

УДК 577.152:851.48+616.34-006

Օ. Խ. Ավադյան¹, Ն. Խ. Ալչուդյան¹, Ն. Օ. Մովսեսյան¹, Գ. Գ. Մինասյան²

Метаболический профиль L-аргинина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха и влияние противоопухолевой терапии авирулентными штаммами *Escherichia coli*: аргиназа. Сообщение 1

(Представлено академиком М.Г.Инджикян 5/IV 2013)

Ключевые слова: *Escherichia coli*, L-аргинин, асцитная карцинома Эрлиха, аргиназа, головной мозг, митохондрии, орнитин, цитоплазма, L-цитруллин.

Важнейшим направлением современной биомедицины является исследование молекулярных механизмов патогенеза рака, поиск путей предотвращения и подавления малигнизации тканей. Иммунодефицитное состояние сопутствует онкологическим заболеваниям, и использование микробов в качестве неспецифических иммуностимуляторов в целях повышения естественной резистентности организма открывает перспективы для альтернативной онкотерапии [1, 2]. В механизмы противоопухолевого влияния микроорганизмов могут быть вовлечены два важнейших аргинин-метаболизирующих фермента – аргиназа и синтаза оксида азота (NOS), которые продуцируют соединения, подавляющие функции Т-лимфоцитов, препятствуя нормальному осуществлению иммунного ответа при опухолевом росте [3]. В ряде работ показано, что индуцибельная форма NOS (iNOS) и цитоплазматическая изоформа аргиназы (A1) коиндуцируются при раке, вовлекаясь в процессы иммуносупрессии с ингибированием пролиферации лимфоцитов [4, 5]. Экспрессия и активность митохондриальной изоформы аргиназы (A2) также возрастает на ранних стадиях развития некоторых злокачественных опухолей (рак груди, толстой кишки, аденокарцинома простаты, карцинома почек), коррелируя с их ростом и прогрессией [6 – 8]. Нами выявлено модулирующее влияние противоопухолевой терапии авирулентными клиническими штаммами *Escherichia coli* на аргиназную активность в асцитной жидкости и изоформ аргиназы в перитонеальных лейкоцитах мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ), коррелирующие с изменениями в содержании L-аргинина и его метаболитов [9]. В то же время изучение особенностей метаболизирования

L-аргинина не только в очаге развития опухоли, но и в центральной нервной системе представляет определенный интерес, поскольку между кишечником (включая микробиоту) и мозгом существует двунаправленная связь, регулируемая на нейрональном, гормональном, иммунологическом уровнях, которая вносит свой вклад в поддержание гомеостаза [10]. В представленной работе впервые изучена картина субклеточных превращений L-аргинина с вовлечением изоформ аргиназы в тканях головного мозга мышей при АКЭ и после *E. coli*-терапии.

Материал и методы. Опыты проводили с соблюдением правил содержания и обращения с животными, изложенных в Директивах Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА. Двухмесячные беспородные белые мыши-самцы массой 20-22 г были разделены на группы (n=18/группу): контрольная – здоровые мыши и две опытные – животные с АКЭ; мыши с АКЭ, подвергнутые обработке клетками *E. coli* (медицинский центр «Арменикум»).

Формирование асцитной карциномы Эрлиха у мышей осуществляли суспензией клеток АКЭ, отбираемой у белых беспородных мышей-опухоленосителей (НТЦ органической фармацевтической химии НАН РА). Трансплантацию клеток АКЭ осуществляли введением асцитной жидкости в объеме 0.5мл (1×10^7 кл/мл) в брюшную полость мышей, которых декапитировали на 11-е сутки развития АКЭ (конец лог-фазы – начало терминального периода роста опухоли) [11].

Бактериальная обработка. Через 2 дня после трансплантации АКЭ глаза мышей одной из опытных групп однократно асептически обрабатывали ватными тампонами, пропитанными взвесью живых необработанных бактерий *E. coli* (1×10^9 клеток/мл); параллельная опытная группа мышей-опухоленосителей служила контролем для оценки влияния бактерий.

Противоопухолевый эффект. Влияние бактериальной терапии оценивали по массе тела, объему асцитной жидкости, среднему времени выживания (СВВ) и проценту продления СВВ (ПСВВ), которые контролировали в каждой опытной группе путем ежедневной регистрации смертности и рассчитывали по уравнениям: $СВВ = (\text{день первого случая смерти} + \text{день последнего случая смерти})/2$; $\text{процент ПСВВ} = [(СВВ \text{ группы АКЭ-} E. coli / СВВ \text{ группы АКЭ}) - 1] \times 100$ [12].

Выделение митохондриальной и цитоплазматических фракций головного мозга. Мышей декапитировали, извлекали головной мозг, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (тефлон – стекло) (1500 об/мин) в течение 3 мин в 10-кратном объеме 20 мМ HEPES буфера, содержащего 0.25 М сахарозу, рН 7.4. Для выделения клеточных компартментов применяли метод дифференциального центрифугирования [13]. Гомогенат центрифугировали на центрифуге К-24 (Герм.) при 3000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции, и из полученной надосадочной жидкости центрифугированием при 15000 об/мин 20 мин при 4°C получали в супернатанте цитоплазматическую фракцию, в осадке – митохондриальную.

Активность аргиназы определяли по образованию орнитина в реакционной смеси [14]. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 0.05 М NaOH-глициновом буфере pH 9.5 и/или 20 мМ HEPES буфере, pH 7.4, с добавлением в соответствующие буферы 0.1 М L-аргинина и 0.05 М $MnCl_2 \cdot 4H_2O$. Параллельно в контрольных экспериментах для подтверждения аргиназной активности пробы инкубировали в присутствии 60 мМ L-валина, неконкурентного ингибитора аргиназы. Реакцию останавливали 10%-ной трихлоруксусной кислотой (в пропорции 1:2 по объему) и белки осаждали центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре. Супернатанты депротеинизированных проб смешивали с 4.5 %-ным нингидрином (в соотношении 1:2 по объему), нагревали в водяной бане 30 мин при 90–95°C и после охлаждения содержание L-орнитина определяли спектрофотометрически при длине волны 505 нм. Активность аргиназы выражали в мкмоль L-орнитина mg^{-1} белка $ч^{-1}$.

Определение содержания L-аргинина. Пробы депротеинизировали 0.5 N NaOH и 10%-ным $ZnSO_4$ (в пропорции 1:1:1 по объему), центрифугировали при 15000 об/мин 3 мин и в супернатантах определяли содержание аргинина [15]. Супернатанты проб последовательно смешивали с рабочим раствором (смесь растворов: 0.02 % 8-оксихинолина в 96%-ном этиловом спирте, 2.5% сульфосалицилата натрия в 0.01 М растворе глицина и 2.5% NaOH, в пропорции 1:1:1 по объему) и 1%-ным гипобромитом натрия в соотношении 3:1:0.2 (по объему) и спустя 15 мин оценивали содержание L-аргинина спектрофотометрически при длине волны 525 нм, которое выражали в мкмоль L-аргинина mg^{-1} белка.

Содержание белка определяли методом Лоури и сотр. [16] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Specol 211 (Герм.).

Статистика. Достоверность различий оценивали с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) с последующим постдисперсионным анализом Холм-Сидака (пакет программ SigmaStat 3.5 for Windows). В качестве критерия достоверности принимали $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. На сегодняшний день обе изоформы аргиназы обнаружены во многих органах и тканях, включая центральную нервную систему и желудочно-кишечный тракт [17]. Аргиназа расщепляет аргинин на орнитин и мочевину, и в наших экспериментах аргиназная активность определялась по аккумуляции орнитина в реакционной смеси после часовой инкубации (см. *Материалы и методы*). Как видно из рис. 1, в условиях *in vitro* общая активность аргиназы и ее изоформ зависит от кислотности инкубационной среды: у контрольных мышей при повышении pH от физиологических значений (pH 7.4) до оптимальных для аргиназы (pH 9.5) активность фермента возрастает в гомогенатах головного мозга в 1.9, цитоплазме – 1.6, митохондриях – 15 раз. И несмотря на то, что основные значения обеспечивают максимальное проявление аргиназной активности, по всей вероятности, значения последней, определяемые при нейтральных pH, точнее отражают картину *in vivo* в нормальных

физиологических условиях, хотя в клетке возможны локальные колебания кислотности среды. В контрольной группе при pH 7.4 значения активности A1 в цитоплазме сходны с общей, определяемой в гомогенате, и примерно в 8.5 раза выше активности A2 в митохондриях. При pH 9.5 эти различия нивелируются, а именно в гомогенате, цитоплазме и митохондриях детектируются примерно сходные значения аргиназной активности.

При АКЭ в тканях головного мозга происходит интрацеллюлярное перераспределение аргиназной активности: при pH 7.4 в гомогенатах общая активность увеличивается в 2.5 раза, активность A2 в митохондриях – в 30 раз, тогда как в цитоплазме активность A1 падает в 17.4 раза, по сравнению с контролем. Любопытно, что при этом стимулирующее влияние на активность аргиназы основной среды (pH 9.5) сохраняется лишь в гомогенатах и не проявляется в отношении обеих изоформ аргиназы. Это указывает на АКЭ-индуцированные изменения микроусловий внутри клеточных компартментов тканей мозга, влияющих на проявление активности изоформ аргиназы.

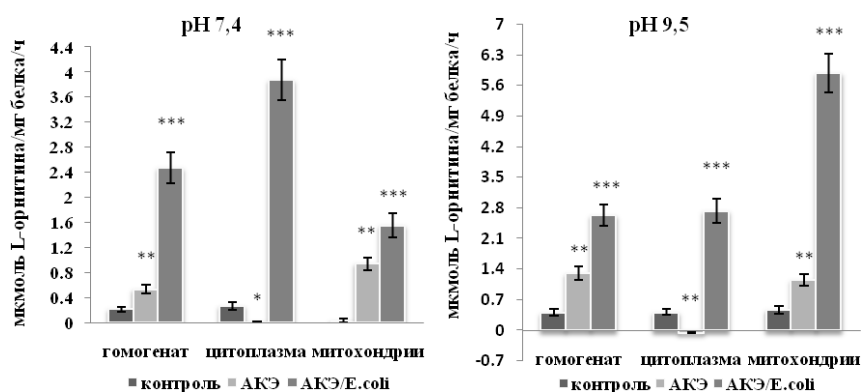


Рис. 1. Аргиназная активность в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха АКЭ и *E. coli*-терапии. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Здесь и далее достоверность параметров (p), оцениваемых при АКЭ, определялась по сравнению с контрольными значениями, а после *E. coli*-терапии – по сравнению данными, полученными одновременно в отношении нелеченых животных с АКЭ. Достоверность на графиках представлена следующими обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Экспрессия аргиназы в клеточных линиях опухолевых клеток, первичных очагах развития рака человека и мышей связана с ее участием в синтезе полиаминов, промотирующих рост опухоли, а также с подавлением аргиназой NO-опосредуемой цитотоксичности в отношении опухоли [18, 19]. Тем не менее генетическая абляция изоформы A2 в мышинной модели рака простаты приводит к более агрессивному росту и развитию опухоли, что указывает на существование альтернативных путей синтеза или захвата полиаминов, которые активируются в раковых клетках в случае подавления экспрессии A2 [6]. Нами выявлены высокая аргиназная активность в опухолевых клетках и стимулирование обеих изоформ аргиназы в

перитонеальных лейкоцитах мышей с АКЭ, тогда как в мозге обнаружены полное подавление А1, активность которой в норме доминирует внутри клетки, и одновременное активирование А2, которая, лимитируя содержание аргинина, будет препятствовать гиперпродукции оксида азота индуцибельной NOS, которая может активироваться в мозге в рамках естественного иммунного ответа [20]. Отметим, что мышечные макрофаги костномозгового происхождения экспрессируют исключительно А2, которая оказывает провоспалительный эффект, стимулируя продукцию активных форм кислорода в митохондриях [21].

Как известно, в состав клеточных стенок *Escherichia coli* как грамотрицательной бактерии входит липополисахарид (ЛПС), который активирует макрофаги мышей-опухоленосителей, стимулирует приток CD4(+) Т-клеток, вызывая селективный лизис опухолевых клеток и подавление их роста [22]. Обработка мышей с АКЭ фаго- и термолизатами *E. coli* в комплексе с противоопухолевыми препаратами почти полностью подавляет рост опухоли, а у некоторых мышей вызывает полное ее исчезновение [23]. Поскольку живые бактерии эффективнее подавляют канцерогенез, чем ослабленные или убитые [22], в наших экспериментах обработка мышей с АКЭ осуществлялась цельными клетками непатогенных штаммов *E. coli*, причем однократно, при этом на 75% увеличивается среднее время выживаемости животных, в четыре раза снижается объем асцитной жидкости, почти нормализуется вес тела [9]. При этом *E. coli*-терапия существенно стимулирует подавленную при АКЭ активность А1, которая после бактериальной обработки почти в 15 раз превышает контрольный уровень при рН 7.4 и в 6.6 раза при рН 9.5. Возрастание общей активности фермента наблюдается в гомогенатах. Одновременно возрастает активность А2: при рН 7.4 в 1.7 раза, а при рН 9.5 в 5 раз по сравнению с нелечеными мышцами-опухоленосителями, что свидетельствует о восстановлении стимулирующего влияния основной среды на активность А2 и опосредованно указывает на изменения внутри митохондрий.

Таким образом, *E. coli*-обработка мышей с АКЭ вызывает активирование обеих изоформ аргиназы, при этом отменяется АКЭ-индуцированное подавление активности А1 и стимулируется А2, которая практически не проявляется в норме. Разнонаправленное изменение активности изоформ аргиназы в клетках мозга при АКЭ и стимулирующее влияние на них бактериальной терапии должно отражаться на сопряженных обменных путях в соответствующих клеточных компартментах.

При АКЭ в тканях головного мозга детектировались сдвиги субклеточного содержания аргинина и орнитина (рис. 2). Причем уровень аргинина возрастает в 6.7, 5.1 и 4 раза, а орнитина – в 1.9, 9.5 и 2.7 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях, соответственно. Концентрация орнитина в наибольшей степени возрастает в цитоплазме, и, по-видимому, подавляет А1 изоформу аргиназы, т. е. имеет место ингибирование конечным продуктом по принципу отрицательной обратной связи. В то же время повышение уровня орнитина не предотвращает повышение активности А2, что связано со спецификой его влияния на эту изоформу подоб-

но тому, как возрастание концентрации орнитина не подавляет аргиназную активность в культурах клеток [24].

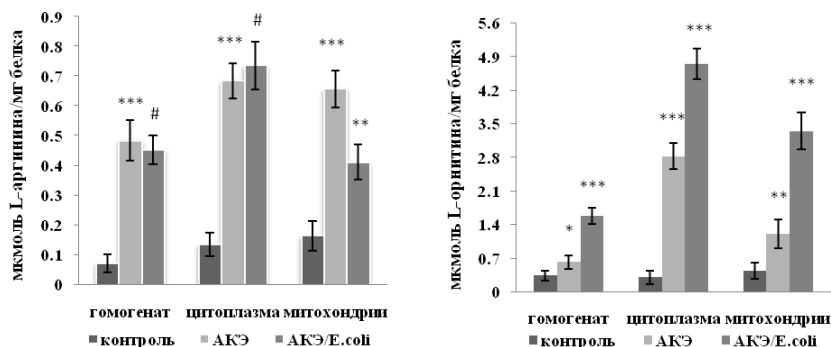


Рис. 2. Содержание L-аргинина и L-орнитина в головном мозге мышей при АКЭ и *E. coli*-терапии. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

Особый интерес представляют данные о повышении содержания аргинина в цитоплазме при АКЭ, что может быть обусловлено подавлением активности не только А1, но и других аргинин-метаболизирующих систем. Отметим, что L-аргинин является прекурсором агматина, путресцина и полиаминов, участвующих в иммунитете и стрессовом ответе организма [25]. Причем в отличие от аргинина и агматина, которые легко преодолевают гематоэнцефалический барьер, у путресцина, спермина и спермидина этот процесс затруднен, и поэтому они синтезируются непосредственно в мозге из орнитина, который образуется при расщеплении аргинина аргиназой. В то же время АКЭ-стимулирование А2 не предотвратило возрастание аргинина в митохондриях, что может быть связано с одновременным активированием ферментов, участвующих в синтезе аргинина из орнитина. Отметим, что митохондриальная изоформа карбамоилфосфатсинтетазы I составляет карбамоилфосфат для синтеза цитруллина из орнитина орнитин-карбамоилтрансферазой, тогда как цитоплазматическая карбамоилфосфатсинтетаза II вовлечена в синтез пиримидинов [26, 27]. Вдобавок прекурсором аргинина является цитруллин: рециклизацию цитруллина в аргинин осуществляют аргининосукцинатсинтаза и аргининосукцинатлиаза, которые представлены практически во всех органах, в том числе и в мозге, и могут обеспечивать автономное снабжение аргинина [26]. Активность этих ферментов в известной мере определяет баланс в соотношении аргинина и цитруллина в клеточных компартментах и может вносить свой вклад в наблюдаемые сдвиги в уровне аминокислот при АКЭ и *E. coli*-терапии.

Таким образом, нами впервые выявлены разнонаправленные сдвиги в активности изоформ аргиназы в тканях головного мозга и влияние на них бактериальной терапии при АКЭ. Как это будет отражаться на связанных метаболических путях и взаимодействии мозг – кишечник, покажут даль-

нейшие исследования.

¹Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

²Научно-технологический центр органической
и фармацевтической химии НАН РА

Օ. Խ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ն. Խ. ԱԼՇՈՋՅԱՆ, Ն. Օ. ՄՈՎՏԵՍՅԱՆ, Գ. Գ. ՄԻՆԱՍՅԱՆ

Метаболический профиль L-аргинина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха и влияние противоопухолевой терапии авирулентными штаммами *Escherichia coli*: аргиназа. Сообщение 1

Асцитная карцинома Эрлиха на 11-е сутки развития сопровождается разнонаправленными сдвигами активности разных изоформ аргиназы и одновременным повышением содержания L-аргинина и продукта аргиназной реакции L-орнитина в цитоплазме и митохондриях тканей головного мозга мышей. Противоопухолевая терапия авирулентными клиническими штаммами *Escherichia coli* оказывает стимулирующее воздействие на обе изоформы аргиназы, влияет на уровень L-аргинина и L-орнитина в исследуемых клеточных компартментах.

Հ. Խ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ն. Խ. ԱԼՇՈՋՅԱՆ, Ն. Հ. ՄՈՎՏԵՍՅԱՆ, Գ. Գ. ՄԻՆԱՍՅԱՆ

L-արգինինի նյութափոխանակության պատկերը մկների գլխուղեղում Էրլիխի սացիտային կարցինոմայի ժամանակ և հակառուցքային բուժման օգնեցությունը *Escherichia coli*-ի ոչ ախտածին շտամների օգտագործմամբ. արգինազ: Հաղորդում 1

Չարագսման 11-րդ օրը Էրլիխի սացիտային կարցինոման ուղեկցվում է արգինազի տարբեր իզոմերների ակտիվության հակառակ ուղղված փոփոխություններով ու միաժամանակ L-արգինինի և արգինազային ռեակցիայի արգասիք L-օրնիտինի քանակի աճով մկների գլխուղեղի հյուսվածքների բջջապլազմայում և միտոքոնդրիումներում: Արգինազի իզոմերները խթանվում են, և փոփոխվում է L-արգինինի ու L-օրնիտինի մակարդակը հետազոտվող բջջային բաղադրամասերում հակառուցքային բուժման ժամանակ *Escherichia coli*-ի ոչ ախտածին կլինիկական շտամների օգտագործմամբ:

**H. Kh. Avagyan, N. Kh. Alchujyan, N. H. Movsesyan,
G. G. Minasyan**

L-arginine Metabolic Profile in the Mice brain at Ehrlich Ascites Carcinoma and Effects of Anticancer Therapy with Avirulent Strains of *Escherichia coli*: Arginase. Report 1

Ehrlich ascites carcinoma on 11th day of development is accompanied by opposite changes in the activity of different arginase isoforms, and a simultaneous increase in the levels of L-arginine and L-ornithine which is produced in arginase reaction in the cytoplasm and mitochondria of the mice brain tissues. Arginase isoforms are stimulated and associated changes in the L-arginine and L-ornithine content are observed in the studied cellular compartments following cancer therapy with avirulent clinical strains of *Escherichia coli*.

Литература

1. Якубовская П. И. - Рус. биотерапевт. журн. 2002. Т. 1. N 3. С. 5–14.
2. Patyar S., Joshi R., Byrav P., Prakash A., Medhi B., Das B. K. - J. Biomed. Sci. 2010. V. 17. P. 21–34.
3. Bronte V., Zanovello P. - Nat. Rev. Immunol. 2005. V. 5. P. 641–654.
4. Burke A.J., Sullivan F.J., Giles F.J., Glynn S.A. - Carcinogenesis. 2013. V. 34. N 3. P. 503–512.
5. Raber P., Ochoa A.C., Rodríguez P.C. - Immunol. Invest. 2012. V. 41. N 6-7. P. 614–634.
6. Mumenthaler S.M., Yu H., Tze S., Cederbaum S.D., Pegg A.E., Seligson D.B., Grody W.W. - Int. J. Oncol. 2008. V. 32. N 2. P. 357–365.
7. Munder M. Br. - J. Pharmacol. 2009. V. 158. P. 638–651.
8. Singh R., Pervin S., Karimi A., Cederbaum S., Chaudhuri G. Cancer Res., 2000, v.60, p. 3305–3312.
9. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О. и др. - Мед. наука Армении. 2013. Т. 53. N 2. С. 22–33.
10. Grenham S., Clarke G., Cryan J. F., Dinan T. G. - Front. Physiol. 2011. V. 2. P. 1–15.
11. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. Разработка. Сост. Е.В. Инжеваткин. Красноярский гос. ун-т. 2004. 10 с.
12. Mazumder U.K., Gupta M., Maiti S., Mukherjee M. - Indian J. Exp. Biol. 1997. V. 35. P. 473–477.
13. Bustamante J., Czerniczyniec A., Lores-Arnaiz S. - Front. Biosci. 2007. V. 12. P. 1034–1040.
14. Iyama E.W., Asakura T., Woods G.W. - Anal. Biochem. 2008. V. 383. N 2. P. 332–334.
15. Akamatsy S., Watanabe T.J. - J. Biochem. 1961. V. 77. N 3. P. 484.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
17. Morris S.M. Jr. - J. Nutr. 2007. V. 137. 1602S–1609S.
18. Tate D.J. Jr., Patterson J.R., Velasco-Gonzalez C., Carrol E.N., Trinh J. - Int. J. Biol. Sci. 2012. V. 8. N 8. P. 1109–1120.
19. Tate D.J. Jr., Vonderhaar D.J., Caldas Y.A., Metoyer T., Patterson J.R., Aviles D. H., Zea A.H. - J. Hematol. Oncol. 2008. V. 1. P. 14–19.
20. Esh T., Stefano G.B., Fricchione G.L., Benson H. - Med. Sci. Monit. 2002. V. 8. N 6. P. 103–118.
21. Ming X-F., Rajapakse A.G., Yepuri G., et al.. - Am. Heart Assoc. 2012. V. 1. N 4. P. 12–18.
22. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. - Proc. Natl. Acad. Sci. 1975. V. 72. P. 3666–3670.
23. Gambashidze K., Khorava P., Azaladze T., Kalandarishvili K., Jaiani E., Lasareishvil B., Azaladze A., Tediashvili M. - Exp. Oncol. 2012. V. 34. N 2. P. 107–111.
24. Wheatley D.N., Philip R., Campbell E. - Mol. Cell Biochem. 2003. V. 244. N 1-2. P. 177–185.
25. Casero R.A., Pegg A.E. - Biochem. J. 2009. V. 421. P. 323–338.
26. Wu G., Jaeger L.A., Bazer F.W., Rhoads J.M. - J. Nutr. Biochem. 2004. V. 15. N 8. P. 442–451.
27. Wu G., Morris S. M. - Biochem. J. 1998. V. 336. P. 1–17.