

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco501727>

Цитотоксичность и противоопухолевая активность фармакологической пары C115H метионин-гамма-лиазы и сульфоксида S-пропил L-цистеина

Л. Або Кура^{1,2}, С.Ш. Каршиева^{1,2}, Ю.А. Борисова^{1,2}, В.С. Покровский^{1,2}¹ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Российская Федерация;² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Одним из возможных направлений создания новых лекарственных препаратов являются так называемые фармакологические пары: пролекарство + фермент, который способен в определённых условиях метаболизировать пролекарство с образованием активного метаболита, обладающего противоопухолевой активностью.

Цель — исследование цитотоксичности и противоопухолевой активности фармакологической пары C115H метионин-γ-лиазы (C115H МГЛ), конъюгированной с дайдзеином (C115H МГЛ-Dz), и сульфоксида S-пропил L-цистеина (пропиин).

Методы. Для оценки цитотоксичности фармакологической пары «C115H МГЛ-Dz + пропиин» *in vitro* на клеточных линиях эмбриональной почки человека (HEK-293), плаценты человека, рака молочной железы (SKBR3, MCF7 и T47D), аденокарциномы толстой кишки человека (HT29 и COLO205), рака поджелудочной железы человека (MIA PaCa-2) и рака предстательной железы человека (DU145 и PC3) использовали МТТ-тест. Оценку противоопухолевого эффекта *in vivo* осуществляли на моделях подкожных ксенографтов SKBR3, MIA PaCa-2, и HT29 у мышей линии BALB c/nude.

Результаты. Направленная доставка C115H МГЛ в составе фармакологической пары для образования дипропилтиосульфидата непосредственно на поверхности опухолевых клеток повышает цитотоксичность на всех культурах клеток по сравнению с дипропилтиосульфидатом, полученным при использовании фармакологических пар «C115H МГЛ + пропиин» *in vitro*. Исследование противоопухолевой активности фармакологической пары *in vivo* показало уменьшение объёмов опухоли у ксенографтов SKBR3 (торможение роста опухоли, ТРО, 89%, $p=0,004$), MIA PaCa-2 (ТРО=50%, $p=0,011$) и HT29 (ТРО=52%, $p=0,04$) по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Показано, что дипропилтиосульфидат, образованный фармакологической парой «C115H МГЛ-Dz + пропиин» *in situ*, подавляет рост опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты послужат основой для дальнейших исследований использования фармакологических пар как нового подхода для лечения рака.

Ключевые слова: ферментная пролекарственная терапия; метионин γ-лиаза; направленная доставка; тиосульфидаты.

Как цитировать:

Або Кура Л., Каршиева С.Ш., Борисова Ю.А., Покровский В.С. Цитотоксичность и противоопухолевая активность фармакологической пары C115H метионин-гамма-лиазы и сульфоксида S-пропил L-цистеина // Российский онкологический журнал. 2023. Т. 28, № 1. С. 5–14.

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco501727>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco501727>

Cytotoxic and Anticancer Activity of Pharmacological Pairs of C115H Methionine–Gamma-lyase and S-Propyl-L-Cysteine Sulfoxide

Louay Abo Qoura^{1,2}, Saida S. Karshieva^{1,2}, Julia A. Borisova^{1,2}, Vadim S. Pokrovsky^{1,2}¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;² N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: One of the alternate ways to developing novel medication is to use pharmacological pairs: an enzyme and a non-toxic prodrug that, under certain conditions, releases cytotoxic substances within or on the surface of the cancer cells, allowing the drug to be delivered precisely to the cancer cells.

AIM: To evaluate cytotoxic and anticancer effects of the pharmacological pair of C115H methionine- γ -lyase (C115H MGL), conjugated with daidzein (C115H MGL-Dz), and S-propyl-L-cysteine sulfoxide (propiin) against different kinds of solid tumors *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: MTT-test was performed to determine the cytotoxicity of C115H MGL-Dz in the presence of propiin *in vitro* against human embryonic kidney (HEK-293), human placenta, breast cancer (MCF7, SKBR3, and T47D), colon cancer (HT29 and COLO205), pancreatic cancer (MIA PaCa-2) and prostate cancer (DU145, and PC3) cells. The anticancer activity of the pharmacological pair "C115H MGL-Dz + propiin" against SKBR3, MIA PaCa-2, and HT29 *in vivo* was investigated using subcutaneous xenografts in BALB/c nude mice.

RESULTS: In comparison to dipropylthiosulfinate generated *in vitro* using the pharmacological pairs "C115H MGL + propiin", targeted delivery of C115H MGL-Dz as a component of a pharmacological pair "C115H MGL-Dz + propiin" to generate dipropylthiosulfinate directly on the surface of cancer cells enhances cytotoxicity in all cancer cells. The study of the antitumor activity of the pharmacological pair "C115H MGL-Dz + propiin" *in vivo* revealed a suppression of tumor volume growth in xenografts SKBR3 (tumor growth inhibition, TGI=89%, $p=0.004$), MIA PaCa-2 (TGI=50%, $p=0.011$), and HT29 (TGI=52%, $p=0.04$) vs control.

CONCLUSIONS: On several cancer cells, the cytotoxicity and anticancer activity of dipropylthiosulfinate produced by the pharmacological pair "C115H MGL-Dz + propiin" was observed. Our findings may stimulate more study into the role of pharmacological pairs as a novel strategy to cancer treatment.

Keywords: enzyme prodrug therapy; methionine γ -lyase; drug targeting; thiosulfinates.

To cite this article:

Abo Qoura L, Karshieva SS, Borisova JA, Pokrovsky VS. Cytotoxic and Anticancer Activity of Pharmacological Pairs of C115H Methionine–Gamma-lyase and S-Propyl-L-Cysteine Sulfoxide. *Russian Journal of Oncology*. 2023;28(1):5–14. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco501727>

Submitted: 17.06.2023

Accepted: 06.09.2023

Published online: 15.09.2023

ОБОСНОВАНИЕ

В настоящее время для лечения злокачественных новообразований всё чаще применяются схемы комбинированной лекарственной терапии. В этих условиях особое значение приобретают токсические свойства исследуемых препаратов и возможность повышения эффективности без опасности суммирования токсических свойств. Одним из возможных направлений создания новых лекарственных препаратов являются так называемые фармакологические пары: использование пролекарства и фермента. Основная идея этого подхода заключается в следующем:

- На первом этапе в опухоль доставляют специфический фермент.
- На втором этапе вводят нетоксичное пролекарство, которое служит субстратом для фермента. При этом происходит превращение пролекарства в активный препарат, и таким образом достигаются высокие локальные концентрации лекарства в опухоли [1].

Тиосульфиды — одни из наиболее хорошо изученных природных веществ и давно известны своими противоопухолевыми, антибактериальными и противогрибковыми свойствами [2]. Аллицин составляет примерно 70% от общего количества тиосульфидов, образующихся при механическом разрушении клеток чеснока и в результате последующей реакции β -элиминации аллиина, которую катализирует пиридоксаль-5'-фосфат-зависимая аллииназа [Комиссионный номер фермента (КФ) 4.4.1.4] [3]. Аллицин — крайне реакционноспособное и нестабильное соединение. При введении в кровь он исчезает из кровотока в течение нескольких минут [4]. Кроме того, из-за своей способности быстро реагировать с остатками цистеина тиоловых групп белков [4], аллицин может оказывать токсическое действие на клетки млекопитающих. В связи с этим его использование в клинике ограничено.

Метионин- γ -лиаза (МГЛ), КФ 4.4.1.11, — пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакции γ -элиминирования L-метионина и его аналогов, а также реакции β -элиминирования S-замещённых аналогов L-цистеина. МГЛ — внутриклеточный фермент, выделяемый из многих микроорганизмов, простейших и грибов [5]. Мутантная форма фермента с заменой цистеина 115 на гистидин (С115Н МГЛ) показала более высокую эффективность катализа реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина по сравнению с ферментом дикого типа. Именно поэтому она может быть использована в ферментной пролекарственной терапии как компонент фармакологической пары с сульфоксидами S-алк(ен)ил-цистеина, которые под её действием превращаются в диалкилтиосульфиды, обладающие цитотоксической активностью [6].

Антибактериальная активность диалкилтиосульфидов, образующихся из фармакологических пар «С115Н МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина»

in situ, впервые была показана против нескольких грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий, включая *Staphylococcus aureus* [7].

В настоящей работе для минимизации токсического действия тиосульфидов были использованы конъюгаты С115Н МГЛ с дайдзеином. Дайдзеин — природный фитоэстроген с молекулярной массой и химической структурой, близкой к человеческому эстрадиолу-17 β . Он способен связываться с высоким сродством с мембранными рецепторами эстрогена, ассоциированными с G-белком [8], и обеспечивать направленную доставку к опухолевым клеткам, экспрессирующим мембранные белки, связывающие дайдзеин (например, GPER1). Кроме того, исследован противоопухолевый эффект дипропилтиосульфидов, образующегося *in situ* при добавлении сульфоксида S-пропил L-цистеина (пропиина), на разных культурах клеток и на моделях ксенографтов солидных опухолей человека у мышей линии BALB/c nude.

Цель — исследование цитотоксичности и противоопухолевой активности фармакологической пары С115Н МГЛ, конъюгированной с дайдзеином (С115Н МГЛ-Dz), и пропиина в отношении солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованные препараты

Фермент для исследований (С115Н МГЛ-Dz) и сульфоксиды были получены в лаборатории химических основ биокатализа в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, как описано у Е.А. Mогозова и соавт. [9].

Клеточные линии и условия культивирования

Цитотоксическую активность фармакологических пар «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» тестировали *in vitro* на клеточных линиях:

- эмбриональной почки человека (HEK-293);
- плаценты человека;
- рака молочной железы (MCF7, SKBR3 и T47D);
- аденокарциномы толстой кишки человека (HT29 и COLO205);
- рака поджелудочной железы человека (MIA PaCa-2);
- рака предстательной железы человека (DU145 и PC3).

Клеточные линии были получены из банка лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ).

Клеточные культуры культивировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) или RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium,

ПанЭко, Россия), содержащей 10% Fetal Bovine Serum (HyClone, UK), 2 mM L-глутамин (Serva, Германия), и 100 мкг/мл пенициллина, в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂ и 95% влажности).

Клеточные монослойные линии пассировали 3 раза в неделю. Для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор Версена. Для оценки цитотоксичности фармакологических пар проводили две серии экспериментов.

Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии пропина

Достижение логарифмической фазы роста клетки пересевали в 96-луночные микропланшеты с плотностью (5–10)×10³ клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C и CO₂ в концентрации 5%. Подсчёт клеток проводили после обработки раствором трипанового синего (0,4%).

C115H МГЛ-Dz добавляли в двукратных серийных разведениях к преинкубированным клеткам в диапазонах концентраций от 1 до 64 мкМ и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C. Не связавшиеся конъюгаты удаляли троекратным промыванием клеток культуральной средой DMEM или RPMI 1640 перед добавлением 1 мг/мл пропина. В качестве контроля использовали клеточную культуру, которую инкубировали в питательной среде и фосфатно-солевом буфере (PBS).

Уровень клеточного метаболизма по окончании периода инкубации измеряли при длине волны λ=540 нм с помощью МТТ-теста [10]. Оптическое поглощение окрашенных растворов формазана в диметилсульфоксиде измеряли на планшетном спектрофотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при помощи программного обеспечения SkanIt 6.1 RE (Thermo Fisher Scientific, США). Ингибирующую концентрацию, которая вызывала уменьшение количества живых клеток на 50% (IC₅₀), рассчитывали методом нелинейной регрессии.

Цитотоксическая активность дипропилтиосульфидата, образуемого фармакологической парой «C115H МГЛ + пропин»

Смеси «C115H МГЛ + пропин» готовили следующим образом: к раствору 0,14 ЕД/мл C115H МГЛ в 1 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 1 мМ дитиотреитол и 0,1 мМ пиридоксаль-5'-фосфат, добавляли 20 мг пропина и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C.

Концентрацию образовавшегося дипропилтиосульфидата определяли с участием 2-нитро-5-тиобензоата по методике, описанной у Т. Мiron и соавт. [11]. Чтобы оценить цитотоксичность дипропилтиосульфидата *in vitro*, клетки пересевали в 96-луночные микропланшеты в количестве (3–8)×10³ на 24 ч. К преинкубированным клеткам добавляли смесь «C115H МГЛ + пропин» в диапазоне концентраций от 1 до 300 мкМ (двукратное серийное разведение) и инкубировали при 37 °C в течение 72 ч.

МТТ-тест проводили по методике, описанной в пункте «Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии пропина».

Животные

Оценку противоопухолевого эффекта фармакологических пар «C115H МГЛ-Dz + пропин» *in vivo* проводили на перевиваемых ксенографтах человека у иммунодефицитной линии мышей BALB/c nude. В работе использовали мышей BALB/c nude обоих полов в возрасте 6–10 нед. с массой тела не менее 20 г из разведения лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. Мышей BALB/c nude содержали в конвенциональном виварии при естественном освещении, регулируемой температуре воздуха (25 °C), с контролируруемыми параметрами микроклимата и постоянным доступом к воде и брикетированному корму.

Опухолевые модели

Использовали перевиваемые опухоли мышей из банка опухолевых штаммов лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. В исследовании использовали ксенографты опухолей человека (подкожные гетеротрансплантаты): рака молочной железы SKBR3, аденокарциномы толстой кишки человека HT29 и рака поджелудочной железы человека MIA PaCa-2. Образцы опухолевых клеток готовили по стандартной методике. Взвесь опухолевых клеток SKBR3, HT29, и MIA PaCa-2 (7×10⁶–10⁷) имплантировали подкожно (правый и левый бок) билатерально с матригелем (Corning Matrigel Membrane Matrix, Fisher Scientific, США) в массовом отношении 1:1.

Дозы и режимы введения препаратов

При достижении среднего объёма опухоли ~100 мм³, мышей распределяли на 4 группы по 5 животных и начинали лечение. Дозы и режимы введения препаратов представлены в табл. 1.

Оценка противоопухолевой активности фармакологической пары «C115H МГЛ-Dz + пропин» *in vivo*








Объём опухоли измеряли 2 раза в неделю с помощью электронного штангенциркуля. Противоопухолевую активность фармакологической пары «C115H МГЛ-Dz + пропин» оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %), у экспериментальных животных по сравнению с контролем. ТРО оценивали по формуле:

$$\text{ТРО, \%} = [(V_c - V_e) / V_c] \times 100\% \quad [12]$$

где V_c — средний объём опухолей в контрольной группе, V_e — средний объём опухолей в опытной группе (мм³).

Значимыми считали значения ТРО ≥50%.

Таблица 1. Группы, дозы и режимы введения препаратов**Table 1.** Groups, doses, and schedules of drug administration

Способ введения препаратов	Внутрибрюшинно			Спустя 1,5 ч	Интрамурально	
	30 ед. С115Н МГЛ-Dz в 200 мкл PBS	30 ед. С115Н МГЛ в 200 мкл PBS	200 мкл PBS		3 мг пропиина в 100 мкл PBS	100 мкл PBS
Группа 1 (Контроль)	—	—		Спустя 1,5 ч	—	
Группа 2		—	—			—
Группа 3		—	—		—	
Группа 4	—		—			—

Примечание. Введение препаратов продолжалось с интервалом 24 ч в течение 10 дней.
Note. The drugs were given at regular 24-hour intervals for 10 days.

Этическая экспертиза

Все эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на экспериментальных животных, утверждёнными в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, документ № Act708n от 23.08.2010.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов эксперимента *in vitro* проводили с помощью пакета GraphPad Prism версии 9.0 (Graphpad Software Inc, США). Из нелинейной регрессии определяли IC_{50} и коэффициент детерминации модели — R^2 . Количественные данные IC_{50} представлены в виде $M \pm SD$ (среднее арифметическое и стандартное отклонение). Статистический анализ исследований противоопухолевой активности *in vivo* проводили с использованием Statistical Package for the Social Sciences версии 25.0 (IBM, США). Выявление различий между контрольной группой и каждой лечебной группой выполняли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. На рисунках показаны средние значения с планками погрешностей в виде стандартной ошибки среднего. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антипролиферативный эффект фармакологической пары «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» *in vitro*

Конъюгаты С115Н МГЛ-Dz в присутствии пропиина не оказывали цитотоксического действия на клетки НЕК-293 и плаценты, предположительно — из-за отсутствия мембранных рецепторов эстрогенов (GPER1), связывающих дайдзен.

Клетки MCF7 оказались максимально чувствительны к фармакологическим парам «С115Н МГЛ-Dz + пропиин», IC_{50} конъюгата в присутствии пропиина составила 0,53 мкМ.

Клетки MIA PaCa-2 проявляли большую чувствительность к паре «С115Н МГЛ-Dz + пропиин», чем клетки HT29 (IC_{50} =6,4 и 6,9 мкМ, соответственно).

Фармакологическая пара «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» не оказывала цитотоксического действия на клетки рака

толстой кишки (COLO205), предположительно — из-за низкой экспрессии/отсутствия мембранных рецепторов эстрогенов (табл. 2).

Все исследуемые клетки не проявляли чувствительности к «С115Н МГЛ-Dz + PBS» (без субстратов).

Влияние дипропилтиосульфата на жизнеспособность опухолевых клеток *in vitro*

Влияние дипропилтиосульфата, образованного в результате ферментативной реакции β -элиминирования пропиина, катализируемой С115Н МГЛ *in vitro*, на жизнеспособность опухолевых клеток тестировали на культурах клеток различных злокачественных новообразований: MCF7, SKBR3, T47D, HT29, COLO205, MIA PaCa-2, DU145, и PC3, а также на клетках эмбриональной почки НЕК-293 и плаценты человека.

Как показано в табл. 2, все клеточные линии были чувствительны к действию дипропилтиосульфата. Значения IC_{50} варьируют в диапазоне от 15,03 до 66,36 мкМ.

Клетки MCF7 оказались наиболее чувствительными к дипропилтиосульфату, IC_{50} составила 15,07 мкМ.

На моделях рака толстой кишки для клеток HT29 и COLO205 показаны близкие значения IC_{50} , равные 43,1 и 48,6 мкМ соответственно, что указывает на одинаковую чувствительность к дипропилтиосульфату.

Из моделей рака предстательной железы культура клеток PC3 показала более высокую чувствительность к воздействию дипропилтиосульфата (IC_{50} =51,20 мкМ) по сравнению с DU145 (IC_{50} =60,99 мкМ).

Дипропилтиосульфат, полученный из фармакологической пары «С115Н МГЛ + пропиин», оказывал цитотоксическое действие не только на разные виды опухолевых клеток, но и на клетки НЕК-293 и плаценты человека, где IC_{50} =34,23 и 42,10 мкМ соответственно (см. табл. 2).

Противоопухолевая эффективность фармакологической пары «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» на моделях ксенографтов человека у мышей линии BALB/c nude

На всех использованных моделях ксенографтов опухолей человека (SKBR3, MIA PaCa-2, и HT29)

Таблица 2. Цитотоксическая активность фармакологической пары «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» и дипропилтиосульфидата на моделях различных опухолевых клеток и здоровых клеток человека

Table 2. Cytotoxicity of «С115Н MGL-Dz + propiin» and dipropylthiosulfinate on healthy and different cancer cells

Тип клеток	Клеточная линия	IC ₅₀ , мкМ	
		С115Н МГЛ-Dz + пропиин*	Дипропилтиосульфидат
Клетки эмбриональной почки	HEK-293	ND**	34,23±0,21
Плацинта	—	ND	42,10±0,54
	MCF7	0,5±0,04	15,03±0,14
Рак молочной железы	SKBR3	1,1±0,08	60,10±0,58
	T-47D	1,9±0,18	51,75±0,55
	HT29	6,9±0,40	43,10±0,47
Рак толстой кишки	COLO205	ND	48,61±0,53
Рак поджелудочной железы	MIA PaCa-2	6,4±0,50	62,62±0,65
Рак предстательной железы	DU145	17,4±0,90	60,99±0,61
	PC3	16,9±0,50	51,20±0,54

* Концентрация пропиина — 1 мг/мл; ** ND — не обнаружено

* Concentration of propiin — 1 mg/ml; ** ND — not detected

использовали одинаковую схему лечения. Животные в опытных группах получали внутривенно препарат С115Н МГЛ-Dz или С115Н МГЛ, а спустя 1,5 ч — пропиин или PBS интратуморально. Контрольная группа получала раствор PBS в эквивалентных объёмах. Схема лечения включала ежедневное введение препаратов в течение 10 дней.

При лечении иммунодефицитных мышей с имплантированными клетками SKBR3 фармакологической парой «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» наблюдали существенное уменьшение объёма опухолей. К 5-му дню терапии фиксировали высокий статистически значимый

противоопухолевый эффект на уровне ТРО=89% ($p=0,02$). К концу лечения (10-е сутки после начала терапии) ингибирующий эффект сохранялся практически на том же уровне и обеспечил ТРО=85% ($p=0,04$; рис. 1).

На модели ксенографтов рака поджелудочной железы человека MIA PaCa-2 фармакологическая пара «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» показала биологически значимый ингибирующий эффект на уровне ТРО=50% ($p=0,011$; рис. 2) на 10-е сутки после начала лечения.

На модели ксенографтов рака толстой кишки человека HT29 терапия фармакологической парой «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» также вызывала биологически значимое

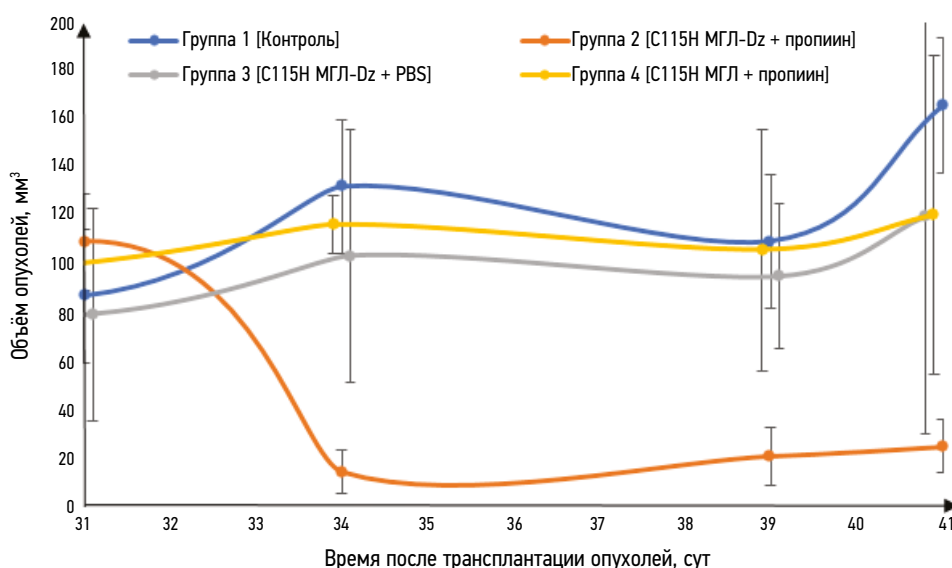


Рис. 1. Фармакологическая пара «С115Н МГЛ-Dz + пропиин» уменьшает объём опухоли *in vivo* на модели рака молочной железы SKBR3 у мышей BALB/c nude.

Fig. 1. The pharmacological pair «С115Н MGL-Dz + propiin» decreases tumor volume *in vivo* in the nude BALB/c mice with SKBR3 human breast cancer xenografts.

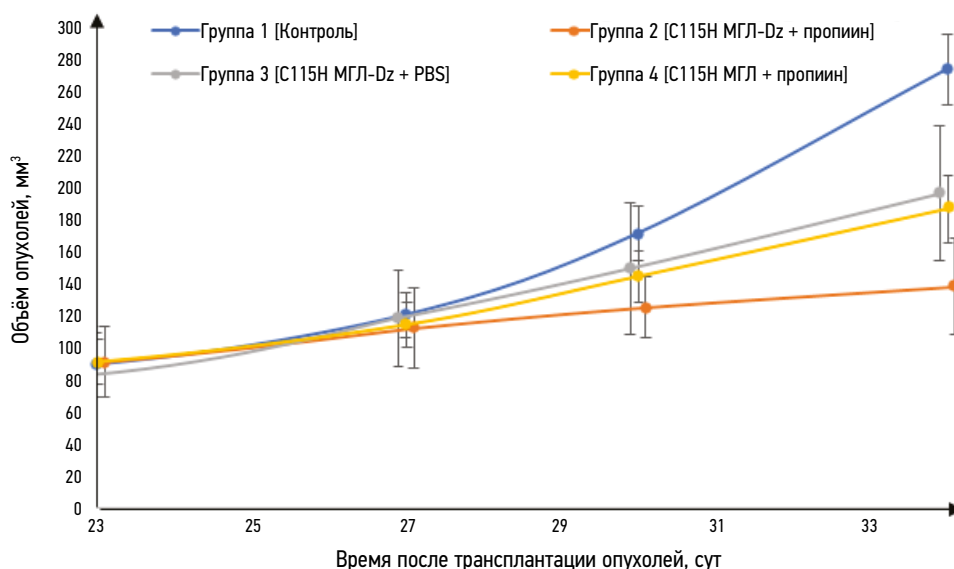


Рис. 2. Фармакологическая пара «C115H MGL-Dz + пропиин» уменьшает объём опухоли *in vivo* на модели рака поджелудочной железы MIA PaCa-2 у мышей BALB/c nude.

Fig. 2. The pharmacological pair «C115H MGL-Dz + propiin» decreases tumor volume *in vivo* in the nude BALB/c mice with MIA PaCa-2 pancreatic adenocarcinoma cancer xenografts.

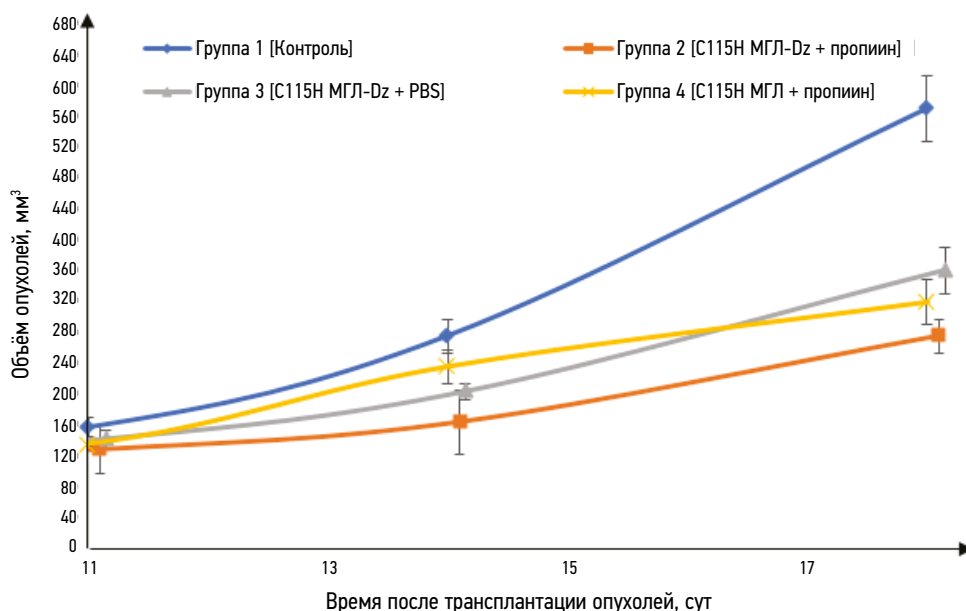


Рис. 3. Фармакологическая пара «C115H MGL-Dz + пропиин» уменьшает объём опухоли *in vivo* на модели рака толстой кишки HT29 у мышей BALB/c nude.

Fig. 3. The pharmacological pair «C115H MGL-Dz + propiin» decreases tumor volume *in vivo* in the nude BALB/c mice with HT29 colon cancer xenografts.

торможение роста (ТРО=52%, $p=0,04$; рис. 3) на 10-е сутки после начала лечения.

Введение фармакологической пары с неконъюгированным ферментом «C115H MGL + пропиин», а также замена пропиина на PBS («C115H MGL-Dz + PBS») не давало биологически значимого эффекта на всех моделях ксенографтов.

Оценка переносимости лечения у мышей BALB/c nude

На всех исследованных моделях введение фармакологических пар «C115H MGL-Dz + пропиин» не вызвало значимого уменьшения массы тела по сравнению с первым днём лечения. Поведение мышей было без особенностей в течение всего периода наблюдения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование фармакологических пар «фермент + пролекарство» может повысить эффективность и безопасность традиционной химиотерапии рака. Молекулярный вектор (антитела, изофлавоны и другие молекулы) переносит фермент к месту расположения опухолевых клеток, где фермент взаимодействует с пролекарством. Благодаря структурной схожести с эстрогенами, дайдзеин является идеальным средством для доставки лекарств к опухолевым клеткам, гиперэкспрессирующим мембранные рецепторы эстрогенов (например, GPER1) [13], в частности, к клеткам рака молочной железы (SKBR3) [14], рака поджелудочной железы (MIA PaCa-2) [15] и даже, в ряде случаев, рака толстой кишки (HT29) [16].

Израильские учёные первыми использовали дайдзеин для направленной доставки препаратов к клеткам с поверхностными эстрогеновыми рецепторами (ER). Доказано специфическое связывание конъюгатов (аллииназы–дайдзеин) с рецепторами эстрогенов клеток рака яичников человека (OVCAR3) и показана терапевтическая эффективность фармакологической пары — конъюгата и субстрата, аллиина, которые *in situ* образовали аллицин, обладающий противоопухолевой активностью [17].

Ранее было показано, что разные виды тиосульфидов могут быть получены с помощью фермента метионин-γ-лиазы при расщеплении сульфоксидов:

- S-аллил-L-цистеина (аллиин);
- S-метил-L-цистеина (метиин);
- S-этил-L-цистеина (этиин);
- S-пропил-L-цистеина (пропиин).

Эта реакция протекает как при использовании МГЛ дикого типа, так и её более эффективной мутантной формы, C115H МГЛ [9].

Таким образом, для направленной доставки ферментного компонента C115H МГЛ к поверхности эстроген-зависимых опухолей нами был получен конъюгат C115H МГЛ с дайдзеином — C115H МГЛ-Dz — и протестирована эффективность конъюгата в присутствии пропиина («C115H МГЛ-Dz + пропиин») *in vivo* и *in vitro* на разных моделях солидных опухолей.

В настоящей работе мы сравнили цитотоксическую активность фармакологической пары «C115H МГЛ-Dz + пропиин» и конечного продукта ферментативной реакции C115H МГЛ и пропиина — дипропилтиосульфидата (см. табл. 2). Наибольший эффект был отмечен у дипропилтиосульфидата, образованного из фармакологических пар «C115H МГЛ-Dz + пропиин» *in situ*, который показал высокий цитотоксический эффект ($IC_{50} < 17,4$ мкМ; см. табл. 2) на:

- ER⁺ GPER1⁺ SKBR3 [14];
- ER⁺ GPER1⁺ MCF7 [18];
- ER⁺ GPER1⁺ T47D [18];
- ERβ⁺ GPER1⁺ HER2/neu⁺ HT29 [16];
- ER⁺ GPER1⁺ MIA PaCa-2 [15].

Максимальный цитотоксический эффект был достигнут на всех клетках с гиперэкспрессией мембранных рецепторов эстрогенов, в то время как клетки рака толстой кишки (COLO205) чувствительности к фармакологической паре «C115H МГЛ-Dz + пропиин» не демонстрировали, предположительно — из-за низкой концентрации или отсутствия мембранных рецепторов эстрогенов.

Нами ранее было показано, что конъюгаты C115H МГЛ-Dz могут связываться на поверхности раковых клеток 22Rv1, а при введении пропиина в опухоль — катализировать расщепление пропиина с образованием дипропилтиосульфидатов. Конечный продукт реакции приводил к снижению объёма опухоли по сравнению с контролем (TPO=70,0%) [19].

В настоящей работе при лечении животных фармакологической парой «C115H МГЛ-Dz + пропиин» наблюдалось значительное уменьшение объёма опухоли в клеточной линии GPER1⁺ SKBR3 с гиперэкспрессией мембранных рецепторов эстрогенов (TPO=89% по сравнению с контролем) *in vivo*.

Кроме того, гиперэкспрессия GPER1 в клетках Panc1 [15] позволяет дайдзеину связываться с ER-Panc1 более эффективно, чем с ER⁺ MIA PaCa-2, что может объяснять более эффективное уменьшение объёма опухолей под воздействием «C115H МГЛ-Dz + пропиин» на модели ксенографтов человека Panc1 [19], чем на модели MIA PaCa-2.

В клетках HT29 дайдзеин может связываться с GPER1 и/или мембранными ERβ и при терапии фармакологической парой «C115H МГЛ-Dz + пропиин», TPO составило почти 52%. С другой стороны, ранее нами было показано [19], что лечение не приводит к достоверному уменьшению объёма опухоли SW620 по сравнению с контролем из-за отсутствия экспрессии рецепторов связывания дайдзеина на поверхности клеток. В контрольных группах — «C115H МГЛ-Dz + PBS» или «C115H МГЛ + пропиин» — не наблюдалось значительного эффекта во всех протестированных клеточных линиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина оказалась гораздо выше, чем цитотоксичность конечного продукта, дипропилтиосульфидата, образуемого фармакологической парой «C115H МГЛ + пропиин». Фармакологическая пара «C115H МГЛ-Dz + пропиин» тормозила рост солидных злокачественных новообразований *in vivo*. Наиболее чувствительными оказались ксенографты с гиперэкспрессией мембранных рецепторов эстрогенов SKBR3. Полученные результаты послужат основой для дальнейших исследований на тему использования фармакологических пар как нового подхода для лечения рака.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Исследование и публикация осуществлены при поддержке государственной программы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, государственное задание № 075-01551-23-00 (ФССП-2023-0006).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Л. Або Кура — получение и анализ данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста и редактирование статьи; С.Ш. Каршиева, Ю.А. Борисова — получение и анализ данных; В.С. Покровский — разработка дизайна

исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This work was funded by the State Program of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (N 075-01551-23-00; FSSF-2023-0006).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. Abo Qoura L — obtaining and analysing data, review of publications on the topic of the article, writing of the manuscript; Karshieva SS, Borisova JA — obtaining and analysing data; Pokrovsky VS — research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Xu G., McLeod H.L. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001. Vol. 7, N 11. P. 3314–3324.
- Fujisawa H., Watanabe K., Suma K., et al. Antibacterial Potential of Garlic-Derived Allicin and Its Cancellation by Sulfhydryl Compounds // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2009. Vol. 73, N 9. P. 1948–1955. doi: 10.1271/bbb.90096
- Lancaster J.E., Collin H.A. Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulfoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*) // *Plant Science Letters*. 1981. Vol. 22, N 2. P. 169–176. doi: 10.1016/0304-4211(81)90139-5
- Cai X.J., Block E., Uden P.C., Quimby B.D., Sullivan J.J. Allium Chemistry: Identification of Natural Abundance Organoselenium Compounds in Human Breath after Ingestion of Garlic Using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995. Vol. 43, N 7. P. 1751–1753. doi: 10.1021/jf00055a001
- Морозова Е.А., Куликова В.В., Яшин Д.В., и др. Кинетические характеристики и цитотоксическая активность рекомбинантных препаратов метионин- γ -лиазы *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* и *Citrobacter freundii*, *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. № 3 (18). С. 96–102. doi: 10.32607/20758251-2013-5-3-92-98
- Morozova E., Anufrieva N., Koval V., et al. Conjugates of methionine γ -lyase with polysialic acid: Two approaches to antitumor therapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 182. P. 394–401. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201
- Ануфриева Н.В., Морозова Е.А., Куликова В.В., и др. Сульфоксиды – аналоги L-метионина и L-цистеина как пролекарства против грамположительных и грамотрицательных бактерий // *Acta Naturae*. 2015. Т. 7, № 4. С. 141–148. doi: 10.32607/20758251-2015-7-4-128-135
- Sarkar F.H., Li Y. Soy Isoflavones and Cancer Prevention // *Cancer Investigation*. 2003. Vol. 21, N 5. P. 744–757. doi: 10.1081/CNV-120023773
- Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N., et al. Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfonates // *Biochimie*. 2016. Vol. 128–129. P. 92–98. doi: 10.1016/j.biochi.2016.07.007
- Bank U., Reinhold D., Ansorge S. Messung der zellulären Aktivität mit Hilfe des MTT-Farbttests. Untersuchungen zur Optimierung des Verfahrens // *Allergie und Immunologie*. 1991. Vol. 37, N 3–4. P. 119–123. (In German)
- Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., Wilchek M. A Spectrophotometric Assay for Allicin and Alliinase (Alliin lyase) Activity: Reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with Thiosulfonates // *Analytical Biochemistry*. 1998. Vol. 265, N 2. P. 317–325. doi: 10.1006/abio.1998.2924
- Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1989. Vol. 24, N 3. P. 148–154. doi: 10.1007/BF00300234
- Bagshawe K.D. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer // *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2006. Vol. 6, N 10. P. 1421–1431. doi: 10.1586/14737140.6.10.1421
- Ma H.R., Wang J., Chen Y.F., et al. Icaritin and icaritin stimulate the proliferation of SKBr3 cells through the GPER1-mediated modulation of the EGFR-MAPK signaling pathway // *International Journal of Molecular Medicine*. 2014. Vol. 33, N 6. P. 1627–1634. doi: 10.3892/ijmm.2014.1722
- Mesmar F., Dai B., Ibrahim A., et al. Clinical candidate and genistein analogue AXP107-11 has chemoenhancing functions in pancreatic adenocarcinoma through G protein-coupled estrogen receptor signaling // *Cancer Medicine*. 2019. Vol. 8, N 18. P. 7705–7719. doi: 10.1002/cam4.2581
- Jacenic D., Beswick E.J., Krajewska W.M., Prossnitz E.R. G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis // *World Journal of Gastroenterology*. 2019. Vol. 25, N 30. P. 4092–4104. doi: 10.3748/wjg.v25.i30.4092
- Appel E., Rabinkov A., Neeman M., Kohen F., Mirelman D. Conjugates of daidzein-alliinase as a targeted pro-drug enzyme system against ovarian carcinoma // *Journal of Drug Targeting*. 2011. Vol. 19, N 5. P. 326–335. doi: 10.3109/1061186X.2010.504265
- Samartzis E.P., Noske A., Meisel A., et al. The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, N 1. P. e83296. doi: 10.1371/journal.pone.0083296
- Або Кура Л., Морозова Е.А., Коваль В.С., и др. Цитотоксические и противоопухолевые свойства конъюгата метионин γ -лиаза-дайдзеин в комбинации с сульфоксидами S-алк(ен)ил-L-цистеина // *Российский биотерапевтический журнал*. 2022. Т. 21, № 4. С. 62–70. doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70

REFERENCES

- Xu G, McLeod HL. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(11):3314–3324.
- Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, et al. Antibacterial Potential of Garlic-Derived Allicin and Its Cancellation by Sulfhydryl Compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2009;73(9):1948–1955. doi: 10.1271/bbb.90096
- Lancaster JE, Collin HA. Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*. 1981;22(2):169–176. doi: 10.1016/0304-4211(81)90139-5
- Cai XJ, Block E, Uden PC, Quimby BD, Sullivan JJ. Allium Chemistry: Identification of Natural Abundance Organoselenium Compounds in Human Breath after Ingestion of Garlic Using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995;43(7):1751–1753. doi: 10.1021/jf00055a001
- Morozova E.A., Kulikova V.V., Yashin D.V., et al. Kinetic parameters and cytotoxic activity of recombinant methionine-γ-lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Clitrobacter freundii*. *Acta Naturae*. 2013;5(3):92–98. doi: 10.32607/20758251-2013-5-3-92-98
- Morozova E, Anufrieva N, Koval V, et al. Conjugates of methionine γ-lyase with polysialic acid: Two approaches to antitumor therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;182:394–401. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201
- Anufrieva NV, Morozova EA, Kulikova VV, et al. Sulfoxides, Analogues of L-Methionine and L-Cysteine As Pro-Drugs against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Acta Naturae*. 2015;7(4):128–135. doi: 10.32607/20758251-2015-7-4-128-135
- Sarkar FH, Li Y. Soy Isoflavones and Cancer Prevention. *Cancer Investigation*. 2003;21(5):744–757. doi: 10.1081/CNV-120023773
- Morozova EA, Kulikova VV, Rodionov AN, et al. Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ-lyase effectively produces antimicrobial thiosulfonates. *Biochimie*. 2016;128–129:92–98. doi: 10.1016/j.biochi.2016.07.007
- Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Messung der zellulären Aktivität mit Hilfe des MTT-Farbttests. Untersuchungen zur Optimierung des Verfahrens. *Allergie und Immunologie*. 1991;37(3–4):119–123. (In German).
- Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Weiner L, Wilchek M. A Spectrophotometric Assay for Allicin and Alliinase (Alliin lyase) Activity: Reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with Thiosulfonates. *Analytical Biochemistry*. 1998;265(2):317–325. doi: 10.1006/abio.1998.2924
- Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1989;24(3):148–154. doi: 10.1007/BF00300234
- Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2006;6(10):1421–1431. doi: 10.1586/14737140.6.10.1421
- Ma HR, Wang J, Chen YF, et al. Icaritin and icaritin stimulate the proliferation of SKBr3 cells through the GPER1-mediated modulation of the EGFR-MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2014;33(6):1627–1634. doi: 10.3892/ijmm.2014.1722
- Mesmar F, Dai B, Ibrahim A, et al. Clinical candidate and genistein analogue AXP107-11 has chemoenhancing functions in pancreatic adenocarcinoma through G protein-coupled estrogen receptor signaling. *Cancer Medicine*. 2019;8(18):7705–7719. doi: 10.1002/cam4.2581
- Jacenic D, Beswick EJ, Krajewska WM, Prossnitz ER. G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2019;25(30):4092–4104. doi: 10.3748/wjg.v25.i30.4092
- Appel E, Rabinkov A, Neeman M, Kohen F, Mirelman D. Conjugates of daidzein-alliinase as a targeted pro-drug enzyme system against ovarian carcinoma. *Journal of Drug Targeting*. 2011;19(5):326–335. doi: 10.3109/1061186X.2010.504265
- Samartzis EP, Noske A, Meisel A, et al. The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e83296. doi: 10.1371/journal.pone.0083296
- Abo Qoura L, Morozova EA, Koval VS, et al. Cytotoxic and antitumor properties of methionine γ-lyase conjugate in combination with S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides. *Russian Journal of Biotherapy*. 2022;21(4):62–70. (In Russ). doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70

ОБ АВТОРАХ

* Або Кура Луай;

адрес: Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;
ORCID: 0000-0001-5391-5077;
e-mail: louay.ko@gmail.com

Каршиева Саида Шамильевна;

ORCID: 0000-0003-2469-2315;
eLibrary SPIN: 9154-7071;
e-mail: skarshieva@gmail.com

Борисова Юлия Александровна;

ORCID: 0000-0002-0073-7729;
eLibrary SPIN: 9757-5847;
e-mail: ulkabor@yandex.ru

Покровский Вадим Сергеевич, д-р мед. наук;

ORCID: 0000-0003-4006-9320;
eLibrary SPIN: 4552-1226; e-mail: pokrovskiy-vs@rudn.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* Louay Abo Qoura;

address: 6 Miklukho-Maklaya street, 117198, Moscow, Russian Federation;
ORCID: 0000-0001-5391-5077;
e-mail: louay.ko@gmail.com

Saida S. Karshieva;

ORCID: 0000-0003-2469-2315;
eLibrary SPIN: 9154-7071;
e-mail: skarshieva@gmail.com

Julia A. Borisova;

ORCID: 0000-0002-0073-7729;
eLibrary SPIN: 9757-5847;
e-mail: ulkabor@yandex.ru

Vadim S. Pokrovsky, MD, Dr. Sci. (Med.);

ORCID: 0000-0003-4006-9320;
eLibrary SPIN: 4552-1226; e-mail: pokrovskiy-vs@rudn.ru