

ПРИРОДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГУАНИНА ОКАЗЫВАЮТ PARP-ИНГИБИТОРНОЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

© 2023 С.И. Шрам^{1*}, Т.А. Щербакова², Т.В. Абрамова³, Э.Ц. Барадиева¹, А.С. Ефремова⁴, М.С. Смирновская⁵, В.Н. Сильников³, В.К. Швядас^{2,6}, Д.К. Нилов^{2*}

¹ Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: shram-si.img@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119992 Москва, Россия; электронная почта: nilovdm@gmail.com

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН,
630090 Новосибирск, Россия

⁴ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, 115522 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.12.2022

После доработки 27.03.2023

Принята к публикации 27.03.2023

Ингибиторы поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARP) человека рассматриваются в качестве перспективных агентов для лечения сердечно-сосудистых, неврологических и других заболеваний, сопровождающихся воспалением и окислительным стрессом. Ранее была продемонстрирована способность природных соединений 7-метилгуанина (7mGua) и 8-гидрокси-7-метилгуанина (8h7mGua) подавлять активность рекомбинантного белка PARP. В представленной работе мы исследовали возможность PARP-ингибиторного и цитопротекторного действия 7mGua и 8h7mGua в отношении культур недифференцированных и дифференцированных кардиомиоцитов крысы H9c2. Установлено, что 7mGua и 8h7mGua быстро проникают в клетки и эффективно подавляют стимулированную H₂O₂ активацию PARP (IC₅₀ = 270 и 55 мкМ соответственно). Выраженное цитопротекторное действие 7mGua и 8h7mGua показано на клеточной модели окислительного стресса, причём 8h7mGua превзошёл по эффективности классический ингибитор PARP 3-аминобензамид. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки ингибиторов PARP на основе производных гуанина и их тестирования в отношении моделей ишемия-реперфузионного повреждения тканей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 7-метилгуанин, 8-гидрокси-7-метилгуанин, поли(ADP-рибозо)полимераза, ингибитор, кардиомиоциты, окислительный стресс, цитопротекторное действие.

DOI: 10.31857/S0320972523060064, EDN: EFCJHN

ВВЕДЕНИЕ

Природные соединения 7-метилгуанин (7mGua) и 8-гидрокси-7-метилгуанин (8h7mGua, рис. 1) являются метаболитами нуклеиновых кислот и в малом количестве обнаружены в

крови и моче человека [1–6]. 7mGua образуется при деградации ДНК и матричной РНК, а 8h7mGua является продуктом окисления 7mGua [7–10]. Ранее мы показали, что данные метаболиты ингибируют фермент поли(ADP-рибозо)полимеразу (PARP), взаимодействуя

Принятые сокращения: 3-AB – 3-аминобензамид; 7mGua – 7-метилгуанин; 8h7mGua – 8-гидрокси-7-метилгуанин; PAR – поли(ADP-рибоза); PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза.

* Адресат для корреспонденции.

с остатками глицина и тирозина на участке связывания субстрата NAD^+ . Ингибиторная способность была продемонстрирована в различных экспериментах с очищенным рекомбинантным ферментом, а также с помощью молекулярного моделирования [11–14].

PARP активируется при воздействии на клетку стрессовых факторов, вызывающих повреждение ДНК, и осуществляет синтез отрицательно заряженной поли(ADP-рибозы) (PAR), выполняющей сигнальные функции [15–19]. PARP играет важную роль в поддержании стабильности генома и регуляции экспрессии генов, однако её повышенная активность может иметь негативные последствия [20–22]. Так, при ишемии/реперфузии тканей наблюдается массивное повреждение ДНК, сопровождающееся сверхактивацией PARP. Это приводит к резкому падению уровня NAD^+ и АТФ, индукции экспрессии провоспалительных генов и запуску механизмов клеточной гибели [23–26].

Синтетические ингибиторы PARP олапариб, рукапариб и нирапариб применяются для подавления репарации ДНК в терапии онкологических заболеваний [27–29], однако область возможного применения ингибиторов PARP гораздо шире. Известно, что PARP вовлечена в механизмы клеточной гибели при заболеваниях сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, дыхательной и других систем орга-

низма [30–34]. Патогенез этих заболеваний, как правило, связан с развитием острого или хронического окислительного стресса и воспаления. На различных моделях *in vivo* продемонстрировано терапевтическое действие ингибиторов PARP при ишемии-реперфузионном повреждении тканей, при осложнениях сахарного диабета, травмах головного мозга, артритах, воспалительных заболеваниях кишечника и септическом шоке [35–37].

Широкое использование синтетических ингибиторов PARP затруднено ввиду вызываемых ими серьёзных побочных эффектов [38–40], поэтому в данном контексте значительный интерес могут представлять природные соединения, такие как 7mGua и 8h7mGua. В частности, проведённое нами токсикологическое исследование 7mGua продемонстрировало его безопасность при пероральном введении мышам в дозе 50 мг/кг, а также отсутствие канцерогенного действия в ряде доклинических тестов [41]. В представленной работе впервые изучены PARP-ингибиторные и цитопротекторные свойства природных пуринов 7mGua и 8h7mGua на клеточной модели повреждения кардиомиоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ингибиторы PARP 3-аминобензамид (3-AB) и 7mGua, приобретённые в компании «Sigma-Aldrich» (США), а также 8h7mGua, который синтезировали по описанной ранее методике [13]. Также использовали среды и реагенты для культивирования клеток («ПанЭко», Россия), эмбриональную сыворотку телёнка («HyClone», США), трансретиную кислоту («ICN», США), флуоресцентные красители Хёхст 33258 («Sigma-Aldrich»), Кальцеин АМ и Гомодимер этидия III («Biotium», США). Кардиомиобласты эмбриона крысы H9c2 были получены из коллекции клеточных культур ATCC («LGC Standards», Великобритания).

Клетки H9c2 культивировали в среде DMEM, содержащей эмбриональную сыворотку телёнка (10%, v/v), L-глутамин (2 мМ) и смесь антибиотиков пенициллин/стрептомицин, при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 . При проведении исследований на недифференцированных кардиомиобластах культуры растили в течение 24–48 ч в среде с 10% сыворотки. В экспериментах с дифференцированными клетками культуры растили 48 ч в среде с 10% сыворотки, а затем 72 ч в среде, содержащей 1% (v/v) сыворотки и транс-ретиную кислоту (45 нг/мл),

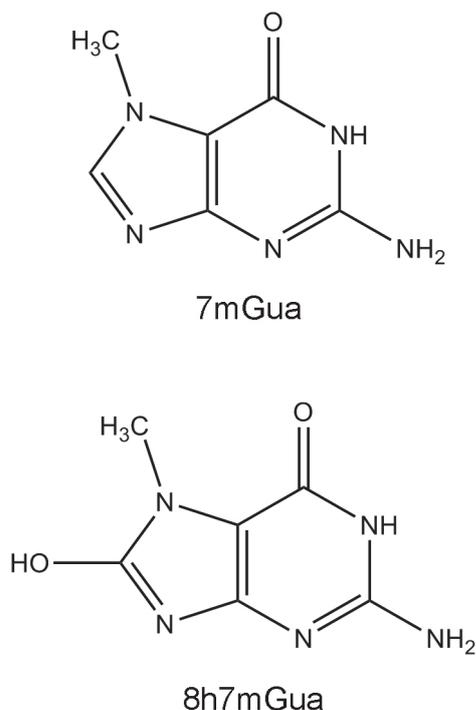


Рис. 1. Химические структуры природных пуринов 7mGua и 8h7mGua

для стимуляции дифференцировки в миоциты. Все эксперименты с клеточными культурами проводили в 4- или 24-луночных пластиковых планшетах («SPL», Республика Корея), поверхность которых предварительно покрывали желатином.

Анализ степени ингибирования PARP исследуемыми веществами в живых клетках проводили по описанной ранее методике [42]. Клетки H9c2 (недифференцированные или дифференцированные) преинкубировали с исследуемым веществом в течение определённого времени в среде DMEM с 1% сыворотки, затем вносили H₂O₂ до конечной концентрации 1 мМ, и через 5 или 10 мин клетки фиксировали охлаждённым до 0 °С метанолом. Содержание PAR в клетках определяли иммунофлуоресцентным анализом с использованием первичных моноклональных антител к PAR (клон 10-H) («Santa Cruz Biotech», США) и вторичных антител, конъюгированных с Alexa 488 («Abcam», Великобритания). Ядра клеток контрастировали Хёхстом 33258. Для детектирования сердечного тропонина Т использовали антитела, конъюгированные с Alexa 555 («Хайтест», Россия).

Для анализа цитопротекторного действия веществ в условиях острого окислительного стресса клетки H9c2 (недифференцированные или дифференцированные) преинкубировали с тестируемым веществом в среде DMEM с 1% сыворотки в течение 1 ч, затем вносили H₂O₂ до конечной концентрации 1 мМ и помещали в CO₂-инкубатор. Через 30 мин клетки отмывали от H₂O₂ и продолжали инкубировать в среде с тестируемым веществом ещё 24 ч, после чего производили прижизненное окрашивание клеток Гомодимером этидия III, Кальцеином AM и Хёхстом 33258.

Во всех экспериментах получали и анализировали образцы из 3–5 независимо выращенных культур. При определении остаточной активности PARP анализировали 400–800 ядер в 4–5 случайно выбранных полях лунки планшета (объектив 4×), а при определении плотности культуры и конфлюентности — от 40 до 80% общей площади лунки (объектив 2,5×). При проведении попарного сравнения использовали *t*-критерий Стьюдента, а в случае множественного сравнения — однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный анализ Бонферрони. Полученные количественные данные представлены в виде «среднее значение ± стандартное отклонение».

Анализ интенсивности флуоресценции в препаратах живых и фиксированных клеток проводили с использованием имиджера Lion-

Heart FX («Biotek», США) и конфокального микроскопа LSM 900 («Carl Zeiss», Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot («Systat Software Inc.», США) и Statistica («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на культурах как недифференцированных, так и дифференцированных клеток — кардиомиоцитов и кардиомиоцитов крысы H9c2 (рис. 2). В процессе дифференцировки клеток H9c2 наблюдали образование многоядерных синцитий-подобных структур (рис. 2, *з*) и увеличение уровня тканеспецифического маркерного белка тропонина Т (рис. 2, *е*). Проведённые предварительные исследования не выявили какого-либо влияния длительной инкубации (120 ч) с 7mGua или 8h7mGua в концентрации 300 мкМ на морфологию и показатели жизнеспособности клеток (рис. S1, рис. S2, таблица S1 Приложения), что свидетельствует о низкой цитотоксичности данных соединений.

Исследование на недифференцированных клетках H9c2 показало, что 7mGua и 8h7mGua подавляют активность PARP, но 8h7mGua обладает более выраженным действием, сопоставимым с классическим ингибитором PARP 3-AB (рис. 3). В концентрации 450 мкМ 8h7mGua практически полностью подавляет ферментативную активность, в то время как 7mGua — примерно на 70% (рис. 3, *в*). Анализ дозовых зависимостей также демонстрирует более высокую эффективность 8h7mGua в сравнении с 7mGua: расчётные значения IC₅₀ для этих соединений оказались равными 55 и 270 мкМ соответственно (рис. 3, *з*). Полученные данные хорошо согласуются с результатами экспериментов с рекомбинантной PARP человека [13], в которых 7mGua и 8h7mGua проявляли ингибиторное действие в диапазоне концентраций 10⁻⁵–10⁻⁴ М, и значения IC₅₀ для 8h7mGua были в среднем в 4 раза ниже значений для 7mGua.

В аналогичном исследовании на дифференцированных клетках H9c2 показано, что эффективность PARP-ингибиторного действия 8h7mGua близка к наблюдаемой с недифференцированными клетками: расчётное значение IC₅₀ оказалось равным 43 мкМ (рис. 4). Можно предположить, что рассматриваемые варианты фенотипа клеток H9c2 существенно не отличаются как по внутриклеточной концентрации NAD⁺, так и по проницаемости плазматической мембраны для 8h7mGua.

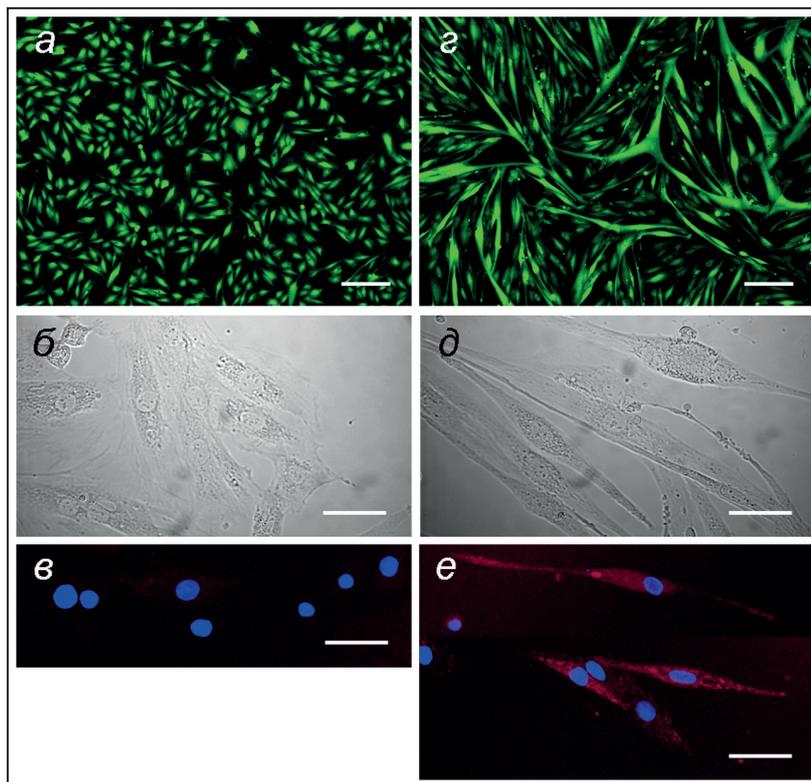


Рис. 2. Изменение морфологии и экспрессии сердечного маркера при дифференцировке клеток H9c2. *а–в* – Культуры недифференцированных клеток. *з–е* – Культуры дифференцированных клеток. *а, з* – Клетки после прижизненного окрашивания Кальцеином АМ (зелёный цвет). *б, д* – Морфология клеток при съёмке в режиме светлого поля. *в, е* – Иммунофлуоресцентный анализ сердечного тропонина Т (красный цвет). Длина масштабной планки соответствует 250 мкм (*а, з*) или 50 мкм (*б, в, д, е*)

При сравнении 1- и 4-часовой преинкубации клеток H9c2 с производными гуанина не было выявлено существенных различий в ингибировании PARP (рис. 3, *в*). Однако при более детальном исследовании было обнаружено наличие чёткой и хорошо воспроизводимой зависимости степени ингибирования PARP от времени преинкубации с 7mGua в интервале 0,5–4 ч (рис. 5, *а* и *б*). В диапазоне времени 0,5–3 ч наблюдали некоторое снижение степени ингибирования PARP, а при увеличении времени преинкубации до 4 ч – небольшое усиление ингибирования. Наблюдаемый вид зависимости может быть обусловлен такими факторами, как наличие механизмов обратного транспорта 7mGua (ослабление действия) и превращение 7mGua в более активный метаболит 8h7mGua (усиление действия). Полученные данные также указывают на то, что 7mGua достаточно быстро проникает в клетку и выходит из неё. Эксперимент с отмывкой клеток от 7mGua показал, что для полного его удаления из клетки достаточно не более 10 мин (рис. 5, *в*). Полное восстановление активности PARP в клетках после их отмывки от 7mGua указывает на обратимый характер ингибирования данным соединением. Аналогичные

данные были получены и для классического ингибитора PARP 3-AB (рис. 5, *з*).

Для моделирования острого окислительного стресса культуры клеток H9c2 подвергали 30-минутной инкубации в среде с H_2O_2 (1 мМ) и через 24 ч оценивали показатели, характеризующие степень повреждения клеток (рис. S3 Приложения). При этом предварительно было установлено, что PARP-ингибиторный эффект 7mGua, 8h7mGua и 3-AB на клетки сохраняется вплоть до 24 ч после их однократного внесения в среду (таблица S2 Приложения). В исследовании на культуре недифференцированных клеток H9c2 после воздействия H_2O_2 наблюдали катастрофическое снижение числа живых клеток (таблица). Внесение в среду культивирования 7mGua и 8h7mGua в концентрации 300 мкМ приводило к значительному увеличению числа выживших клеток. Оказалось, что наиболее сильным цитопротекторным действием обладает 8h7mGua (увеличение числа живых клеток более чем в 3 раза). Интересно, что 3-AB, взятый в концентрации 1000 мкМ, обеспечивающей полное подавление активности PARP, уступает по эффективности цитопротекторного действия 8h7mGua и соизмерим с 7mGua (таблица). Можно предположить, что

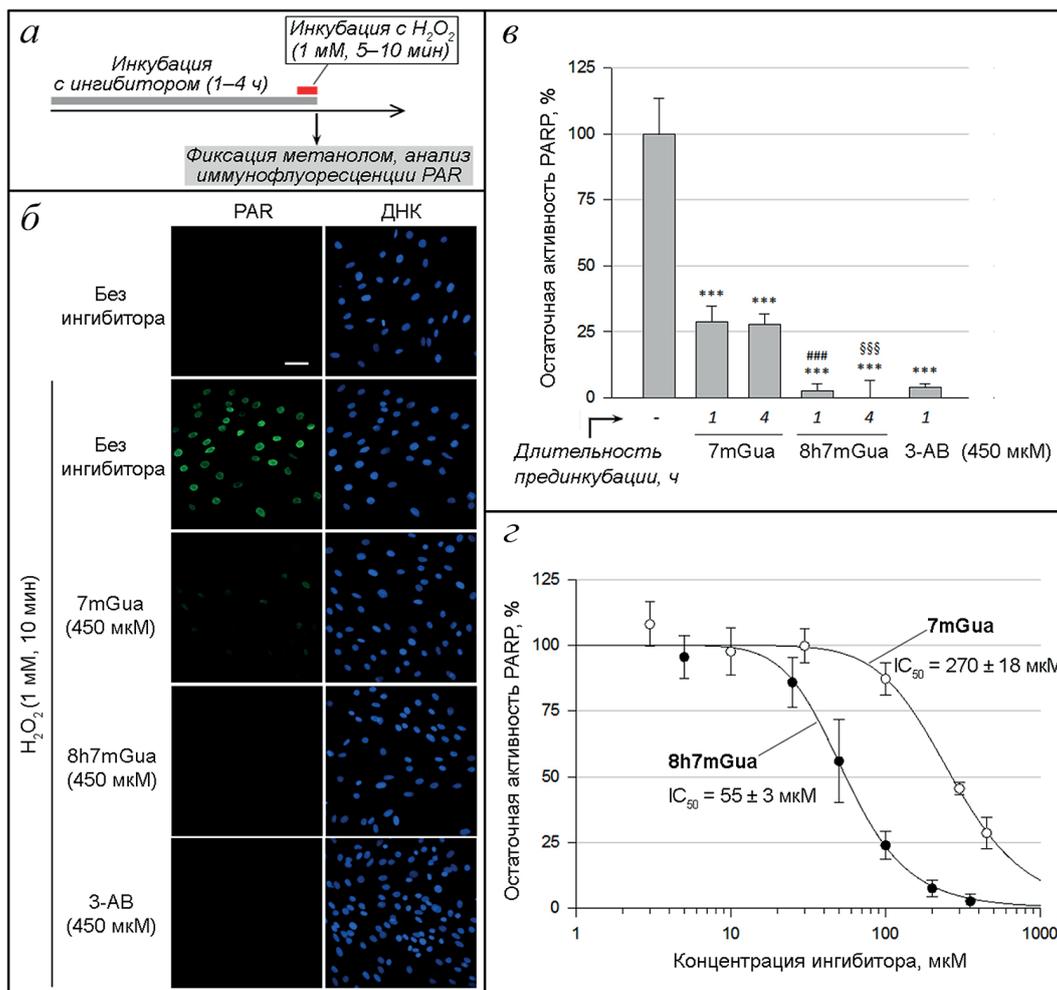
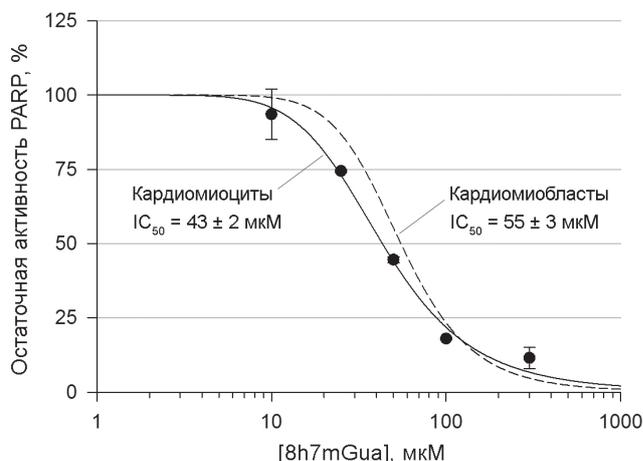


Рис. 3. Ингибирование PARP в присутствии 7mGua и 8h7mGua в недифференцированных клетках H9c2. *а* – Схема эксперимента. *б* – Выборочные микрофлуоресцентные снимки, полученные в ходе анализа. В качестве положительного контроля использован 3-AB. Длина масштабной планки соответствует 50 мкм. *в* – PARP-Ингибиторное действие 7mGua и 8h7mGua (длительность преинкубации клеток с веществами – 1 ч; инкубация с 1 мМ H₂O₂ – 5 мин). *** *p* < 0,001 относительно контроля (инкубация без тестируемых веществ). ### *p* < 0,001 относительно 1-часовой преинкубации клеток с 7mGua. \$\$\$ *p* < 0,001 относительно 4-часовой преинкубации клеток с 7mGua

в данной модели действие производных гуанина обусловлено, наряду с ингибированием PARP, некоторыми дополнительными механизмами.

Дифференцированные клетки оказались более устойчивыми к повреждающему воздействию H₂O₂ по сравнению с недифференцированными, однако и в данном случае 7mGua и 8h7mGua увеличивали выживаемость клеток. При этом производные гуанина и 3-AB демонстрировали соизмеримое цитопротекторное действие (таблица). В культуре дифференцированных клеток невозможно произвести морфометрический анализ ввиду слияния клеток и многоядерности (см. рис. 2, з), поэтому в качестве количественного показателя для оценки выживаемости использовали конфлюентность – степень покрытия поверхности роста живыми клетками.



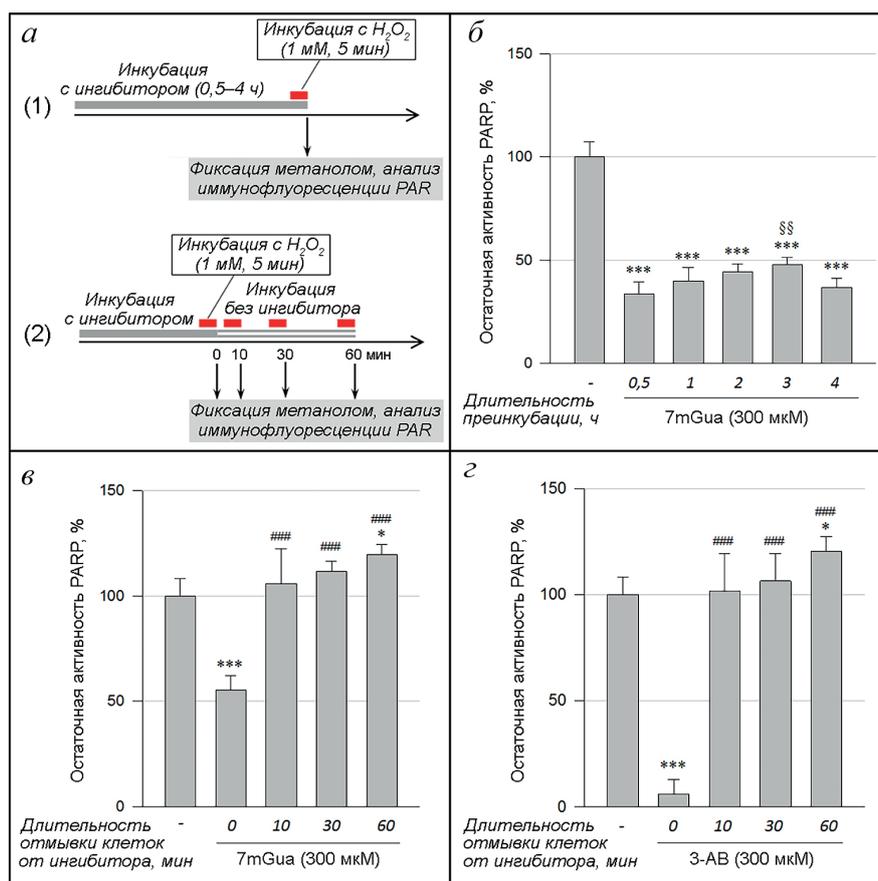


Рис. 5. Динамика PARP-ингибиторного действия 7mGua в недифференцированных клетках H9c2 при его внесении и удалении из среды культивирования. *а* – Схема экспериментов. *б* – Влияние длительности преинкубации клеток с 7mGua на степень ингибирования PARP. *в, г* – Восстановление активности PARP в клетках после отмытки от 7mGua и 3-AB; клетки предварительно выдерживали в среде с ингибиторами в течение 1 ч. * $p < 0,05$ относительно контроля. *** $p < 0,001$ относительно контроля. §§ $p < 0,01$ относительно длительности преинкубации 0,5 ч. ### $p < 0,001$ относительно клеток без отмытки от ингибиторов (длительность отмытки 0 мин)

Влияние 7mGua и 8h7mGua на выживаемость клеток H9c2 в модели сильного окислительного стресса, вызванного воздействием H₂O₂

Тестируемое вещество	H ₂ O ₂	Содержание живых клеток в культуре			
		Недифференцированные клетки		Дифференцированные клетки	
		N/см ²	<i>p</i> *	Конфлюентность, %	<i>p</i> *
– (Контроль 1)	–	13 204 ± 1862	< 0,001	81,3 ± 2,0	< 0,001
– (Контроль 2)	+	240 ± 55	–	47,4 ± 2,2	–
7mGua (300 мкМ)	+	617 ± 193	0,003	52,5 ± 1,8	0,003
8h7mGua (300 мкМ)	+	807 ± 159	< 0,001	57,7 ± 2,3	< 0,001
3-AB (1000 мкМ)	+	660 ± 182	0,002	56,1 ± 1,8	< 0,001

* Значения *p* относительно контроля 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было установлено, что 7mGua и его метаболит 8h7mGua конкурентно ингибируют рекомбинантную PARP человека (изо-

форма 1), причём более сильным ингибитором является 8h7mGua [13]. Хотя было известно о наличии PARP-ингибиторной активности у некоторых пуринов (преимущественно у метилированных производных ксантина) [43, 44],

мы показали, что 7mGua существенно превосходит по активности ближайший аналог 7-метилксантин [11].

Поскольку PARP имеет чёткую ядерную локализацию, её эффективные ингибиторы должны проникать через плазматическую мембрану и диффундировать в ядро, не подвергаясь при этом превращению в неактивные метаболиты. В представленной работе мы попытались выяснить, способны ли 7mGua и 8h7mGua подавлять активность PARP в живых клетках и проявлять цитопротекторные эффекты, свойственные ингибиторам PARP. В качестве объекта исследований была выбрана линия кардиомиобластов крысы H9c2. Особенностью данных клеток является возможность дифференцировки в кардиомиоцитоподобный фенотип. Дифференцированные клетки H9c2 по многим морфологическим, биохимическим и функциональным характеристикам сходны с кардиомиоцитами миокарда, хотя и не тождественны им (в частности, отсутствует способность к сокращению) [45–47].

Для оценки ингибиторного действия производных гуанина использовали предложенный ранее протокол, основанный на иммунофлуоресцентном анализе PAR после кратковременной обработки клеток высокими дозами H_2O_2 [42]. Пероксид водорода быстро проникает в клетку и при взаимодействии с Fe^{2+} превращается в гидроксильный радикал, способный вызывать повреждения ДНК (в частности, одноцепочечные разрывы, с которыми связывается PARP). Это приводит к быстрой активации PARP и синтезу PAR из клеточного NAD^+ .

В результате было подтверждено ингибиторное действие 7mGua и 8h7mGua на клеточном уровне, а также обнаружена сложная зависимость степени ингибирования PARP от времени преинкубации, которая может быть обусловлена сочетанием процессов обратного транспорта и превращением 7mGua в более сильный ингибитор 8h7mGua. Известно, что частичное превращение 7mGua в 8h7mGua происходит под действием фермента ксантиноксидазы [10]. Вопросы транспорта 7mGua через плазматическую мембрану пока не изучались. В качестве возможных механизмов, наряду с пассивной диффузией, следует рассматривать белок-опосредованный транспорт с участием транспортёров нуклеозидов и азотистых оснований [48–50].

Патогенез заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, дыхательной и других систем сопряжён с активацией PARP, причём как сильной и транзиторной (например, при ишемия-реперфузионном повреждении

тканей), так и умеренной и перманентной (например, при осложнениях сахарного диабета). Ингибиторы PARP способны оказывать цитопротекторное действие на животных и клеточных моделях таких заболеваний [33, 37, 51–53]. Для оценки цитопротекторной активности производных гуанина мы рассмотрели модель повреждения кардиомиоцитов в условиях острого окислительного стресса, имеющую отношение к ишемия-реперфузионному повреждению миокарда. Полученные данные свидетельствуют о способности 7mGua и 8h7mGua предотвращать гибель клеток при повреждающем воздействии. Интересно, что по наблюдаемому цитопротекторному эффекту 8h7mGua превосходит классический ингибитор PARP 3-AB, что может свидетельствовать о влиянии производных гуанина на дополнительные белковые мишени [54].

Таким образом, впервые на клеточном уровне исследованы PARP-ингибиторные и цитопротекторные свойства производных гуанина 7mGua и 8h7mGua. Эксперименты проведены на культурах недифференцированных и дифференцированных клеток линии H9c2. Показано, что оба соединения подавляют стимулированную H_2O_2 активацию PARP в клетке в диапазоне 10^{-5} – 10^{-4} М. При этом 8h7mGua оказался в несколько раз более эффективным ингибитором по сравнению с 7mGua. При моделировании острого окислительного стресса, индуцированного 30-минутной обработкой клеток H_2O_2 , 8h7mGua в концентрации 300 мкМ продемонстрировал цитопротекторное действие, превосходящее по эффективности классический ингибитор PARP 3-AB. Полученные данные свидетельствуют о возможности разработки новых лекарственных препаратов на основе 8h7mGua и других производных гуанина для лечения заболеваний, ассоциированных с воспалением, окислительным стрессом и повышенной активностью PARP.

Вклад авторов. С.И. Шрам и Д.К. Нилов – концепция и руководство работой, написание текста; С.И. Шрам, Т.А. Щербакова, Т.В. Абрамова, Э.Ц. Барадиева, А.С. Ефремова, М.С. Смирновская – проведение экспериментов; В.Н. Сильников и В.К. Швядас – обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-08-01161 А) за исключением указанных далее работ. Синтез 8-гидрокси-7-метилгуа-

нина выполнен при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10072).

Благодарности. В работе использовано оборудование ЦКП «Центр клеточных и генных технологий» (НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ).

Конфликт интересов. Д.К. Нилов, С.И. Шрам, Т.А. Щербакова и В.К. Швядас являются авторами патентов на использование производ-

ных гуанина для подавления ферментативной активности PARP.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. I. Separation and identification, *J. Biol. Chem.*, **224**, 407-422, doi: 10.1016/S0021-9258(18)65040-9.
- Weissmann, B., Bromberg, P. A., and Gutman, A. B. (1957) The purine bases of human urine. II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation, *J. Biol. Chem.*, **224**, 423-434, doi: 10.1016/S0021-9258(18)65041-0.
- Weissmann, B., and Gutman, A. B. (1957) The identification of 6-succinoaminopurine and of 8-hydroxy-7-methylguanine as normal human urinary constituents, *J. Biol. Chem.*, **229**, 239-250, doi: 10.1016/S0021-9258(18)70612-1.
- Topp, H., Sander, G., Heller-Schöch, G., and Schöch, G. (1987) Determination of 7-methylguanine, *N*²,*N*²-dimethylguanosine, and pseudouridine in ultrafiltrated serum of healthy adults by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, **161**, 49-56, doi: 10.1016/0003-2697(87)90650-6.
- Svoboda, P., and Kasai, H. (2004) Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents, *Anal. Biochem.*, **334**, 239-250, doi: 10.1016/j.ab.2004.08.021.
- Račkowska, E., Bobrowska-Korczak, B., and Giebułtowiec, J. (2019) Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for determination of methylated nucleosides and nucleobases in urine, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1128**, 121775, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121775.
- Sander, G., Hülsemann, J., Topp, H., Heller-Schöch, G., and Schöch, G. (1986) Protein and RNA turnover in preterm infants and adults: a comparison based on urinary excretion of 3-methylhistidine and of modified one-way RNA catabolites, *Ann. Nutr. Metab.*, **30**, 137-142, doi: 10.1159/000177186.
- Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., Takahashi, K., Miyamoto, T., Kato, N., and Kasai, H. (2009) Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine, *Cancer Sci.*, **100**, 715-721, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01088.x.
- Litwack, M. D., and Weissmann, B. (1966) Source of urinary 8-hydroxy-7-methylguanine in man, *Biochemistry*, **5**, 3007-3012, doi: 10.1021/bi00873a033.
- Skupp, S., and Ayvazian, J. H. (1969) Oxidation of 7-methylguanine by human xanthine oxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 909-916.
- Нилов Д. К., Тараров В. И., Куликов А. В., Захаренко А. Л., Гушина И. В., Михайлов С. Н., Лаврик О. И., Швядас В. К. (2016) Ингибирование поли(ADP-рибозо)полимеразы метаболитом нуклеиновых кислот 7-метилгуанином, *Acta Naturae*, **8**, 120-128, doi: 10.32607/20758251-2016-8-2-108-115.
- Nilov, D., Maluchenko, N., Kurgina, T., Pushkarev, S., Lys, A., Kutuzov, M., Gerasimova, N., Feofanov, A., Švedas, V., Lavrik, O., and Studitsky, V. M. (2020) Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2159, doi: 10.3390/ijms21062159.
- 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. (2022) Ингибиторное действие 7-метилгуанина и его метаболита 8-гидрокси-7-метилгуанина на поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 человека, *Биохимия*, **87**, 794-803, doi: 10.31857/S0320972522060070.
- Manasaryan, G., Suplatov, D., Pushkarev, S., Drobot, V., Kuimov, A., Švedas, V., and Nilov, D. (2021) Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in poly(ADP-ribose) polymerase family proteins, *Cancers (Basel)*, **13**, 1201, doi: 10.3390/cancers13061201.
- Шиловский Г. А., Хохлов А. Н., Шрам С. И. (2013) Система поли(ADP-рибозил)ирования белков: роль в поддержании стабильности генома и детерминации продолжительности жизни, *Биохимия*, **78**, 473-487.
- Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W. L. (2017) PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes, *Genes Dev.*, **31**, 101-126, doi: 10.1101/gad.291518.116.
- Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and

- regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827, doi: 10.1093/nar/gkz120.
18. Kamaletdinova, T., Fanaei-Kahrani, Z., and Wang, Z. Q. (2019) The enigmatic function of PARP1: from PARylation activity to PAR readers, *Cells*, **8**, 1625, doi: 10.3390/cells8121625.
 19. Нилов Д. К., Пушкарев С. В., Гущина И. В., Манасарян Г. А., Кирсанов К. И., Швядас В. К. (2020) Моделирование фермент-субстратных комплексов поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 человека, *Биохимия*, **85**, 116-125, doi: 10.31857/S0320972520010091.
 20. Narne, P., Pandey, V., Simhadri, P. K., and Phanithi, P. B. (2017) Poly(ADP-ribose)polymerase-1 hyperactivation in neurodegenerative diseases: the death knell tolls for neurons, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **63**, 154-166, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.11.007.
 21. Ke, Y., Wang, C., Zhang, J., Zhong, X., Wang, R., Zeng, X., and Ba, X. (2019) The role of PARPs in inflammation-and metabolic-related diseases: molecular mechanisms and beyond, *Cells*, **8**, 1047, doi: 10.3390/cells8091047.
 22. Curtin, N. J., and Szabo, C. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 711-736, doi: 10.1038/s41573-020-0076-6.
 23. Szabó, G., Liaudet, L., Hagl, S., and Szabó, C. (2004) Poly(ADP-ribose) polymerase activation in the reperfused myocardium, *Cardiovasc. Res.*, **61**, 471-480, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.029.
 24. Woolley, S. M., Farivar, A. S., Naidu, B. V., Salzman, A., Szabo, C., Thomas, R., Fraga, C., and Mulligan, M. S. (2004) Role of poly (ADP) ribose synthetase in lung ischemia-reperfusion injury, *J. Heart Lung Transplant.*, **23**, 1290-1296, doi: 10.1016/j.healun.2003.08.036.
 25. Van Wijk, S. J., and Hageman, G. J. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 81-90, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.021.
 26. Fujikawa, D. G. (2015) The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **13**, 212-221, doi: 10.1016/j.csbj.2015.03.004.
 27. Frampton, J. E. (2015) Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer, *BioDrugs*, **29**, 143-150, doi: 10.1007/s40259-015-0125-6.
 28. Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., Sapino, A., and Valabrega, G. (2018) PARP inhibitors in ovarian cancer, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **13**, 392-410, doi: 10.2174/1574892813666180305165256.
 29. Zimmer, A. S., Gillard, M., Lipkowitz, S., and Lee, J. M. (2018) Update on PARP inhibitors in breast cancer, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **19**, 21, doi: 10.1007/s11864-018-0540-2.
 30. Virág, L., Robaszekiewicz, A., Rodriguez-Vargas, J. M., and Oliver, F. J. (2013) Poly(ADP-ribose) signaling in cell death, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1153-1167, doi: 10.1016/j.mam.2013.01.007.
 31. Curtin, N. J., and Szabo, C. (2013) Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1217-1256, doi: 10.1016/j.mam.2013.01.006.
 32. Henning, R. J., Bourgeois, M., and Harbison, R. D. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: Mechanisms of action and role in cardiovascular disorders, *Cardiovasc. Toxicol.*, **18**, 493-506, doi: 10.1007/s12012-018-9462-2.
 33. Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Bürkle, A., Chiarugi, A., Clark, R. S., Curtin, N. J., Cuzzocrea, S., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Haskó, G., Liaudet, L., Moroni, F., Pacher, P., Radermacher, P., Salzman, A. L., Snyder, S. H., Soriano, F. G., Strosznajder, R. P., Sümegi, B., Swanson, R. A., and Szabo, C. (2018) Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 192-222, doi: 10.1111/bph.13748.
 34. Liu, S., Luo, W., and Wang, Y. (2022) Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke, *J. Neurochem.*, **160**, 74-87, doi: 10.1111/jnc.15464.
 35. Pacher, P., and Szabó, C. (2007) Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors, *Cardiovasc. Drug Rev.*, **25**, 235-260, doi: 10.1111/j.1527-3466.2007.00018.x.
 36. Tao, R., Kim, S. H., Honbo, N., Karliner, J. S., and Alano, C. C. (2010) Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **56**, 659-668, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181faeaf0.
 37. Tiwari, P., Khan, H., Singh, T. G., and Grewal, A. K. (2022) Poly (ADP-ribose) polymerase: an overview of mechanistic approaches and therapeutic opportunities in the management of stroke, *Neurochem. Res.*, **47**, 1830-1852, doi: 10.1007/s11064-022-03595-z.
 38. Ohmoto, A., and Yachida, S. (2017) Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions, *Onco Targets Ther.*, **10**, 5195-5208, doi: 10.2147/OTT.S139336.
 39. Walsh, C. (2018) Targeted therapy for ovarian cancer: the rapidly evolving landscape of PARP inhibitor use, *Minerva Ginecol.*, **70**, 150-170, doi: 10.23736/S0026-4784.17.04152-1.
 40. Jain, P. G., and Patel, B. D. (2019) Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents – a recent update, *Eur. J. Med. Chem.*, **165**, 198-215, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.024.
 41. Kirsanov, K., Fetisov, T., Antoshina, E., Trukhanova, L., Gor'kova, T., Vlasova, O., Khitrovo, I., Lesovaya, E.,

- Kulbachevskaya, N., Shcherbakova, T., Belitsky, G., Yakubovskaya, M., Švedas, V., and Nilov, D. (2022) Toxicological properties of 7-methylguanine, and preliminary data on its anticancer activity, *Front. Pharmacol.*, **13**, 842316, doi: 10.3389/fphar.2022.842316.
42. Efremova, A. S., Zakharenko, A. L., Shram, S. I., Kulikova, I. V., Drenichev, M. S., Sukhanova, M. V., Khodyreva, S. N., Myasoedov, N. F., Lavrik, O. I., and Mikhailov, S. N. (2013) Disaccharide pyrimidine nucleosides and their derivatives: a novel group of cell-penetrating inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **32**, 510-528, doi: 10.1080/15257770.2013.827793.
43. Virág, L., and Szabó, C. (2001) Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death, *FASEB J.*, **15**, 99-107, doi: 10.1096/fj.00-0299com.
44. Geraets, L., Moonen, H. J., Wouters, E. F., Bast, A., and Hageman, G. J. (2006) Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations, *Biochem. Pharmacol.*, **72**, 902-910, doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.023.
45. Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., and Schultz, G. (1991) Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart, *Circ. Res.*, **69**, 1476-1486, doi: 10.1161/01.res.69.6.1476.
46. Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., and Oliveira, P. J. (2015) Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype, *PLoS One*, **10**, e0129303, doi: 10.1371/journal.pone.0129303.
47. Kankeu, C., Clarke, K., Van Haver, D., Gevaert, K., Impens, F., Dittrich, A., Roderick, H. L., Passante, E., and Huber, H. J. (2018) Quantitative proteomics and systems analysis of cultured H9C2 cardiomyoblasts during differentiation over time supports a “function follows form” model of differentiation, *Mol. Omics*, **14**, 181-196, doi: 10.1039/c8mo00036k.
48. Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, M. P., Larráyo, I., Martínez-Picado, J., and Casado, F. J. (2005) Cell entry and export of nucleoside analogues, *Virus Res.*, **107**, 151-164, doi: 10.1016/j.virusres.2004.11.005.
49. Cano-Soldado, P., and Pastor-Anglada, M. (2012) Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition, *Med. Res. Rev.*, **32**, 428-457, doi: 10.1002/med.20221.
50. Inoue, K. (2017) Molecular basis of nucleobase transport systems in mammals, *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1130-1138, doi: 10.1248/bpb.b17-00374.
51. Zingarelli, B., Cuzzocrea, S., Zsengellér, Z., Salzman, A. L., and Szabó, C. (1997) Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, *Cardiovasc. Res.*, **36**, 205-215, doi: 10.1016/s0008-6363(97)00137-5.
52. Ilnytska, O., Lyzogubov, V. V., Stevens, M. J., Drel, V. R., Mashtalir, N., Pacher, P., Yorek, M. A., and Obrosova, I. G. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy, *Diabetes*, **55**, 1686-1694, doi: 10.2337/db06-0067.
53. Tas Hekimoglu, A., Toprak, G., Akkos, H., Evliyaoglu, O., Tas, T., Kelle, I., and Colpan, L. (2014) Protective effect of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase in distant liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **18**, 34-38.
54. Пушкарев С. В., Винник В. А., Шаповалова И. В., Швядас В. К., Нилов Д. К. (2022) Моделирование структуры комплекса тРНК-гуанинтрансглицозилазы человека с 7-метилгуанином и выявление факторов, определяющих взаимодействие фермента с ингибиторами, *Биохимия*, **87**, 550-557, doi: 10.31857/S0320972522040078.

NATURAL GUANINE DERIVATIVES EXERT PARP-INHIBITORY AND CYTOPROTECTIVE EFFECTS IN A MODEL OF CARDIOMYOCYTE DAMAGE UNDER OXIDATIVE STRESS

S. I. Shram^{1*}, T. A. Shcherbakova², T. V. Abramova³, E. C. Baradieva¹, A. S. Efremova⁴, M. S. Smirnovskaya⁵, V. N. Silnikov³, V. K. Švedas^{2,6}, and D. K. Nilov^{2*}

¹ Institute of Molecular Genetics, National Research Centre “Kurchatov Institute”, 123182 Moscow, Russia; e-mail: shram-si.img@yandex.ru

² Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, 119992 Moscow, Russia; e-mail: nilovdm@gmail.com

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Research Centre for Medical Genetics, 115522 Moscow, Russia

⁵ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁶ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Inhibitors of human poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) are considered as promising agents for the treatment of cardiovascular, neurological, and other diseases accompanied by inflammation and oxidative stress. Previously, the ability of the natural compounds 7-methylguanine (7mGua) and 8-hydroxy-7-methylguanine (8h7mGua) to suppress the activity of the recombinant PARP protein was demonstrated. In the present work, we have investigated the possibility of PARP-inhibitory and cytoprotective action of 7mGua and 8h7mGua against rat cardiomyoblast cultures (undifferentiated and differentiated H9c2). It was found that 7mGua and 8h7mGua rapidly penetrate into cells and effectively suppress H₂O₂-stimulated PARP activation (IC₅₀ = 270 and 55 μM, respectively). The pronounced cytoprotective effects of 7mGua and 8h7mGua were shown in a cellular model of oxidative stress, and 8h7mGua exceeded the classic PARP inhibitor 3-aminobenzamide for effectiveness. The obtained data indicate the prospects for the development of PARP inhibitors based on guanine derivatives and their testing on models of ischemia-reperfusion tissue damage.

Keywords: 7-methylguanine, 8-hydroxy-7-methylguanine, poly(ADP-ribose) polymerase, inhibitor, cardiomyocytes, oxidative stress, cytoprotection