

L-аргининзависимая продукция NO в клеточных компартментах тканей головного мозга мышей, в которых нами выявлены сдвиги в активности изоформ аргиназы [6].

Материал и методы. Опыты осуществляли 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. Эксперименты проводили на 2-месячных беспородных белых мышах-самцах массой 20-22 г, которые содержались в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа воды и пищи. Животные были разделены на группы (n=18/группу): контрольная – здоровые мыши и две опытные – мыши с АКЭ и мыши с АКЭ, подвергнутые одноразовой интраокулярной обработке клетками *E. coli* (медицинский центр «Арменикум»).

Формирование у мышей АКЭ, бактериальная обработка, оценка противоопухолевого эффекта, получение перитонеальных лейкоцитов, выделение митохондриальной и цитоплазматических фракций головного мозга и перитонеальных лейкоцитов подробно описаны нами в предыдущих работах [3, 6].

Забор биологического материала. Мышей декапитировали и осуществляли забор клеток брюшной полости. Контрольным здоровым мышам после декапитации в брюшную полость шприцем вводили 3-5 мл 20 мМ HEPES буфера pH 7.4, далее с помощью шприца собирали суспензию перитонеальных клеток, которую центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM (жидкая среда (1x) с Na₂CO₃, без глутамина) и культивировали в термостате при 37°C в течение 24 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин. Из брюшной полости опытных групп мышей с АКЭ вытягивали асцитную жидкость, из которой клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин. Осажденные клетки, полученные от контрольных и/или опытных животных, разводили в 20 мМ HEPES буфере pH 7.4 и выделяли субпопуляции перитонеальных лейкоцитов.

Определение стабильных метаболитов оксида азота. В пробах осаждали белки 0.5 N NaOH и 10% ZnSO₄ (в пропорции 1:1:1 по объему) и после центрифугирования при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре в супернатантах реакцией диазотирования с использованием свежеприготовленного реактива Грисса–Илосвая определяли содержание стабильных метаболитов оксида азота (NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O₄, N₂O₃), которое выражали в нмоль (NO₂⁻) мг⁻¹ белка [7].

Определение содержания L-цитруллина осуществляли модифицированным методом Мора и Кауфмана [8]. После осаждения белков 10%-ной трихлоруксусной кислотой пробы центрифугировали при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре. К супернатантам добавляли в пропорции 1:2 (по объему) реактивную смесь: 9.6% H₂SO₄ и реагент (5 мМ диацетилмоноксим, 0.9 мМ тиосемикарбазид и 0.025 мМ FeCl₃), смешанные в соотношении 1:1 (по объему), нагревали 10 мин в кипящей водяной бане и после охлаждения содержание L-цитруллина, которое выражали в

нмоль L-цитруллина мг^{-1} белка, определяли спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Определение общей активности NO синтазы осуществляли долговременной инкубацией исследуемых проб (22 ч, 37°C) в реакционной смеси: 20 мМ HEPES буфер, содержащий 2 мМ дитиотреитол, 3 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pH 7.4 с добавлением 0.2 мМ NADPH и 1.7 мМ CaCl_2 , реакцию запускали введением 5.3 мМ L-аргинина. В параллельных контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 5 мМ N^0 -монометил-L-аргинина, конкурентного природного ингибитора всех изоформ NOS. Активность NOS определяли по аккумуляции стабильных метаболитов NO и выражали в нмоль (NO_2^-) мг^{-1} белка 22 ч $^{-1}$.

Содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [9].

Статистика. Достоверность различий оценивали на основе параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и постдисперсионного анализа Холм–Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5 for Windows. Анализ корреляций проводили по коэффициенту линейной корреляции Пирсона (r). В качестве критерия достоверности принимали $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. Результаты изучения аргининзависимой продукции NO в брюшной полости и головном мозге мышей на 11-й день развития АКЭ представлены на рис. 1. В гомогенатах и цитоплазме тканей мозга активность NO синтазы возрастает в 2 и 4 раза, соответственно, по

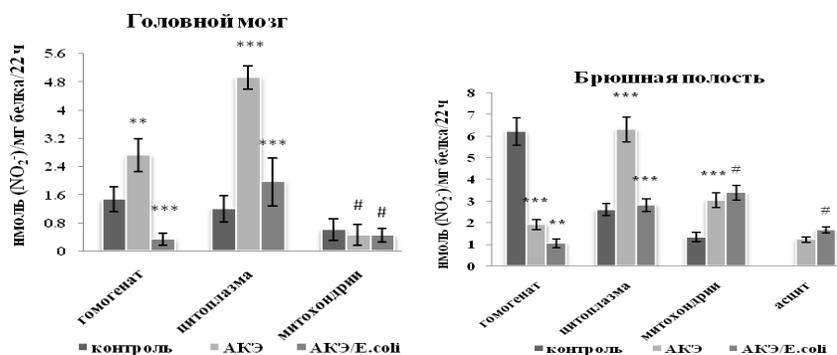


Рис. 1. Активность синтазы оксида азота в головном мозге и брюшной полости мышей при АКЭ и *E. coli*-терапии. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Здесь и далее достоверность параметров (p), оцениваемых при АКЭ, определялась по сравнению с контрольными значениями, а после *E. coli*-терапии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

сравнению с контрольными животными, тогда как в митохондриях изменений не обнаружено. В то же время и в цитоплазме, и в митохондриях перитонеальных лейкоцитов детектируется повышение NO синтазной актив-

ности в 2.4 и 2.3 раза, соответственно. Интересно, что одновременно в гомогенатах лейкоцитов наблюдается падение активности фермента втрое. Не исключено, что это связано с проникновением NO в клеточную мембрану и активным метаболизированием с уменьшением его биодоступности. Липофильность и малые размеры позволяют NO свободно диффундировать через клеточные мембраны и компоненты межклеточного вещества, причем взаимодействие NO с кислородом происходит в 300 раз быстрее в гидрофобных областях мембраны, чем в окружающей водной среде [10]. Благодаря наличию неспаренного электрона на внешней π -орбитали NO активно взаимодействует с металлами, металлсодержащими пептидами и белками, активными формами кислорода и пр. [11]. Такое активное взаимодействие, по-видимому, происходит в активированных перитонеальных лейкоцитах при АКЭ, в отличие от клеток мозга.

В органах и тканях млекопитающих и человека функционируют разные изоформы NOS: конститутивные, нейрональная и эндотелиальная которые в центральной и периферической нервной системе участвуют в нейротрансмиссии, разных сигнальных путях и регуляции мозгового кровообращения, и индуцибельная изоформа, iNOS, функционирующая в рамках врожденной иммунной системы [12]. Недавно открыта митохондриальная NOS, представленная в основном конститутивными изоформами NOS [13]. Тем не менее позитивный иммуноблоттинг подтвердил конститутивную экспрессию iNOS в митохондриях и субмитохондриальных мембранах мотонейронов и клеток Шванна мышей [14, 15]. Нами конститутивное функционирование iNOS выявлено в митохондриях префронтального кортекса и подкорковых структур лимбической системы мозга крыс [16]. Таким образом, проявление активности NOS, определяемой в цитоплазме и митохондриях, зависит от функционирования вышеперечисленных форм, и их вклад при АКЭ еще предстоит выяснить.

Следует отметить, что iNOS – единственная изоформа, способная продуцировать NO в течение нескольких дней и стойко повышать уровень активных форм азота (АФА) [17]. Экспрессия iNOS усиливается при иммунном и воспалительном ответе, в том числе и в мозге [18]. И возможно, именно iNOS вносит большой вклад в повышение содержания АФА в гомогенатах и субклеточных фракциях клеток мозга при АКЭ. Более того, устойчивое повышение концентрации аргинина, которое также выявлено нами в клеточных компартментах мозга при АКЭ [6], по-видимому, вносит свой вклад в стимулирование общей активности NOS. L-аргинин способствует самосборке мономеров NOS в активные димеры с последующей стабилизацией их структуры, и особенно iNOS, которая является высокопроизводительной формой фермента и поэтому в большей степени зависит от концентрации L-аргинина в среде и активируется при его повышении [14, 19], что может быть связано также со стимулированием транспорта аминокислоты. Транспорт циркулирующего аргинина через клеточную мембрану осуществляется в большинстве типов клеток млекопитающих, в том числе и опухолевых, Na^+ -независимой системой транспорта катионных аминокислот [20]. Цитокины (интерферон-гамма, фактор некроза опу-

холи – альфа) и ЛПС влияют на активность транспортера аргинина, который под их воздействием коиндуцируется с NOS, поставляя для последней субстрат [21]. В [29] показано, что NOS и транспортер аргинина колокализованы в плазматической мембране, что позволяет осуществлять избирательное снабжение аминокислоты для NO синтазы [22].

Изучение субклеточного содержания продуктов реакции NOS, цитруллина и стабильных продуктов окисления оксида азота, так называемых активных форм азота (АФА) показало, что при АКЭ в головном мозге во всех исследуемых фракциях возрастает содержание АФА и цитруллина (рис. 2). Уровень АФА повышается в 3, 1.8 и 3.6 раза, а цитруллина – в 2.6, 2.2 и 2.2 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях, соответственно.

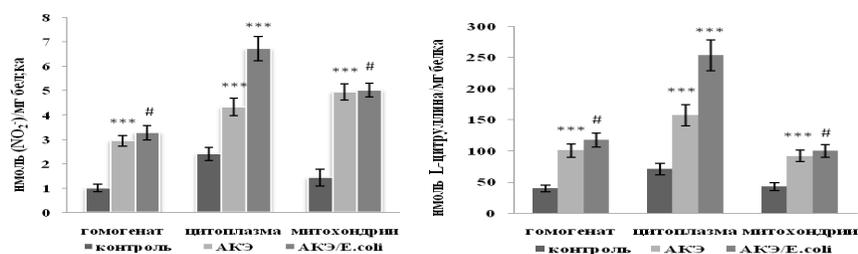


Рис. 2. Субклеточные сдвиги содержания стабильных метаболитов оксида азота и L-цитруллина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) и *E. coli*-терапии. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

Оксид азота, а также стабильные продукты его окисления, нитриты/нитраты являются хаотропными агентами, которые влияют на свойства клеточных мембран и могут в зависимости от концентрации вызывать внутриклеточное перераспределение белков из растворимого в мембраносвязанное состояние. Так, NO-генерирующие соединения в концентрации более $10^{-5}M$ приводят к локальному нарушению целостности мембран клеток крови, а NO-индуцированная гиперполяризация плазматической мембраны уменьшает микровязкость аксолеммы, влияя на частоту их ритмической активности [23]. Отметим, что NO принадлежит к новому семейству сигнальных молекул со свойствами нейротрансмиттера и регулирует секрецию дофамина, норадреналина, серотонина, ацетилхолина и прочих нейромедиаторов, включаясь в процессы синаптической нейротрансмиссии [19, 24].

Противоопухолевое действие *E. coli*-терапии сопровождается повышением уровня АФА и цитруллина в цитоплазме клеток мозга, тогда как в гомогенате и цитоплазме изменения незначительны и недостоверны. Наблюдается высокая степень достоверной положительной корреляции между содержанием АФА и L-цитруллина в гомогенатах ($r=0.98$, $p<0.0001$), цитоплазме ($r=0.87$, $p<0.0001$) и митохондриях ($r=0.86$, $p<0.0001$), что подтверждает их метаболическую связь и активирование системы NOS/NO. Примечательно, что NO проявляет эффективное антимикробное действие не только в отношении ряда внутриклеточных бактерий и паразитов, но и

таких экстрацеллюлярных бактерий, как *E. coli* [25], которая, по-видимому, стимулирует ферментативную систему продукции NO в головном мозге мышей с АКЭ при *E. coli*-терапии. В то же время показано, что стресс-гормоны способствуют росту непатогенных штаммов *E. coli* через взаимодействие с такими катехоламинами хозяина, как адреналин и норадреналин [26], на уровень которых также влияет система NOS/NO. Отметим, что увеличение уровня биодоступного NO, вызванное обработкой *E. coli*, может подавлять iNOS. Так, 18-кратное повышение экспрессии iNOS цитокин-стимулированными гепатоцитами крыс подавляется донорами NO (S-нитрозо-N-ацетил-D,L-пенициламин и V-PYRRO/NO) и восстанавливается его скавенджерами (эритроциты) [27]. Подобный эффект проявляется в наших экспериментах в виде снижения общей активности NOS в цитоплазме клеток мозга и имеет защитное значение, поскольку длительная генерация NO в результате функционирования iNOS сопровождается гиперпродукцией активных форм азота, оказывающих повреждающее действие в клетках и тканях [28].

В клеточной линии мышинных макрофагоподобных RAW264.7 клеток митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) опосредует ЛПС-индуцированную экспрессию iNOS, в то время как МАРК фосфатаза-1 переключает метаболизм аргинина с продукции NO на образование орнитина [29]. В то же время авторы отмечают, что сверхэкспрессия МАРК фосфатазы-1, равно как ее дефицит, не оказывает существенного влияния на экспрессию изоформ аргиназы, но влияет на экспрессию iNOS. Эти данные при дальнейшем исследовании могут пролить свет на процессы, влияющие на альтернативные пути превращения аргинина при АКЭ и после *E. coli*-терапии.

Таким образом, развитие асцитной карциномы Эрлиха сопровождается нарушениями интрацеллюлярного обмена аргинина в головном мозге, и более полное понимание механизмов, вовлеченных в патогенез рака, требует изучения и исследования системной роли и регуляции многих ферментов и путей, участвующих в метаболической судьбе аргинина.

Институт биохимии
им. Г.Х. Бунятыяна НАН РА

О. Х. Авагян, Н. Х. Алчуджян, Н. О. Мовсесян, А. А. Агабабова

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

Сообщение 2

Обнаружено активирование синтазы оксида азота в цитоплазме головного мозга и цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости мышей и ассоциированное повышение содержания L-цитруллина и стабильных метаболитов оксида азота в исследуемых клеточных компартментах при асцитной карциноме Эрлиха. При противоопухолевом лечении клиническими авирулентными штам-

мами *Escherichia coli* нормализуется активность синтазы оксида азота в клетках головного мозга так же, как и в цитоплазме перитонеальных лейкоцитов.

Հ. Խ. Ավագյան, Ն. Խ. Ալչուժյան, Ն. Հ. Մովսեսյան, Ա.Ա. Աղաբաբովա

L-արգինինի նյութափոխանակության պատկերը մկների գլխուղեղում Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի ժամանակ և հակաուռուցքային բուժման ազդեցությունը *Escherichia coli*-ի ոչ ախտածին շտամների օգտագործմամբ. ազոտի օքսիդի սինթազ: Հաղորդում 2

Առաջին անգամ ազոտի օքսիդի սինթազի խթանումը բացահայտվել է գլխուղեղի հյուսվածքների բջջապլազմայում և որովայնի լեյկոցիտների բջջապլազմայում և միտոքոնդրիումներում, ինչպես նաև L-ցիտրուլինի ու ազոտի օքսիդի նյութափոխանակության կայուն միացությունների մակարդակի աճը հետազոտվող բջջային բաղադրամասերում մկների Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի ժամանակ: *E. coli*-ի ոչ ախտածին կլինիկական շտամների հակաուռուցքային բուժումն ուղեկցվում է կարգավորիչ ազդեցությամբ ազոտի օքսիդի սինթազի ակտիվության վրա գլխուղեղի և որովայնի լեյկոցիտների բջջապլազմայում:

H. Kh. Avagyan, N. Kh. Alchujyan, N. H. Movsesyan, A. A. Aghababova

L-arginine Metabolic Profile in the Mice Brain at Ehrlich Ascites Carcinoma and Effects of Anticancer Therapy with Avirulent Strains of *Escherichia coli*: Nitric Oxide Synthase. Report 2

Up-regulation of the nitric oxide synthase (NOS) in cytoplasm of the brain tissues and in cytoplasm and mitochondria of the peritoneal leucocytes in mice, as well as the associated increase in the level of L-citrulline and nitric oxide stable metabolites in the studied cellular compartments are observed at Ehrlich ascites carcinoma. The NOS activity is normalized in cytoplasm of brain tissues and peritoneal leucocyte during cancer therapy with avirulent clinical strains of *Escherichia coli*.

Литература

1. Mori M. - J. Nutr. 2007. V. 137. P. 1616S–1620S.
2. Burke A. J., Sullivan F. J., Giles F. J., Glynn S. A. - Carcinogenesis. 2013. V. 34. № 3. P. 503–512.
3. Աვაգյան Օ. Խ., Ալչուժյան Ն. Խ., Մովսեսյան Ն. Օ., Աղաբաբովա Ա. Ա., Մովսեսյան Օ. Ա., Օգաննիսյան Մ. Ք., Բարսեղյան Կ. Ա., Գեորգյան Գ. Ա. - Мед. наука Армении. 2013. Т. 53. № 2. С. 22-33.
4. Salimuddin A., Nagasaki A., Gotoh T., Isobe H., Mori M. - Am. J. Physiol. 1999. V. 277. E110–E117.
5. Яковлев М. Ю. - Физиол. человека. 2003. Т. 29. № 4. С. 98–109.
6. Աვაգյան Օ. Խ., Ալչուժյան Ն. Խ., Մովսեսյան Ն. Օ., Մինասյան Գ. Գ. - Доклады НАН РА. 2013. Т. 113. № 3. С. 295-302.

7. Schmidt H. H. H.W., Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: Feelisch M., Stamler J.S., eds. *Methods in Nitric Oxide Research*. Wiley, Chichester. 1996. P. 491–497.
8. Moore R. B., Kauffman N. J. - *Anal. Biochem.* 1970. V. 33. № 2. P. 263–272.
9. Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R. J. - *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
10. Pfeiffer S., Mayer B. In: *Nitric oxide* (Eds. R.J. Gryglewski, P. Minuz) IOS Press. 2001. P. 35–44.
11. Bruckdorfer R. - *Mol. Aspects Med.* 2005. V. 26. P. 3–31.
12. Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. - *Biochem. J.* 2001. V. 357. P. 593–615.
13. Parihar M. S., Parihar A., Villamena F. A., Vaccaro P.S., Ghafourifar P. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 367. № 4. P. 761–767.
14. Chen K., Northington F. J., Martin L. - *J. Brain Struct. Funct.* 2010. V. 214. № 2-3. P. 219–234.
15. Jankord R., Solomon M. B., Alibert J., Flak J. N., Zhang R., Herman J. P. - *Endocrinology.* 2011. V. 152. № 2. P. 629–638.
16. Barseghyan K.A., Alchujyan N. Kh., Aghababova A. A., Movsesyan N. H., Avagyan H. Kh., Movsesyan H.A., Melkonyan L. H., Hayrapetyan H. L., Guevorkyan A. G., Kevorkian G. A. - *Eur. Chem. Bull.* 2013. V. 2. № 6. P. 373–382.
17. Lowenstein C. J., Padalko E. - *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 2865–2867.
18. Carpentier P.A., Begolka W.S., Olson J.K., Elhofy A., Karpus W.J., Miller S.D. - *Glia.* 2005. V. 49. № 3. P. 360–374.
19. Серая И. П., Нарциссов Я. П. - *Успехи совр. биол.* 2002. Т. 122. № 3. С. 249–258.
20. Cendan J.C., Souba W.W., Copeland E.M., Lind D.S. - *Ann. Surg. Oncol.* 1995. V. 2. P. 257–265.
21. Cendan J. C., Topping D. L., Pruitt J., Snowdy S., Copeland E. M., Lind D. S. - *J. Surg. Res.* 1996. V. 60. P. 284–288.
22. Verrey F., Closs E.I., Wagner C.A., Palacin M., Endou H., Kanai Y. - *Pflugers Arch.* 2004. V. 447. P. 532–542.
23. Ульянова Н. А., Максимов Г. В., Чурин А. А., Рубин А. Б. - *Биофизика.* 2005. Т. 50. № 2. С. 289–296.
24. Orlando G. F., Wolf G., Engelmann M. - *Amino Acids.* 2008. V. 35. №1. P. 17–27.
25. Chakravorty D., Hensel M. - *Microb. Infect.* 2003. V. 5. P. 621–627.
26. Freestone P.P., Williams P. H., Haigh R.D., Maggs A. F., Neal C.P., Lyte M. - *Shock.* 2002. V. 18. P. 465–470.
27. Chang K., Lee S.J., Cheong I., Billiar T. R., Chang H.T. - *Exp. Mol. Med.* 2004. V. 36. № 4. P. 311–324.
28. Gutowski M., Kowalczyk S. - *ActaBiochim. Pol.* 2013. V. 60. P. 2–16.
29. Nelin L.D., Wang X., Zhao Q., Chicoine L.G., Young T.L., Hatch D.M., English B.K., Liu Y. - *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. V. 293. № 2. C632–C640.