что, с учетом низкой васкуляризации ткани, свидетельствует об эффективном проникновении 7-МГ в опухоль.

Также противоопухолевая активность 7-МГ была протестирована на ксенографтной модели рака толстой кишки, полученной в результате перевивки мышам опухолевых клеток человека НСТ116. На 32 сутки эксперимента торможение роста опухоли при введении цисплатина, 7-МГ и их комбинации составило 16.1, 37.8 и 80% соответственно (рис. 3). Интересно, что комбинация 7-МГ и цисплатина привела к аддитивному эффекту, который не наблюдался в случае модели Акатол. Вероятно, опухолевые клетки человека НСТ116 более чувствительны к комбинированному воздействию тестируемых препаратов.

## ВЫВОДЫ

Осуществлен *in vivo* анализ противоопухолевой активности природного соединения 7-МГ на модели рака толстой кишки Акатол, а также на ксенографтной модели с использованием опухолевых клеток человека НСТ116. Показатели торможения роста опухоли при введении 7-МГ свидетельствуют о высокой эффективности препарата в выбранном режиме – 50 мг/кг в/ж, 3 раза в неделю. С использованием хромато-масс-спектрометрического анализа показана высокая степень накопления 7-МГ в опухолевой ткани. В случае ксенографтной модели обнаружено существенное усиление противоопухолевого действия при комбинированном введении 7-МГ и известного химиотерапевтического препарата цисплатина (торможение роста 80%). Полученные данные подтверждают перспективность дальнейших исследований 7-МГ в качестве нового противоопухолевого средства. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10072). Получение дейтерированного 7-МГ осуществлено в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Topp N., Sander G., Heller-Schöch G., Schöch G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 161. P. 49–56.
2. Нилов Д.К., Тараров В.И., Куликов А.В., Захаренко А.Л., Гущина И.В., Михайлов С.Н., Лаврик О.И., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2016. Т. 8. № 2. С. 120–128.
3. Nilov D., Maluchenko N., Kurgina T., Pushkarev S., Lys A., Kutuzov M., Gerasimova N., Feofanov A., Švedas V., Lavrik O., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 2159.
4. Кургина Т.А., Шрам С.И., Кутузов М.М., Абрамова Т.В., Щербакова Т.А., Мальцева Е.А., Поройков В.В., Лаврик О.И., Швядас В.К., Нилов Д.К. // *Биохимия.* 2022. Т. 87. С. 794–803.
5. Шрам С.И., Щербакова Т.А., Абрамова Т.В., Барадиева Э.Ц., Ефремова А.С., Смирновская М.С., Сильников В.Н., Швядас В.К., Нилов Д.К. // *Биохимия.* 2023. Т. 88. С. 962–972.
6. Пушкарев С.В., Винник В.А., Шаповалова И.В., Швядас В.К., Нилов Д.К. // *Биохимия.* 2022. Т. 87. С. 550–557.
7. Zhang J., Lu R., Zhang Y., Matuszek Ž., Zhang W., Xia Y., Pan T., Sun J. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. P. 628.
8. Ohmoto A., Yachida S. // *Onco Targets Ther.* 2017. V. 10. P. 5195–5208.
9. Mittica G., Ghisoni E., Giannone G., Genta S., Aglietta M., Sapino A., Valabrega G. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2018. V. 13. P. 392–410.
10. Kirsanov K., Fetisov T., Antoshina E., Trukhanova L., Gor'kova T., Vlasova O., Khitrovo I., Lesovaya E., Kulbachevskaya N., Shcherbakova T., et al. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 842316.
11. Фетисов Т.И., Тилова Л.Р., Лесовая Е.А., Антошина Е.Е., Горькова Т.Г., Труханова Л.С., Морозова О.В., Шипаева Е.В., Иванов Р.В., Пурмаль А.А. и др. // *Усп. мол. онкол.* 2016. Т. 3. С. 67–72.
12. Zolotarev Y.A., Dadayan A.K., Borisov Y.A., Kozik V.S. // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 5425–5446.