

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ МЕТАБОЛІЗМУ АРГІНІНУ І ПОЛІАМІНІВ НА АКТИВНІСТЬ АРГІНАЗИ ТА ПРОДУКЦІЮ ОКСИДІВ АЗОТУ КЛІТИНАМИ АСЦИТНОГО РАКУ ЕРЛІХА *IN VIVO*



Ю.В. Яніш, А.Б. Артамонова, С.П. Залеток

Адреса:
Яніш Юрій Вадимович
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
Тел.: (044) 259-91-95

Ключові слова: карцинома Ерліха, поліаміни, макрофаги, аргіназа, NO, NO-синтази.

Показано, що дія інгібіторів метаболізму поліамінів може бути модифікована не тільки шляхом впливу на ферментні системи прямого синтезу останніх, але й шляхом зниження активності аргінази, задіяної в утворенні попередника синтезу поліамінів орнітину. Наявність інгібітору аргінази нораргініну створює сприятливі умови для роботи NO-синтаз, що викликає потужну стимуляцію продукції оксидів азоту пухлинними клітинами.

ВСТУП

Відомо, що проліферація клітин не може відбуватися за відсутності або навіть браку певної кількості поліамінів. Це стосується як нормальних, так і злоякісно трансформованих клітин. Тому пильна увага, яку приділяють онкологи обміну поліамінів в організмі, ураженому пухлинним процесом, та їх метаболізму безпосередньо в пухлинних клітинах не є випадковою. Зміни рівня поліамінів через штучне втручання в роботу ферментних систем, задіяних в їх синтезі або утворенні попередників цього синтезу, а також у процесі інтерконверсії, який дає клітині змогу залишатися живою за умов пригнічення прямого синтезу поліамінів, може стати ефективним важелем впливу на перебіг пухлинної хвороби [1–4]. Зокрема, від вмісту поліамінів залежить такий важливий показник, як сумарний поверхневий заряд і безпосередньо з ним пов'язаний електростатичний потенціал клітини [2, 5]. Ці біофізичні чинники впливають на функціональну активність клітин, у тому числі — клітин макрофагального ряду, які відіграють роль одного з перших бар'єрів неспецифічного захисту організму на початкових стадіях онкологічного захворювання [2]. Надалі пухлинна клітина стикається в організмі з клітинною ланкою імунного захисту, представники якої — цитотоксичні Т-лімфоцити та природні кілери — за сприятливих умов знищують її при безпосередньому контакті. У цих процесах задіяні вільнорадикальні механізми, головним фактором яких є активний кисень. А джерелом активних форм кисню зазвичай виступають оксиди

азоту, зокрема NO. Проте продуцентами NO можуть бути також пухлинні клітини. Саме інтенсивність продукції ними цього вільного радикалу позначається на характері та динаміці перебігу онкологічного захворювання [6, 7]. Тому поглиблене вивчення дії модуляторів метаболізму аргініну і поліамінів на активність аргінази та продукцію оксидів азоту пухлинними клітинами має на меті створення у перспективі методів терапії та прогнозування перебігу онкологічних захворювань в експерименті — шляхом впливу на рівень поліамінів і моніторингу продукування NO у пухлинах.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти *in vivo* виконували на нелінійних мишах розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Тварин утримували за стандартних умов, вони мали вільний доступ до їжі та води. Як експериментальні пухлинні моделі використано карциному Ерліха (АРЕ). Тваринам із масою тіла 22–25 г вводили в черевну порожнину 0,2 мл ізотонічного розчину NaCl, що містив $3 \cdot 10^5$ клітин карциноми Ерліха (АРЕ).

Як модулятори метаболізму аргініну і поліамінів використані α -диформетилорнітин (α -ДФМО) та рекомбінантна аргіназа, люб'язно надані доктором біологічних наук, професором М.В. Гончаром (Львівський інститут біології клітини НАН України); як інгібітор аргінази — нораргінін. Нораргінін вводили

в дозі 40 мг/кг маси тіла, ДФМО — у дозі 800 мг/кг, метилглюксаль-біс-гуанілгідрозон (МГБГ) — по 10 мг/кг; препарати вводили окремо або поєднано. Застосовували комбінації нораргініну з ДФМО та нораргініну з ДФМО і МГБГ. При поєднаному застосуванні препарати вводили з інтервалом 20 хв. Перші ін'єкції досліджуваних сполук робили через добу після перещеплення експериментальних пухлин, надалі — щодоби, до 7 введень. На 10-ту добу росту пухлини тварин забивали методом дисторсії шийних хребців із дотриманням правил біологічної етики.

Макрофагоподібні клітини виділяли з асцитної рідини, використовуючи їх здатність до адгезії з гладкою пластмасовою поверхнею.

Продукцію оксиду азоту визначали таким чином: відбирали по 200 тис. пухлинних клітин у 100 мкл ізотонічного розчину NaCl, переносили в пробірки Елендорфа місткістю 1,5 мл та додавали по 100 мкл робочого розчину, який готували за 30 хв до початку досліду. Для приготування робочого розчину до колби, обгорнутої фольгою, додавали 24,3 мл бі-дистильованої (dd) H₂O, 735 мкл H₃PO₄, 0,25 г сульфаніламіду та ретельно перемішували протягом 10 хв. Потім до розчину додавали 0,025 г нафтил-етилендіамін-дигідрохлориду та перемішували протягом 15 хв. Для побудови калібрувальної кривої готували стандартні розведення NaNO₂, до яких також додавали по 100 мкл робочого розчину [8].

Після внесення до пробірок зі стандартами та дослідними зразками робочого розчину проби інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хв у захищеному від світла місці. Через 10 хв відбирали по 200 мкл розчину з кожної проби в плоскодонний планшет. Кожну пробу і стандарти вимірювали в трьох повторностях. Вміст оксидів азоту визначали за допомогою планшетного рідера при $\lambda=545$ нм [8].

Для визначення активності аргінази до відібраних пухлинних клітин (100 мкл суспензії, в яких містилося 200 тис. клітин) додавали 100 мкл 0,1% розчину Triton X-100 та струшували проби протягом 15 хв. Потім додавали 100 мкл 50 мМ Тріс-НСІ буферного розчину та 10 мкл 100 мМ розчину MnCl₂. Зразки витримували протягом 10 хв на водяній бані при 60 °С, додавали по 100 мкл 0,5 М розчину аргініну та інкубували протягом 1 год у термостаті при 37 °С. За цей час готували стандартні розведення сечовини для побудови калібрувальної кривої [9].

Через годину до кожної дослідної проби додавали по 800 мкл суміші кислот H₃PO₄, H₂SO₄ та H₂O у співвідношенні 1:3:7 відповідно, до стандартних проб додавали по 900 мкл суміші кислот і по 50 мкл α -ізопропіофенону та інку-

бували протягом 1 год на водяній бані при 100 °С; після інкубації відбирали по 200 мкл у плоскодонний планшет. Кожну пробу відбирали в трьох повторностях. Аргіназну активність вимірювали за допомогою планшетного рідера при $\lambda=570$ нм; інтенсивність блакитного забарвлення у лунках планшета пропорційно залежала від кількості розщепленого ферментом аргініну [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що застосування інгібітору аргінази (нораргініну) та інгібіторів синтезу поліамінів (ДФМО і МГБГ) у тварин із перещепленою карциною Ерліха не призводило до суттєвих змін кількості макрофагоподібних клітин в асцитній рідині тварин. Кількість макрофагоподібних клітин у всіх досліджених групах тварин мало відрізнялася від цього показника у контрольних тварин із перещепленою карциною Ерліха. У групі тварин, які отримували поєднано МГБГ, ДФМО та нораргінін, кількість макрофагів була навіть меншою порівняно з «хворим» контролем, але ця різниця була невірогідною (табл. 1). У цьому випадку увага, приділена визначенню вмісту макрофагоподібних клітин, пояснюється їх теоретично вагомим внеском у реакцію захисних систем організму на початкових етапах розвитку пухлини.

Наступні експерименти стосувалися змін активності аргінази в пухлинних клітинах при введенні тваринам нораргініну та інгібіторів синтезу поліамінів (ДФМО і МГБГ).

Як видно з даних дослідження активності аргінази в клітинах карциноми Ерліха, наведених у табл. 2, введення нораргініну тваринам у сумарній дозі 40 мг/кг маси (7 ін'єкцій) викликало зниження активності аргінази на 14%. Поєднане введення тваринам усіх трьох досліджуваних інгібіторів (ДФМО + МГБГ + нораргінін) знижувало активність аргінази на 31%. Водночас введен-

ня лише інгібіторів синтезу поліамінів ДФМО і МГБГ окремо чи поєднано, навпаки, спричиняло деяке підвищення активності цього ферменту (на 15; 9 і 13% відповідно).

При дослідженні впливу інгібіторів синтезу поліамінів та інгібітору аргінази нораргініну на продукцію оксидів азоту клітинами карциноми Ерліха встановлено, що найбільшу кількість оксидів азоту продукують пухлинні клітини, виділені у тварин, які отримували поєднано ДФМО, МГБГ і нораргінін. Показники продукції пухлинними клітинами оксидів азоту у цієї групи тварин перевищували такі в контрольній групі у 8 разів. При поєднаному введенні ДФМО та МГБГ цей показник був нижчим, ніж у попередній групі, однак достовірно вищим порівняно з контролем. Подібне явище мало місце і в групі тварин, що отримували нораргінін. При введенні тваринам ДФМО та МГБГ окремо кількість оксидів азоту, що продукувалася пухлинними клітинами, була також вищою порівняно з показниками у контролі, однак у випадку дії ДФМО це підвищення не досягло ступеня достовірності (табл. 3).

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що введення інгібітору активності аргінази (нораргініну) та інгібіторів синтезу поліамінів (ДФМО, МГБГ) тваринам із перещепленою карциною Ерліха мало впливало на вміст макрофагоподібних клітин в асцитній рідині, і кількість останніх майже не відрізнялася від такої в пухлинному контролі. Це може означати, що, принаймні у випадку з карциною Ерліха, макрофагальна ланка неспецифічного захисту організму не відіграє істотної ролі.

2. Введення тваринам із перещепленою карциною Ерліха нораргініну в дозі 40 мг/кг маси (7 ін'єкцій) призводить до зниження активності аргінази на 14%. Поєднане введення тваринам усіх трьох досліджуваних інгібіторів (ДФМО + МГБГ + нораргінін) викликає зниження

Таблиця 1. Вплив нораргініну та інгібіторів синтезу поліамінів на загальну кількість макрофагоподібних клітин в асцитній рідині тварин із карциною Ерліха

Пухлинний штам	Кількість макрофагоподібних клітин в асцитній рідині, $n \times 10^6$ /тварину					
	Контроль	Нораргінін	МГБГ	ДФМО	Нораргінін + МГБГ + ДФМО	ДФМО + МГБГ
АРЕ	473,0 \pm 81,5	627,9 \pm 159,3	515,7 \pm 91,4	727,0 \pm 305,7	366,4 \pm 71,8	564,4 \pm 90,8

Таблиця 2. Вплив нораргініну та інгібіторів синтезу поліамінів на активність аргінази в клітинах АРЕ в експериментах *in vivo*

Пухлинний штам	Активність аргінази, мкМ/10 ⁶ клітин/год					
	Контроль	Нораргінін	МГБГ	ДФМО	Нораргінін + МГБГ + ДФМО	ДФМО + МГБГ
АРЕ	1232,6 \pm 73,8	1059,2 \pm 92,1	1345,5 \pm 207,9	1418,2 \pm 11,4	852,3 \pm 145,7	1388,6 \pm 514,0

Таблиця 3. Вплив нораргініну та інгібіторів синтезу поліамінів на продукцію оксидів азоту клітинами АРЕ

Пухлинний штам	Продукція оксидів азоту, мкМоль/10 ⁶ клітин/год					
	Контроль	Нораргінін	МГБГ	ДФМО	Нораргінін + МГБГ + ДФМО	ДФМО + МГБГ
АРЕ	314,2 \pm 55,1	624,6 \pm 52,6	434,0 \pm 48,6	372,7 \pm 20,2	1641,4 \pm 134,3	590,0 \pm 86,3

активності аргінази на 31%. Водночас введення лише інгібіторів ферментів синтезу поліамінів ДФМО і МГБГ окремо чи поєднано, навпаки, спричиняє деяке підвищення активності цього ферменту (на 15; 9 і 13% відповідно). Ці дані цілком логічно пояснюються тим, що під дією ДФМО і МГБГ клітина компенсаторно підвищує активність аргінази з метою утворення надлишкової кількості орнітину як субстрату для орнітиндекарбоксілази, задіяної в синтезі поліамінів на початковому його етапі. Наявність у системі нораргініну пригнічує її активність, потенціюючи дію вказаних інгібіторів.

3. Введення тваринам із перешепленою карциномою Ерліха інгібіторів синтезу поліамінів (ДФМО, МГБГ) та інгібітору аргінази (нораргініну) викликає зміни у продукції оксидів азоту пухлинними клітинами. Найбільшу кількість оксидів азоту продукували пухлинні клітини, вилучені у тварин, які отримували поєднано ДФМО, МГБГ і нораргінін. Показники продукції пухлинними клітинами оксидів азоту у цієї групи тварин перевищували такі в контрольній групі у 8 разів. При по-

єднаному введенні ДФМО та МГБГ цей показник був нижчим, ніж у попередній групі, однак достовірно вищим порівняно з контролем. Подібні зміни були виявлені і в групі тварин, що отримували нораргінін. При введенні тваринам ДФМО та МГБГ окремо кількість оксидів азоту, що продукувалася пухлинними клітинами, була також вищою порівняно з показниками у контролі, однак у випадку дії ДФМО це підвищення не досягало ступеня достовірності. Очевидно, наявність вказаних інгібіторів, зокрема інгібітору аргінази, сприяло накопиченню надлишку аргініну, який відіграє роль субстрату для NO-синтаз. Саме це певною мірою може стимулювати продукцію оксидів азоту клітинами.

Таким чином, отримані дані свідчать, що відомі протипухлинні ефекти досліджених агентів можуть бути пов'язані з їх дією не тільки на ключові ферменти синтезу поліамінів — орнітиндекарбоксілазу та S-аденозилметіоніндекарбоксілазу, а й із їх впливом на ферменти обміну аргініну, зокрема аргіназу та синтазу оксидів азоту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Soda K. (2011) The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 30: 95–99.
2. Яніш Ю.В., Гончар М.В., Артамонова А.Б., Карнаушанко О.В. (2015) Вплив модуляторів рівня аргініну і поліамінів на метаболічну активність макрофагів і цитолітичну активність спленоцитів та їх електроімунохімічні властивості у мишей з лейкозом L1210. *Клин. онкол.*, 2 (18): 47–51.
3. Rodriguez P.C., Quiceno O.G., Zabaleta J. et al. (2004) Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.*, 64: 5839.
4. Wheatley D.N., Campbell E. (2003) Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 3. Deficient utilisation of citrulline by malignant cells. *Brit. J. Cancer*, 89: 573–576.
5. Яніш Ю.В., Гончар М.В., Гоголь С.В. та ін. (2015) Вплив модуляторів метаболізму аргініну і поліамінів на поверхневий електричний заряд клітин карциноми легень Lewis (LLC) *in vivo* та на їх проліферативну активність у культурі. *Клин. онкол.*, 2 (18): 52–54.
6. Blachier F., Davika A.M., Velascoz J., Tome D. (2011) Channelling of arginine in NO and polyamine pathways in colonocytes and consequences. *Front. Biosci.*, 16: 1331–1343.
7. Nitric Oxide (NO) and Cancer/Prognosis, Prevention, and Therapy. *Benjamin Bonavida Editor*. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010. 513 p.
8. Miels A.M., Wink D.A., Cook J.C., Grisham M.B. (1996) Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol.*, 268: 105–120.
9. Kepka-Lenhart D., Ash D.E., Morris S.M. (2008) Determination of mammalian arginase activity. *Methods Enzymol.*, 440: 221–230.

Влияние модуляторов метаболизма аргинина и полиаминов на активность аргиназы и продукцию оксидов азота клетками асцитного рака Эрлиха *in vivo*

Ю.В. Яніш, А.Б. Артамонова, С.П. Залеток
 Інститут експериментальної патології, онкології
 і радіобіології ім. Р.Е. Кавецького НАН України, Київ

Резюме. Показано, що діяння інгібіторів метаболізму поліамінів може бути модифіковано не тільки путем впливу на ферментні системи прямого синтезу останніх, но й посредством зниження активності аргінази, задіяваної в утворенні предшественника синтезу поліамінів орнітину. Наявність інгібітору аргінази нораргініну створює сприятливі умови для роботи NO-синтаз, що викликає потужну стимуляцію продукції оксидів азоту пухлинними клітинами.

Ключові слова: карцинома Ерліха, поліаміни, макрофаги, аргіназа, NO, NO-синтази.

Impact of arginine and polyamines metabolism modulators on the arginase activity and nitrogen oxides production by cells of Ehrlich carcinoma *in vivo*

Yu. V. Yanish, A. B. Artamonova, S. P. Zaletok
 R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology
 and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv

Summary. It was shown that action of polyamine metabolism inhibitors can be modified not only by direct influence on the enzymatic system of synthesis the latter, but also by reducing arginase activity that is involved in the formation of ornithine the precursor of polyamine synthesis. The presence of an inhibitor of arginase norarginin creates favorable conditions for NO-synthase, which causes a strong stimulation of tumor cells production of nitrogen oxides.

Key words: Ehrlich carcinoma, polyamines, macrophages, arginase, NO, NO-syntases.