

УДК 615.849.12;615.277.3

DOI 10.34014/2227-1848-2025-1-114-123

АНТАГОНИСТ БОМБЕЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ BBN/C1-C2 В МОДЕЛИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА IN VITRO

Е.А. Белобородов, Е.В. Юрова, Д.Е. Сугак, А.Н. Фомин, Ю.В. Саенко

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Колоректальный рак является третьим по распространенности и вторым по количеству смертей онкологическим заболеванием в мире. Одна из стратегий лечения колоректального рака заключается в использовании таргетной пептидной терапии, нацеленной на определенные типы рецепторов, сверхэкспрессирующихся на поверхности клеток. Перспективной мишенью является бомбезиновый рецептор GRPR, для которого характерна аномальная экспрессия при колоректальном раке.

В данной работе для лечения колоректального рака предлагается использовать молекулу BBN/C1-C2, созданную на основе бомбезина – короткого пептида, тропного к GRPR, и кноттина, который выступает в качестве каркаса для стабилизации молекулы. BBN/C1-C2 выступает в роли антагониста рецептора GRPR, что определяет его роль в выживаемости раковых клеток.

Цель. Изучение влияния пептида BBN/C1-C2 на выживаемость клеточной культуры колоректального рака.

Материалы и методы. Влияние пептида BBN/C1-C2, полученного с помощью твердофазного синтеза, на выживаемость раковых клеток оценивали в культуре HCT-116 с использованием флуоресцентной микроскопии (апоптоз, некроз) и клеточного анализатора (динамика адгезии клеток) через 3 и 24 ч после воздействия.

Результаты. Пептид BBN/C1-C2 в концентрациях от 0,2 до 20 мкМ показал себя как молекулу, способную не только ингибировать пролиферацию клеток, но и вызывать клеточную гибель путем апоптоза уже через три часа после инкубации.

Выводы. Таким образом, молекула BBN/C1-C2, созданная на основе агониста GRPR, встроенного в молекулу кноттина, может рассматриваться в качестве прототипа для создания радиофармпрепарата для лечения новообразований толстого кишечника.

Ключевые слова: колоректальный рак, бомбезин, таргетная терапия.

Введение. Колоректальный рак, предстанный раком толстой или прямой кишки, является третьим по распространенности и вторым по количеству смертей онкологическим заболеванием в мире. В 2020 г. он стал причиной 9,4 % смертей [1]. Стандартным методом лечения колоректального рака является лапароскопическая резекция. Однако существует проблема определения целесообразности данной процедуры [2, 3]. К недостаткам классической химиотерапии можно отнести развитие устойчивости к применяемым препаратам [4]. Важным достижением в области лечения онкопатологии стала таргетная пептид-рецепторная радионуклидная терапия (ПРРТ).

Одна из стратегий ПРРТ колоректального рака заключается в воздействии на сверхэк-

спрессирующий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). В качестве препарата может использоваться, например, бевацизумаб, представляющий собой моноклональное антитело, связывающееся с изоформами VEGF [5]. Противоопухолевый эффект бевацизумаба проявляется в противоангиогенном действии, изменении функциональности уже имеющихся в опухоли сосудов, а также непосредственном воздействии на VEGF-рецепторы опухолевых клеток [6]. Еще большим, чем бевацизумаб, сродством к VEGF обладает рекомбинантный белок афлиберцепт, представляющий собой внеклеточный домен VEGFR-1 и VEGFR-2 [7].

Другой стратегией ПРРТ является нацеливание на рецептор эпидермального фактора роста человека (EGFR), сверхэкспрессия кото-

рого наблюдается в 65–75 % случаев колоректального рака [8]. Для реализации данного подхода используется цетуксимаб – антитело, которое после конкурентного связывания с внешним доменом рецептора способствует интернализации и разрушению EGFR, что приводит к ингибированию роста клеток, снижению выработки матриксной металлопротеиназы и VEGF, а также к индукции апоптоза [9, 10].

Перспективной мишенью для ПРПТ колоректального рака может служить GRPR (gastrin-releasing peptide receptor), который является членом семейства рецепторов бомбезина. У млекопитающих, в частности у человека, GRPR экспрессируется в коре головного мозга, тканях желудка, поджелудочной железы и др. [11]. В норме GRPR обнаруживается в клетках гладкой мускулатуры кишечника и не обнаруживается в эпителиальных клетках толстой кишки. Однако во многих линиях рака толстой кишки наблюдается аномальная экспрессия GRPR [12, 13]. Кроме того, при раке толстой кишки сверхэкспрессия GRPR действует как аутокринный фактор роста [14].

В данной работе для ПРПТ колоректального рака мы предлагаем использовать молекулу BBN/C1-C2, созданную на основе бомбезина – короткого пептида, тропного к GRPR, и кноттина, который выступает в качестве каркаса для стабилизации молекулы.

Цель исследования. Обобщить имеющиеся на сегодняшний день данные, касающиеся участия дофамина в регуляции сердечно-сосудистой системы.

Материалы и методы. *Синтез BBN/C1-C2.* Пептид BBN/C1-C2 получали с помощью твердофазного синтеза на основе Fmoc-химии (все аминокислоты производства Intavis (Германия)) на пептидном синтезаторе ResPer SL (Intavis, Германия) по стандартному протоколу. В качестве активатора использовали HBTU («Кемикал Лайн», Россия). Анализ пептида проводили на хроматографе LC-20AD XR (Shimadzu, Япония) методом обращенно-фазовой хроматографии и на масс-спектрометре MALDI-TOF MS FLEX (Bruker Daltonics, Германия). Очистку проводили на хроматографе

AutoPure25 (Inscinstech, Китай) методом обращенно-фазовой хроматографии.

Клеточная культура и условия эксперимента. В экспериментах использовали клеточную культуру HCT-116 (рак толстого кишечника человека), которую содержали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Global Kang, Китай) и гентамицина. Пассажи проводили каждые 3–4 дня с использованием 0,25 % трипсина.

Перед экспериментом проводили пассаж в 24-луночные планшеты в концентрации 50 000 клеток на лунку. После достижения экспоненциальной стадии к культуре добавляли BBN/C1-C2 в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,1 % бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифического связывания и инкубировали 3 ч. После этого буфер заменяли на питательную среду и инкубировали. Для оценки апоптоза и некроза добавляли 20 мкМ пептида, результат фиксировали через 3 и 24 ч. Для анализа клеточного индекса добавляли 0,2, 2 и 20 мкМ BBN/C1-C2.

Флуоресцентная микроскопия. Уровни апоптоза и некроза оценивали с использованием флуоресцентных красителей Yo-Pro 1 (1 мкМ) и PI (1 мкМ), оптической системы Nikon Ti серии S (Nikon, Япония), камеры DS-Qi1MC и соответствующих фильтров. Фиксировали сигнал флуоресценции и обрабатывали информацию с использованием программы ImageJ. После этого получали данные в виде относительных флуоресцентных единиц (сигнал флуоресценции клеток за вычетом сигнала фона) [15].

Клеточный индекс. Анализ динамики адгезии клеток проводили с использованием клеточного анализатора xCellingence RTCA-S16 (ACEA Biosciences, США) [16]. Для этого культуру засеивали в 16-луночные планшеты, предварительно зафиксировав нулевую точку. В режиме реального времени фиксировали изменение клеточного индекса. Далее добавляли BBN/C1-C2, через 3 ч буфер заменяли на среду. Индекс фиксировали при всех манипуляциях.

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили три раза в

трех повторах. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента (апоптоз и некроз) и критерия Манна – Уитни (клеточный индекс). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. BBN/C1-C2 был получен с помощью твердофазного пептидного синтеза и очищен до 95 %. Далее его инкубировали с культурой НСТ-116 3 ч, измеряли динамику клеточного индекса и уровень апоптоза и некроза после 3 и 24 ч восстановления в питательной среде. Данный подход позволяет оценить способность пептида не только непо-

средственно вызывать гибель клеток, но и удерживаться на поверхности раковых клеток и обуславливать ингибирование целевого рецептора, что сказывается на динамике роста культуры в период восстановления.

При анализе клеточного индекса, который показывает динамику адгезии клеток как реакцию на внешнее воздействие, видно, что в первые 5 ч эффект BBN/C1-C2 носит дозозависимый характер (рис. 1). При этом действие BBN/C1-C2 в концентрации в 0,2 мкМ неотличимо от контрольных условий.

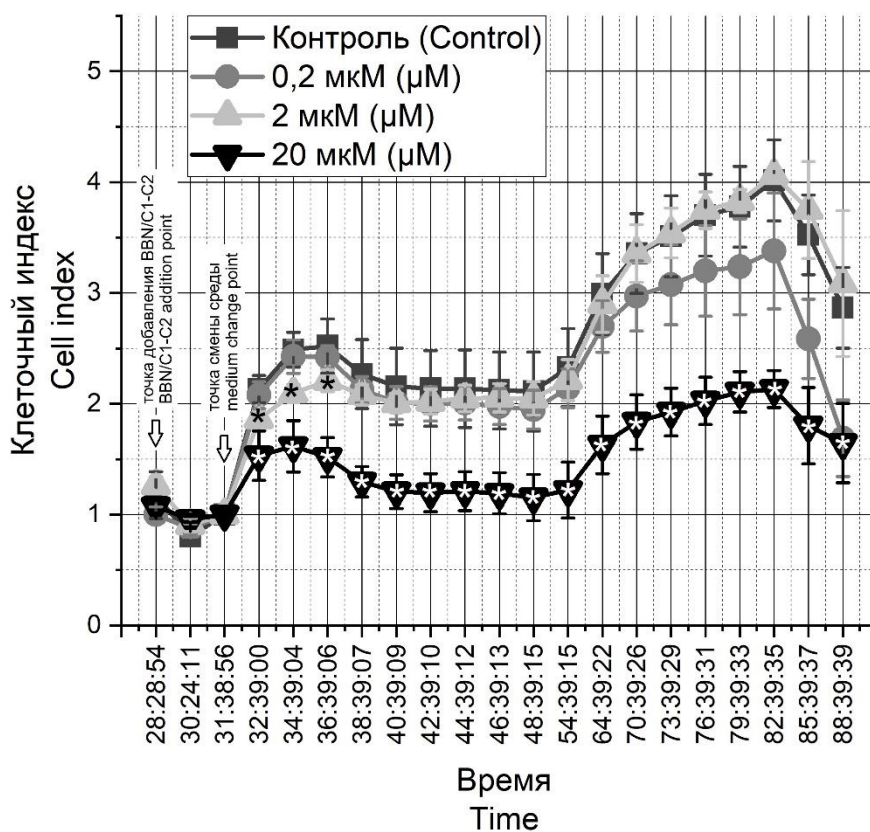


Рис. 1. Дозозависимое изменение клеточного индекса при добавлении к культуре НСТ-116 пептида (точка нормализации 31:38:56, * – достоверное отличие от контрольной группы)

Fig. 1. Dose-dependent change in the cell index while adding different concentrations of BBN/C1-C2 peptide to НСТ-116 culture (normalization point 31:38:56, * – the difference is significant compared with the control)

После воздействия пептида в концентрации 2 мкМ культура восстанавливается до контрольного уровня после 5 ч инкубации в среде. А в

концентрации 20 мкМ в это же время продолжает снижаться. Даже несмотря на то что культура постепенно начинает восстанавливаться,

клеточный индекс остается пониженным относительно контрольных условий, и со временем культура начинает погибать.

При анализе уровня клеточной гибели, сопровождающей изменение клеточного индекса, отмечается, что в первые 3 ч при инку-

бировании культуры в фосфатно-солевом буфере с добавлением бычьего сывороточного альбумина и 20 мкМ BBN/C1-C2 происходит незначительное развитие апоптоза (рис. 2А), при этом уровень некроза остается близким к контролю (рис. 2В).

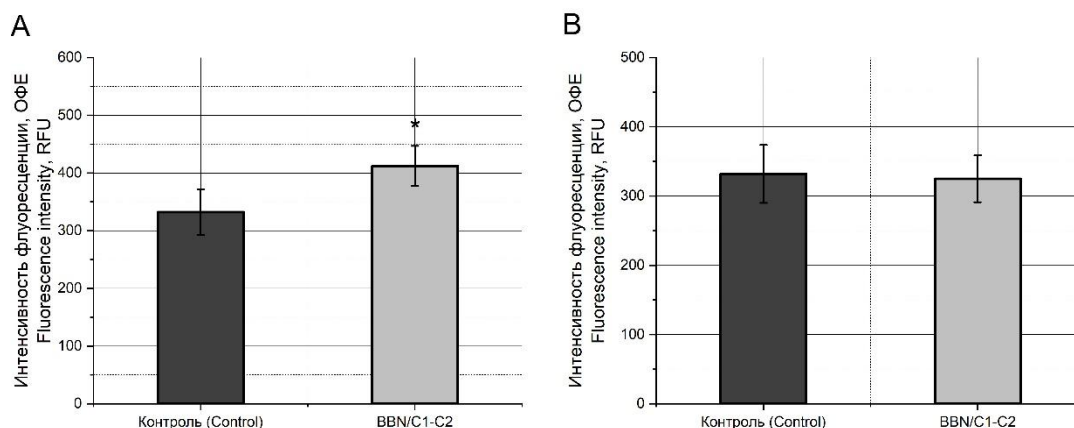


Рис. 2. Уровень апоптоза (А) и некроза (В) в культуре НСТ-116 при добавлении BBN/C1-C2 в концентрации 20 мкМ через 3 ч (* – достоверное отличие от контрольной группы)

Fig. 2. Levels of apoptosis (A) and necrosis (B) in HCT-116 culture three hours after adding BBN/C1-C2 peptide (concentration 20 μ M) (* – the difference is significant compared with the control)

Но через 24 ч после смены буфера с BBN/C1-C2 на питательную среду уровень апоптоза зна-

чительно возрастает (рис. 3А), при этом уровень некроза остается прежним (рис. 3В).

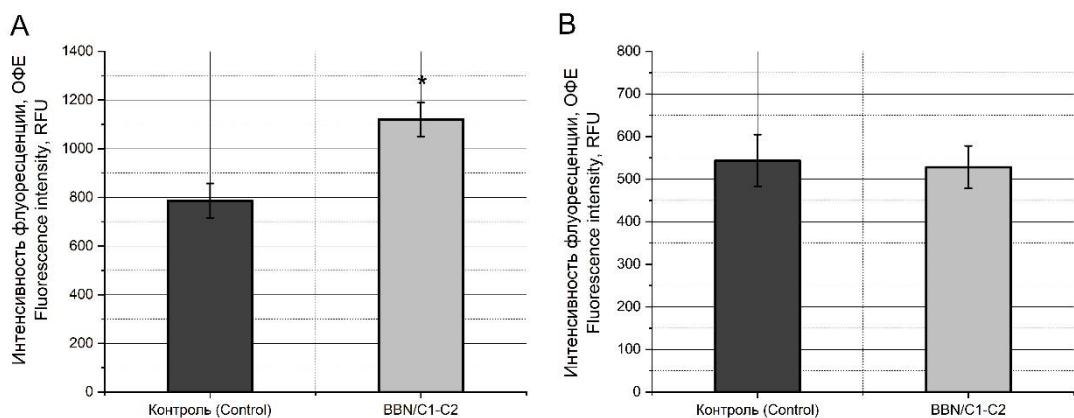


Рис. 3. Уровень апоптоза (А) и некроза (В) в культуре НСТ-116 при добавлении BBN/C1-C2 в концентрации 20 мкМ через 24 ч (* – достоверное отличие от контрольной группы)

Fig. 3. Levels of apoptosis (A) and necrosis (B) in HCT-116 culture twenty-four hours after adding BBN/C1-C2 peptide (concentration 20 μ M) (* – the difference is significant compared with the control)

Обсуждение. В последние десятилетия разработка радиофармпрепаратов на основе пептидов, нацеленных на бомбезиновые рецепторы, ведется достаточно успешно [17, 18]. Имеется ряд наблюдений, которые позволяют проводить дополнительные модификации пептидов для улучшения их свойств.

Так, в связи с тем, что качестве прототипов для создания радиофармпрепаратов используются пептиды, тропные к рецептору, в данном случае GRPR, эффект их может быть агонистическим, приводящим к биологическому отклику. В таком случае действие пептида на GRPR приведет к усилению трофики новообразования, что значимо скажется на развитии патологии. Ярким примером является агонист бомбезина AMBA (DOTA-Gly-4-аминобензоил-BBN(7–14)), применение которого показывает хорошую результативность при визуализации и терапии рака предстательной и молочной желез [19, 20]. Однако у пациентов, прошедших лечением AMBA, наблюдалось его значительное поглощение поджелудочной железой и желудочно-кишечным трактом [21]. Кроме того, исследование фазы I, проведенное у пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком простаты, было прекращено из-за серьезных побочных эффектов, вызванных активацией GRPR после инъекции терапевтических доз [22].

Использование антагонистов рецепторов также может значительно изменить ход лечения новообразований. Например, одна из модификаций PD176252, непептидного ингибитора GRPR, обеспечивает значительное снижение скорости роста линий клеток HGC-27 (желудок), HCT-116 (толстый кишечник), PC-3 (простата), A549 (легкие) [23]. Кроме того, RC-3940-II вызывает ингибирование

пролиферации клеточных линий рака толстой кишки человека HT-29, HCT-116 и HCT-15 *in vitro* и *in vivo* [24].

Нами предлагается создание антагониста на основе пептида бомбезина (агониста рецептора GRPR) с добавлением радиоизотопа, что приведет к развитию двойного эффекта: снижению пролиферации новообразования и гибели клеток в результате действия радиоактивности. BBN/C1-C2 был разработан на основе кноттина, содержащего в своем составе ингибиторный цистинный узел, и короткого пептида – бомбезина, помещенного между первым и вторым остатками цистеина. Подобная структура показывает значительное увеличение стабильности в различных условиях, а также дозозависимое снижение пролиферации линии клеток HCT-116. Динамике клеточного индекса в условиях сразу после инкубации с пептидом в трех концентрациях и в условиях восстановления в питательной среде в течении 24 ч после воздействия свидетельствует о том, что пептид в концентрации 20 мкМ значительно снижает значения индекса, что говорит о нарушении адгезии клеток и неспособности к дальнейшему восстановлению. Данные подтверждаются развитием апоптоза в питательной среде через 3 ч после инкубации с пептидом в той же концентрации и его усилением через 24 ч.

Заключение. Таким образом, молекула BBN/C12-C2, созданная на основе агониста GRPR, встроенного в молекулу кноттина, может рассматриваться в качестве прототипа для создания радиофармпрепарата для лечения новообразований толстого кишечника. Кроме того, повышенная стабильность созданной молекулы позволит ей в полном объеме достигать цели, что снизит нагрузку на организм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 123020700216 (FEUF-2023-0004)).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования: Саенко Ю.В., Фомин А.Н.

Литературный поиск, участие в исследовании, обработка материала: Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Сугак Д.Е.

Статистическая обработка данных: Белобородов Е.А.

Анализ и интерпретация данных: Юрова Е.В.

Написание и редактирование текста: Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Саенко Ю.В.

Литература

1. *Hossain M.S., Karuniawati H., Jairoun A.A., Urbi Z., Ooi J., John A., Lim Y.C., Kibria K.M.K., Mohiuddin A.K.M., Ming L.C., Goh K.W., Hadi M.A.* Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (7): 1732. DOI: 10.3390/cancers14071732.
2. *Safiejko K., Tarkowski R., Koselak M., Juchimiuk M., Tarasik A., Pruc M., Smereka J., Szarpak L.* Robotic-Assisted vs. Standard Laparoscopic Surgery for Rectal Cancer Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis of 19,731 Patients. *Cancers (Basel)*. 2021; 14 (1): 180. DOI: 10.3390/cancers14010180.
3. *Dawson H., Kirsch R., Messenger D., Driman D.* A Review of Current Challenges in Colorectal Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med*. 2019; 143 (7): 869–882. DOI: 10.5858/arpa.2017-0475-RA.
4. *Dallas N.A., Xia L., Fan F., Gray M.J., Gaur P., van Buren G. 2nd, Samuel S., Kim M.P., Lim S.J., Ellis L.M.* Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res*. 2009; 69 (5): 1951–1957. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2023.
5. *Da Silva W.C., de Araujo V.E., Lima E.M.E.A., Dos Santos J.B.R., Silva M.R.R.D., Almeida P.H.R.F., de Assis Acurcio F., Godman B., Kurdi A., Cherchiglia M.L., Andrade E.I.G.* Comparative Effectiveness and Safety of Monoclonal Antibodies (Bevacizumab, Cetuximab, and Panitumumab) in Combination with Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs*. 2018; 32 (6): 585–606. DOI: 10.1007/s40259-018-0322-1.
6. *Mooi J.K., Wirapati P., Asher R., Lee C.K., Savas P., Price T.J., Townsend A., Hardingham J., Buchanan D., Williams D., Tejpar S., Mariadason J.M., Tebbutt N.C.* The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann Oncol*. 2018; 29 (11): 2240–2246. DOI: 10.1093/annonc/mdy410.
7. *Tang P.A., Cohen S.J., Kollmannsberger C., Bjarnason G., Virik K., MacKenzie M.J., Lourenco L., Wang L., Chen A., Moore M.J.* Phase II clinical and pharmacokinetic study of aflibercept in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18 (21): 6023–6031. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3252.
8. *Khan K., Valeri N., Dearman C., Rao S., Watkins D., Starling N., Chau I., Cunningham D.* Targeting EGFR pathway in metastatic colorectal cancer- tumour heterogeneity and convergent evolution. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019; 143: 153–163. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2019.09.001.
9. *Mendelsohn J., Baselga J.* Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol*. 2006; 33 (4): 369–385. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2006.04.003.
10. *Khan A.Z., Morris-Stiff G., Makuuchi M.* Patterns of chemotherapy-induced hepatic injury and their implications for patients undergoing liver resection for colorectal liver metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009; 16 (2): 137–144. DOI: 10.1007/s00534-008-0016-z.
11. *Jensen R.T., Battey J.F., Spindel E.R., Benya R.V.* International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev*. 2008; 60 (1): 1–42. DOI: 10.1124/pr.107.07108.
12. *Sun H.L., Ma Q.Y., Bian H.G., Meng X.M., Jin J.* Novel insight on GRP/GRPR axis in diseases. *Biomed Pharmacother*. 2023; 161: 114497. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114497.
13. *Welton M. L., Mantyh C. R., Gates T. S., Popper P., Vigna S. R., Maggio J.E., Mantyh P.W.* Localization of Bombesin Receptors in the Human Gastrointestinal Tract Using Quantitative Receptor Autoradiography. *Pharmacology*. 1988; 547 (1): 468–470. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb23922.x>.
14. *Carroll R.E., Matkowskyj K.A., Chakrabarti S., McDonald T.J., Benya R.V.* Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated colon cancers in humans. *Am J Physiol*. 1999; 276 (3): G655-65. DOI: 10.1152/ajpgi.1999.276.3.G655.
15. *Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E.* Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proceedings of the SPIE*. 2019; 10861. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.2509529>.

16. Ke N., Wang X., Xu X., Abassi Y.A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol.* 2011; 740: 33–43. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6_6.
17. Ma Y., Gao F. Advances of radiolabeled GRPR ligands for PET/CT imaging of cancers. *Cancer Imaging.* 2024; 24 (1): 19. DOI: 10.1186/s40644-024-00658-y.
18. Kanellopoulos P., Mattsson A., Abouzayed A., Obeid K., Nock B.A., Tolmachev V., Maina T., Orlova A. Preclinical evaluation of new GRPR-antagonists with improved metabolic stability for radiotheranostic use in oncology. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2024; 9 (1): 13. DOI: 10.1186/s41181-024-00242-6.
19. Maddalena M.E., Fox J., Chen J., Feng W., Cagnolini A., Linder K.E., Tweedle M.F., Nunn A.D., Lantry L.E. ¹⁷⁷Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *J Nucl Med.* 2009; 50 (12): 2017–2024. DOI: 10.2967/jnumed.109.064444.
20. Wild D., Frischknecht M., Zhang H., Morgenstern A., Bruchertseifer F., Boisclair J., Provencher-Boliger A., Reubi J.C., Maecke H.R. Alpha- versus beta-particle radiopeptide therapy in a human prostate cancer model (213Bi-DOTA-PESIN and 213Bi-AMBA versus ¹⁷⁷Lu-DOTA-PESIN). *Cancer Res.* 2011; 71 (3): 1009–1018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1186.
21. Okarvi S.M., Jammaz I.A. Preparation and evaluation of bombesin peptide derivatives as potential tumor imaging agents: effects of structure and composition of amino acid sequence on in vitro and in vivo characteristics. *Nucl Med Biol.* 2012; 39 (6): 795–804. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.01.002.
22. Bodei L., Ferrari M., Nunn A., Llull J., Cremonesi M., Martano L., Laurora G., Scardino E., Tiberini S., Bufi G., Eaton S., Ottavio de Cobelli, Paganelli G. Lu-177-AMBA Bombesin Analogue in Hormone Refractory Prostate Cancer Patients: A Phase I Escalation Study with Single-Cycle Administrations. *Eur. J. Nucl. Med. Mol.* 2007; 34: 221–221.
23. Zhu Y., Wang H., Yu M., Li C., Meng X., He M., Yao R. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1, 3, 4-Oxadiazole PD176252 Analogues as Potential GRPR Inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022; 22 (17): 3009–3024. DOI: 10.2174/1871520622666220501162813.
24. Rick F.G., Buchholz S., Schally A.V., Szalontay L., Krishan A., Datz C., Stadlmayr A., Aigner E., Perez R., Seitz S., Block N.L., Hohla F. Combination of gastrin-releasing peptide antagonist with cytotoxic agents produces synergistic inhibition of growth of human experimental colon cancers. *Cell Cycle.* 2012; 11 (13): 2518–2525. DOI: 10.4161/cc.20900.

Поступила в редакцию 16.12.2024; принята 02.02.2025.

Авторский коллектив

Белобородов Евгений Алексеевич – научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

Юрова Елена Валерьевна – младший научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

Сугак Дмитрий Евгеньевич – младший научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

Фомин Александр Николаевич – кандидат технических наук, старший научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, проректор на научной работе, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: mr.fominan@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0826-1857>.

Саенко Юрий Владимирович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: saenko@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

Образец цитирования

Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Сугак Д.Е., Фомин А.Н., Саенко Ю.В. Антагонист бомбезиновых рецепторов BBN/C1-C2 в модели колоректального рака *in vitro*. Ульяновский медико-биологический журнал. 2025; 1: 114–123. DOI: 10.34014/2227-1848-2025-1-114-123.

BOMBESIN RECEPTOR ANTAGONIST BBN/C1-C2 IN AN IN VITRO MODEL FOR COLORECTAL CANCER

E.A. Beloborodov, E.V. Yurova, D.E. Sugak, A.N. Fomin, Yu.V. Saenko

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

Colorectal cancer is the third most common cancer and the second most fatal cancer worldwide. One of the strategies for colorectal cancer treatment is targeted peptide therapy that targets certain types of receptors overexpressed on the cell surface. A promising target is a bombesin receptor GRPR, which is abnormally expressed in colorectal cancer.

In this paper, we suggest to use BBN/C1-C2 molecule, created on the basis of bombesin, a peptide tropic to GRPR, and knottin, acting as a scaffold to stabilize a molecule, for colorectal cancer treatment. BBN/C1-C2 acts as a GRPR receptor antagonist, which determines BBN/C1-C2 role in the survival of cancer cells.

Objective: The aim of the paper is to study the effect of BBN/C1-C2 peptide on colorectal cancer cell survival.

Materials and Methods. The effect of BBN/C1-C2 peptide obtained by solid-phase synthesis on cancer cell survival was assessed in HCT-116 culture using fluorescence microscopy (apoptosis, necrosis) and a cell analyzer (cell adhesion dynamics) 3 and 24 hours after exposure.

Results: The BBN/C1-C2 peptide (concentrations from 0.2 to 20 μ M) was able not only to inhibit cell proliferation, but also to cause cell death (apoptosis) three hours after incubation.

Conclusion. BBN/C1-C2 molecule, created on the basis of a GRPR agonist built into a knottin molecule, can be considered as a prototype for a radiopharmaceutical to treat colon tumors.

Key words: colorectal cancer, bombesin, targeted therapy.

The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. 123020700216 (FEUF-2023-0004)).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Research concept and design: Saenko Yu.V., Fomin A.N.

Literature search, participation in the study, data processing: Beloborodov E.A., Yurova E.V., Sugak D.E.

Statistical data processing: Beloborodov E.A.

Data analysis and interpretation: Yurova E.V.

Text writing and editing: Beloborodov E.A., Yurova E.V., Saenko Yu.V.

References

1. Hossain M.S., Karuniawati H., Jairoun A.A., Urbi Z., Ooi J., John A., Lim Y.C., Kibria K.M.K., Mohiuddin A.K.M., Ming L.C., Goh K.W., Hadi M.A. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (7): 1732. DOI: 10.3390/cancers14071732.
2. Safiejko K., Tarkowski R., Koselak M., Juchimiuk M., Tarasik A., Pruc M., Smereka J., Szarpak L. Robotic-Assisted vs. Standard Laparoscopic Surgery for Rectal Cancer Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis of 19,731 Patients. *Cancers (Basel)*. 2021; 14 (1): 180. DOI: 10.3390/cancers14010180.

3. Dawson H., Kirsch R., Messenger D., Driman D. A Review of Current Challenges in Colorectal Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med.* 2019; 143 (7): 869–882. DOI: 10.5858/arpa.2017-0475-RA.
4. Dallas N.A., Xia L., Fan F., Gray M.J., Gaur P., van Buren G. 2nd, Samuel S., Kim M.P., Lim S.J., Ellis L.M. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009; 69 (5): 1951–1957. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2023.
5. Da Silva W.C., de Araujo V.E., Lima E.M.E.A., Dos Santos J.B.R., Silva M.R.R.D., Almeida P.H.R.F., de Assis Acurcio F., Godman B., Kurdi A., Cherchiglia M.L., Andrade E.I.G. Comparative Effectiveness and Safety of Monoclonal Antibodies (Bevacizumab, Cetuximab, and Panitumumab) in Combination with Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs.* 2018; 32 (6): 585–606. DOI: 10.1007/s40259-018-0322-1.
6. Mooi J.K., Wirapati P., Asher R., Lee C.K., Savas P., Price T.J., Townsend A., Hardingham J., Buchanan D., Williams D., Tejpar S., Mariadason J.M., Tebbutt N.C. The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann Oncol.* 2018; 29 (11): 2240–2246. DOI: 10.1093/annonc/mdy410.
7. Tang P.A., Cohen S.J., Kollmannsberger C., Bjarnason G., Virik K., MacKenzie M.J., Lourenco L., Wang L., Chen A., Moore M.J. Phase II clinical and pharmacokinetic study of aflibercept in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18 (21): 6023–6031. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3252.
8. Khan K., Valeri N., Dearman C., Rao S., Watkins D., Starling N., Chau I., Cunningham D. Targeting EGFR pathway in metastatic colorectal cancer- tumour heterogeneity and convergent evolution. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019; 143: 153–163. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2019.09.001.
9. Mendelsohn J., Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol.* 2006; 33 (4): 369–385. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2006.04.003.
10. Khan A.Z., Morris-Stiff G., Makuuchi M. Patterns of chemotherapy-induced hepatic injury and their implications for patients undergoing liver resection for colorectal liver metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009; 16 (2): 137–144. DOI: 10.1007/s00534-008-0016-z.
11. Jensen R.T., Batten J.F., Spindel E.R., Benya R.V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev.* 2008; 60 (1): 1–42. DOI: 10.1124/pr.107.07108.
12. Sun H.L., Ma Q.Y., Bian H.G., Meng X.M., Jin J. Novel insight on GRP/GRPR axis in diseases. *Biomed Pharmacother.* 2023; 161: 114497. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114497.
13. Welton M. L., Mantyh C. R., Gates T. S., Popper P., Vigna S. R., Maggio J.E., Mantyh P.W. Localization of Bombesin Receptors in the Human Gastrointestinal Tract Using Quantitative Receptor Autoradiography. *Pharmacology.* 1988; 547 (1): 468–470. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb23922.x>.
14. Carroll R.E., Matkowskyj K.A., Chakrabarti S., McDonald T.J., Benya R.V. Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated colon cancers in humans. *Am J Physiol.* 1999; 276 (3): G655-65. DOI: 10.1152/ajpgi.1999.276.3.G655.
15. Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E. Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proceedings of the SPIE.* 2019; 10861. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.2509529>.
16. Ke N., Wang X., Xu X., Abassi Y.A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol.* 2011; 740: 33–43. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6_6.
17. Ma Y., Gao F. Advances of radiolabeled GRPR ligands for PET/CT imaging of cancers. *Cancer Imaging.* 2024; 24 (1): 19. DOI: 10.1186/s40644-024-00658-y.
18. Kanellopoulos P., Mattsson A., Abouzayed A., Obeid K., Nock B.A., Tolmachev V., Maina T., Orlova A. Preclinical evaluation of new GRPR-antagonists with improved metabolic stability for radiotheranostic use in oncology. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2024; 9 (1): 13. DOI: 10.1186/s41181-024-00242-6.
19. Maddalena M.E., Fox J., Chen J., Feng W., Cagnolini A., Linder K.E., Tweedle M.F., Nunn A.D., Lantry L.E. ¹⁷⁷Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *J Nucl Med.* 2009; 50 (12): 2017–2024. DOI: 10.2967/jnumed.109.064444.

20. Wild D., Frischknecht M., Zhang H., Morgenstern A., Bruchertseifer F., Boisclair J., Provencher-Bolliger A., Reubi J.C., Maecke H.R. Alpha- versus beta-particle radiopeptide therapy in a human prostate cancer model (213Bi-DOTA-PESIN and 213Bi-AMBA versus 177Lu-DOTA-PESIN). *Cancer Res.* 2011; 71 (3): 1009–1018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1186.
21. Okarvi S.M., Jammaz I.A. Preparation and evaluation of bombesin peptide derivatives as potential tumor imaging agents: effects of structure and composition of amino acid sequence on in vitro and in vivo characteristics. *Nucl Med Biol.* 2012; 39 (6): 795–804. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.01.002.
22. Bodei L., Ferrari M., Nunn A., Llull J., Cremonesi M., Martano L., Laurora G., Scardino E., Tiberini S., Bufi G., Eaton S., Ottavio de Cobelli, Paganelli G. Lu-177-AMBA Bombesin Analogue in Hormone Refractory Prostate Cancer Patients: A Phase I Escalation Study with Single-Cycle Administrations. *Eur. J. Nucl. Med. Mol.* 2007; 34: 221–221.
23. Zhu Y., Wang H., Yu M., Li C., Meng X., He M., Yao R. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1, 3, 4-Oxadiazole PD176252 Analogues as Potential GRPR Inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022; 22 (17): 3009–3024. DOI: 10.2174/1871520622666220501162813.
24. Rick F.G., Buchholz S., Schally A.V., Szalontay L., Krishan A., Datz C., Stadlmayr A., Aigner E., Perez R., Seitz S., Block N.L., Hohla F. Combination of gastrin-releasing peptide antagonist with cytotoxic agents produces synergistic inhibition of growth of human experimental colon cancers. *Cell Cycle.* 2012; 11 (13): 2518–2525. DOI: 10.4161/cc.20900.

Received December 16, 2024; accepted February 02, 2025.

Information about the authors

Beloborodov Evgeniy Alekseevich, Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

Yurova Elena Valer'evna, Junior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

Sugak Dmitriy Evgen'evich, Junior Researcher S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

Fomin Aleksandr Nikolaevich, Candidate of Sciences (Engineering), Senior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Vice-Rector for Research, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: mr.fominan@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0826-1857>.

Saenko Yuriy Vladimirovich, Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: saenkoyv@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

For citation

Beloborodov E.A., Yurova E.V., Sugak D.E., Fomin A.N., Saenko Yu.V. Antagonist bombesinovykh retseptorov BBN/C1-C2 v modeli kolorektal'nogo raka in vitro [Bombesin receptor antagonist BBN/C1-C2 in an in vitro model for colorectal cancer]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal.* 2025; 1: 114–123. DOI: 10.34014/2227-1848-2025-1-114-123 (in Russian).