

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 577.152:851.48+616.34-006

**Особенности субклеточного метаболизма и влияние
бактериальной терапии при асцитной карциноме****Эрлиха: аргинин****Сообщение 1**

**О.Х. Авагян, Н.Х. Алчуджян, Н.О. Мовсесян,
А.А. Агабабова, О.А. Мовсесян, М.Р. Оганнисян,
К.А. Барсегян, Г.А. Геворкян**

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: *Escherichia coli*, активные формы азота, аргиназа, асцитная карцинома Эрлиха, лейкоциты, митохондрии, орнитин, цитоплазма, цитруллин

Регулирование метаболизма L-аргинина является новой перспективной стратегией в лечении рака, аутоиммунных или нежелательных иммунных отклонений [23]. L-аргинин – условно незаменимая аминокислота млекопитающих – является необходимым иммунонутриентом: влияет на активность Т-клеточного иммунитета (усиливает продукцию интерлейкина-2, лимфоцитов и рецепторную активность), препятствуя развитию иммунодефицита [31]. Аргиназа расщепляет аргинин на орнитин и мочевину и является основным ферментом, лимитирующим содержание аргинина в органах и тканях [7]. В последние годы интерес к этому ферменту возрос, поскольку выяснилось, что он участвует в механизмах иммуносупрессии и, снижая противоопухолевый иммунитет, способствует ускользанию опухоли от иммунологического надзора и малигнизации тканей [8, 14]. В органах и тканях аргиназа представлена двумя изоформами: цитоплазматической (A1) и митохондриальной (A2) [17, 21]. Однако роль их в патогенезе рака недостаточно исследована. Нами изучены сдвиги в активности изоформ аргиназы и продуктов дихотомического метаболизма аргинина в перитонеальных лейкоцитах на мышинной модели асцитной карциномы Эрлиха и их вовлечение в механизмы бактериальной онкотерапии.

Материал и методы

Опыты осуществлялись 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: контрольная – здоровые мыши и две опытные – животные с трансплантированной асцитной карциномой Эрлиха (АКЭ) и мыши с АКЭ, подвергнутые терапии клиническими авирулентными штаммами *E. coli* (любезно предоставленными доктором И.С. Акобян, медицинский центр “Арменикум”).

Формирование асцитной карциномы Эрлиха у мышей осуществляли суспензией клеток АКЭ, отбираемой от белых беспородных мышей-опухоленосителей, у которых культура клеток АКЭ поддерживалась в асците брюшной полости путем их инокуляции (культура клеток АКЭ любезно предоставлена Г.В. Степаняном, Институт тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна НАН РА). Трансплантацию клеток АКЭ осуществляли введением в брюшную полость мышей неразведенной асцитной жидкости в объеме 0,5 мл (1×10^7 кл/мл) [2]. Асцитную жидкость забирали шприцем из брюшной полости декапитированных мышей-опухоленосителей. Животных декапитировали на 11-е сутки развития опухоли, когда переход экспоненциальной фазы роста в константную (плато) стабилизирован, число клеток в асците практически постоянное и объем асцитной жидкости достигает 5–12 мл [25].

Бактериальная обработка. Через 2 дня после трансплантации одну из опытных групп животных одноразово асептически обрабатывали внутриглазным введением взвеси живых необработанных бактерий *E. coli* (1×10^9 клеток /мл); параллельная опытная группа мышей с АКЭ служила контролем для оценки влияния бактерий. В каждом эксперименте опухолевые клетки перевивались 12 мышам ($n=6$ /группу).

Противоопухолевый эффект. Влияние бактериальной терапии оценивали по изменениям в 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 [19]:

$$СВВ = (\text{день первого случая смерти} + \text{день последнего случая смерти})/2;$$

$$ПСВВ = [(СВВ \text{ группы АКЭ}/E. coli / СВВ \text{ группы АКЭ}) - 1] \times 100.$$

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 Na_2CO_3 , без глутамина) и культивировали в термостате при 37°C в течение 24 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин [2]. Из брюшной полости опытных групп мышей с АКЭ вытягивали асцитную жидкость, из которой клетки осаждали в вышеуказанном режиме центрифугирования. Осажденные клетки, полученные от контрольных и/или опытных животных, разводили в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4, и выделяли субпопуляции перитонеальных лейкоцитов.

Субпопуляции перитонеальных лейкоцитов получали из взвеси клеток центрифугированием в двуступенчатом градиенте плотности фикокол-верографина (1,129 и 1,087 г/см³) при 3000 об/мин 20 мин [3]. Мононуклеары и гранулоциты получали из верхнего и нижнего интерфазных колец соответственно, дважды промывали, разводили в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4, содержащем 0,25 М сахарозу, и объединенную фракцию мононуклеаров и гранулоцитов гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (1500 об/мин) в течение 3-5 мин, после чего выделяли исследуемые клеточные компартменты.

Выделение митохондрий и цитоплазмы перитонеальных лейкоцитов осуществляли методом дифференциального центрифугирования [1]. Гомогенаты объединенной фракции перитонеальных мононуклеаров и гранулоцитов центрифугировали при 1200 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции. Надосадочную жидкость центрифугировали при 11000 об/мин 20 мин при 4°C и получали в супернатанте – цитоплазму, а в осадке – митохондрии.

Активность аргиназы определяли по образованию орнитина в реакционной смеси методом Iyamu et al. [16] в собственной модификации: 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 вышеуказанные буферные растворы 0,1 М L-аргинина и 0,05 М $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Реакцию останавливали добавлением к пробам 10% трихлоруксусной кислоты (в пропорции 1:2 по объему) и центрифугировали при 15 000 об/мин 3 мин при комнатной температуре на настольной микроцентрифуге фирмы Eppendorf (США). В параллельных контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 60 мМ L-валина, неконкурентного не-селективного ингибитора аргиназы. Супернатанты депротеинизированных проб смешивали с 4,5 % 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 $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{ч}^{-1}$.

Определение содержания L-аргинина. Пробы депротеинизировали 0,5N NaOH и 10% ZnSO_4 (в пропорции 1:1:1 по объему), центрифуги-

ровали при 15 000 об/мин 3 мин и в супернатантах модифицированным методом Akamatsu, Watanabe [4] определяли содержание аргинина. Супернатанты проб смешивали с рабочим раствором (смесь растворов: 0,02% 8-оксихинолина в 96% этиловом спирте с 2,5% сульфосалицилата натрия в 0,01 М растворе глицина и 2,5% NaOH, в пропорции 1:1:1 по объему) и 1% гипобромитом натрия в соотношении 3:1:0.2 (по объему), через 15 мин оценивали содержание L-аргинина спектрофотометрически при длине волны 525 нм и выражали в мкмоль L- аргинина · мг⁻¹ белка.

Определение содержания активных форм азота. В супернатантах депротеинизированных, как указано выше, проб определяли содержание стабильных интермедиатов оксида азота (NO), так называемых активных форм азота (АФА)(окислы азота (NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O₄, N₂O₃), нитрозотиолы и нитрозамины), неспецифической реакцией диазотирования с использованием свежеприготовленного реактива Грисса-Илосвая (0.3% р-р сульфаниловой кислоты в 30% уксусной кислоте смешивали перед опытом с 0.1% раствором альфа-нафтиламина в 4,4 % уксусной кислоте, в пропорции 1:1 по объему), который добавляли к пробам в соотношении 1:1 по объему, смешивали и спустя 15 мин спектрофотометрировали при длине волны 546 нм [29]. Содержание АФА выражали в нмоль (NO₂⁻) · мг⁻¹ белка.

Определение содержания L-цитруллина осуществляли модифицированным методом Moore, Kauffman [20]. В пробах осаждали белки 10% трихлоруксусной кислотой (в соотношении 1:2 по объему соответственно) и центрифугировали при 15 000 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 1:1:1 (по объему), нагревали 10 мин в кипящей водяной бане и после охлаждения содержание L-цитруллина определяли спектрофотометрически при длине волны 490 нм, которое выражали в нмоль L-цитруллина · мг⁻¹ белка.

Содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [18].

Все спектральные измерения проводили на спектрофотометре Specol 211(Германия).

Статистика. Достоверность различий оценивали с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и последующим постдисперсионным анализом Холм-Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5 for Windows. Анализ корреляций проводили на основе расчета коэффициента линейной корреляции Пирсона (r). В качестве критерия достоверности принимали p<0.05.

Результаты и обсуждение

Прежде всего следует отметить, что у мышей различных линий

кинетики роста опухоли, а следовательно, и метаболический паттерн могут иметь свои особенности, чтобы исключить их в нашей работе

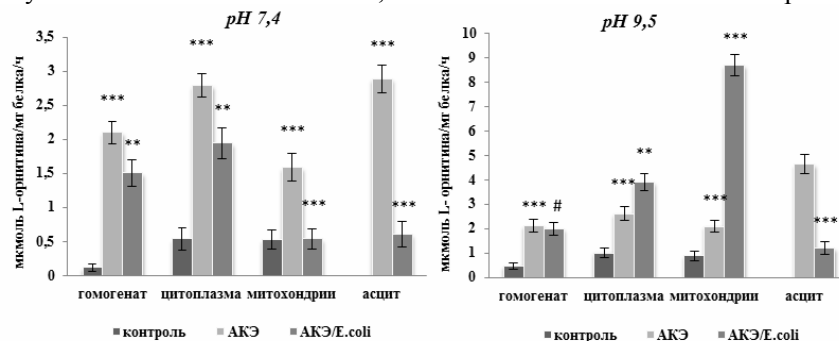


Рис. 1. Аргиназная активность в клеточных компартментах перитонеальных лейкоцитов и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (AKЭ) и *E. coli*-терапии. Здесь и далее результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность параметров (p), оцениваемых при АКЭ, определялась по сравнению с контрольными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

использовались беспородные мыши. Как видно из рис. 1, аргиназная активность, определяемая на основе аргининзависимой продукции орнитина, в условиях *in vitro* зависит от pH инкубационной среды, причем это наблюдается во всех исследуемых фракциях перитонеальных лейкоцитов (совокупность мононуклеаров и гранулоцитов), а именно: гомогенатах лейкоцитов (ГЛ), их цитоплазме и митохондриях. У здоровых мышей при pH 9,5, оптимальном для обеих изоформ аргиназы (при том что они активны и при pH 7,2 [21,30], что подтвердилось и в наших опытах), активность аргиназы в ГЛ, а также изоформ А1 в цитоплазме и А2 в митохондриях в 3,9; 1,9 и 1,7 раза выше, по сравнению с соответственно определяемыми при физиологическом pH 7,4. Интересно, что на 11-й день развития АКЭ стимулирующее влияние основной среды на фермент снижается. В то же время при pH 7,4 аргиназная активность в ГЛ примерно в 17 раз выше, чем у контрольных мышей, одновременно возрастает активность изоформ А1 и А2, в 5,2 и 3 раза соответственно. При pH 9,5 в лейкоцитах мышей с АКЭ наблюдалась следующая картина внутриклеточного распределения аргиназной активности – ГЛ : цитоплазма : митохондрии = 1 : 1,3 : 0,8, а при pH 7,4 – 1 : 1,2 : 1 соответственно, причем сдвиги в активности аргиназы во всех исследуемых фракциях менее выражены, а именно: в ГЛ она возрастает в 4,6 раза и активность А1 и А2 в 2,6 и 2,3 раза по сравнению с контролем соответственно. В асците, содержащем опухолевые клетки и лейкоциты, активность фермента при pH 9,5 более чем в два раза выше по сравнению с ГЛ, что, вероятно, является проявле-

нием аргиназной активности в самих опухолевых клетках. Отметим, что экспрессия аргиназы в первичных очагах развития рака человека, мышей и раковых клеточных линий связана, с одной стороны, с ее участием в синтезе полиаминов, промотирующих рост опухоли, а с другой – с подавлением аргиназой NO-опосредуемой цитотоксичности в отношении опухоли [22]. Примечательно, что в асците pH 9,5 стимулирует аргиназную активность в 1,6 раза по сравнению с pH 7,4.

Почти половина больных раком не поддается терапии общепринятыми методами, и поэтому продолжается поиск альтернативных подходов подавления и предотвращения злокачественного роста клеток. Бактерии могут подавлять канцерогенез, индуцируя специфический и неспецифический противоопухолевый иммунный ответ, выделяя токсины, они обладают такими преимуществами, как подвижность, способность одновременно экспрессировать и транспортировать многие терапевтические белки и, наконец, возможность элиминации бактерий антибиотиками – все это открывает перспективы экспериментальной стратегии использования бактерий в лечении рака [6, 26]. Во второй половине прошлого века множеством опытов было доказано, что при обработке мышей эндотоксином (липополисахаридом – ЛПС) и/или грамотрицательными бактериями, включая *bacillus Calmette-Guerin*, *Escherichia coli*, в состав бактериальных стенок которых входит ЛПС, происходит выброс активированными макрофагами фактора некроза опухоли с последующим селективным лизисом опухолевых клеток [9, 11]. Причем авторами убедительно продемонстрировано, что живые бактерии эффективнее подавляют канцерогенез, чем ослабленные или убитые. Недавно на мышинной модели B16-F10-индуцированного метастазирующего рака легких было показано дозозависимое влияние ЛПС, низкие дозы которого стимулируют, а высокие (10 мкг/мышь) – снижают опухолевый рост, вызывая повышенный приток CD4(+) регуляторных Т-клеток [28].

В наших экспериментах одноразовая обработка мышей с АКЭ суспензией цельных клеток авирулентного клинического штамма *E. coli* увеличивает их среднее время выживания на 75%, при этом для группы мышей с АКЭ, не принимавших лечения, последний случай смерти зафиксирован на 13-й день после трансплантации, а для животных, подвергнутых *E. coli*-терапии, – на 22-й день. Кроме того, бактериальная обработка более чем в четыре раза снижает объем асцитной жидкости, соответственно влияя на массу тела. Подобные данные получены другими авторами при обработке мышей с АКЭ фаго- и термолизатами *E. coli* причем в сочетании их с химиотерапией (комбинированный препарат доксорубина, циклофосфамида и фторурацила) достигалась 80-90% регрессия опухоли, а у 13% животных полное ее исчезновение на 65-69-й дни лечения [12]. Авторы отмечают, что отсутствие побочных эффектов и повышение эффективности химиотерапии свидетельствуют в пользу

использования *E. coli* в дополнение к основному лечению злокачественных опухолей [12].

На второй день перевивания АКЭ одна группа мышей, подвергалась однократной обработке суспензией цельных клеток клинического штамма *E. coli* (см. *Материал и методы*). Через 9 дней после обработки, то есть на 11-й день после трансплантации АКЭ, определение аргиназной активности во фракциях перитонеальных лейкоцитов и асците леченых животных показало, что *in vitro* в зависимости от pH реакционной среды картина ее сдвигов кардинально меняется. Так, при pH 7,4 после лечения наблюдается снижение активности А2 до нормы. Несколько менее выражены изменения в общей активности аргиназы ГЛ и таковой А1, которые одинаково снижаются – примерно в 1,4 раза, по сравнению с нелечеными животными, хотя и остаются выше нормы, а в асците аргиназная активность резко падает – в 4,7 раза. Примечательно, что в основной среде (pH 9,5) только в асците подтверждается подавляющее влияние *E. coli*-терапии на аргиназу, где ее активность снижается в 3,85 раза, в ГЛ достоверных изменений не выявляется, а активность А1 и А2 повышается в 1,5 и 4 раза, соответственно по сравнению с нелечеными животными с АКЭ. Таким образом, в условиях *in vitro* при pH 9,5 искажается картина изменений при АКЭ аргиназной активности, что необходимо иметь в виду при экспериментальных исследованиях. Отметим, что pH в злокачественных опухолях более низкая, чем в непораженных тканях. В асците (представленном смесью лейкоцитов и клеток АКЭ) активность аргиназы ниже чем в ГЛ: при pH 7,4 – в 2,5 раза, при pH 9,5 – в 1,7 раза. Из этого следует, что аргиназная активность не только полностью подавляется в самих опухолевых клетках, но и снижается в лейкоцитах, свидетельствуя о значительных метаболических пертурбациях, вызванных обработкой *E. coli*.

Сдвиги в аргиназной активности при АКЭ и *E. coli*-терапии подтверждаются изменениями содержания одного из продуктов аргиназной реакции, орнитина (рис. 2). У мышей с АКЭ в ГЛ, цитоплазме и митохондриях уровень орнитина возрастает в 1,9; 2,5 и 1,6 раза соответственно. Примечательно, что возрастание экспрессии и активности А2 и ассоциированное повышение образования орнитина продемонстрировано при АКЭ, а также в клетках саркомы и саркомы 180 [5]. Отметим, что возрастание содержания орнитина, детектируемое при АКЭ в гомогенатах и субклеточных фракциях исследуемых клеток, не нивелировало сдвиги в аргиназной активности, хотя *in vivo* орнитин ингибирует фермент по принципу обратной связи, это связано с тем, что в культурах клеток орнитин в подобных концентрациях не подавляет аргиназную активность [30].

Любопытно, что одновременно в этих фракциях, несмотря на повышение активности аргиназы, наблюдается возрастание концентрации аргинина, что может быть обусловлено подавлением иных аргинин-

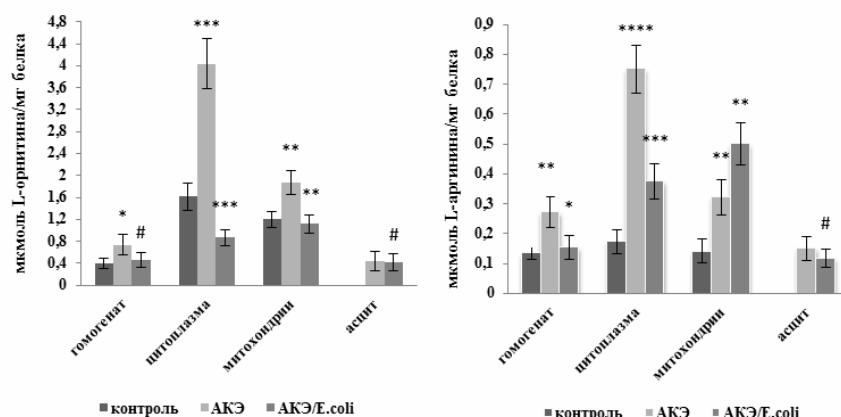


Рис. 2. Содержание L-орнитина и L-аргинина в клеточных компартментах перитонеальных лейкоцитов и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (AKЭ) и *E. coli*-терапии

метаболизирующих систем, таких как аргининдеиминаза, аргининдекарбоксилаза и др., и, вероятно, является одной из причин активирования обеих изоформ аргиназы с ассоциированным увеличением продукции орнитина в перитонеальных лейкоцитах при АКЭ.

E. coli-обработка мышей с АКЭ в основном нормализует уровень орнитина во всех исследуемых фракциях и снижает содержание аргинина в ГЛ и цитоплазме, и только в митохондриях он несколько повышен. Отметим, что положительная корреляция между аргиназной активностью и содержанием орнитина наблюдается в ГЛ ($r=0.84$, $p=0.0002$), цитоплазме ($r=0.63$, $p=0.0053$) и, особенно, митохондриях ($r=0.99$, $p<0.0001$). Если уменьшение концентрации орнитина, по всей вероятности, обусловлено подавлением активностей A1 и A2 при бактериальной терапии, то снижение уровня аргинина в гомогенатах и клеточных компартментах может быть вызвано активированием ранее подавленных других ферментов, катаболизирующих аргинин, и/или стимулированием его выброса в интрацеллюлярное пространство, а, возможно, и другими причинами, которые еще предстоит выяснить. Интересно, что в асците не наблюдается статистически значимых сдвигов в уровне аргинина и орнитина, хотя и аргиназная активность в нем резко падает, что опосредованно свидетельствует о функционировании в опухолевых клетках путей, поддерживающих необходимый баланс этих аминокислот в опухоли.

При раке в опухолевой ткани, крови и лимфоидных органах аккумулируются активированные супрессорные клетки костномозгового происхождения, основную долю которых составляют гранулоциты, а также моноциты/макрофаги, в которых возрастает активность A1 и индуцибельной синтазы оксида азота и связанная с последней продукция АФА, все они

вкупе подавляют Т-клеточный ответ, способствуя малигнизации, и таким образом снижают терапевтическую эффективность антиканцерогенных вакцин и других форм иммунотерапии, почему и эти ферменты оправданно рассматриваются как мишень для противоопухолевой терапии [10, 13]. Данные о коиндукции A1 и iNOS с вовлечением их в процессы иммуносупрессии при раке продемонстрированы рядом авторов [24, 27].

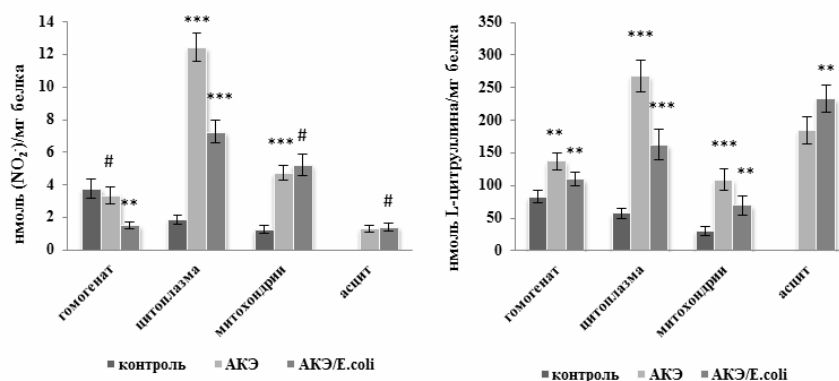


Рис. 3. Содержание активных форм азота (АФА) и L-цитруллина в клеточных компартментах перитонеальных лейкоцитов и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) и *E. coli*-терапии

Исходя из вышесказанного нами одновременно были изучены сдвиги в содержании продуктов NO синтазной реакции, стабильных интермедиатов NO и L-цитруллина. Как видно из рис. 3, при АКЭ уровень L-цитруллина возрастает в ГЛ, цитоплазме и митохондриях в 1,7; 4,7 и 3,6 раза, а АФА в 6,7 и 3,8 раза в цитоплазме и митохондриях соответственно. В ГЛ не детектируется значимых сдвигов в концентрации АФА. Это может быть связано с тем, что в гомогенатах активное взаимодействие NO с широким спектром молекулярных мишеней, таких как активные формы кислорода, низкомолекулярные тиолы, сульфгидрильные группы белков, металлы, гемопротеиды и т.д. [15], нивелирует данные по интенсивности продукции NO, тогда как в цитоплазме и митохондриях синтез последнего превалирует над его метаболизированием. Причем отклонения от нормы свидетельствуют не только о стимулировании или подавлении NO синтазной активности, но и других метаболических превращений. Это подтверждается результатами, полученными после обработки больных мышей *E. coli*, а именно: подавление нитрергического ответа выявляется во всех исследуемых фракциях на уровне сдвигов в содержании цитруллина, а снижение содержания АФА обнаруживается только в ГЛ и цитоплазме, тогда как в митохондриях значимых изменений не наблюдалось. Приме-

чительно, что в асците также не зафиксировано сдвигов АФА, хотя уровень цитруллина возрастает. Повышение содержания цитруллина в асците опосредованно может указывать на активирование в них NO синтазы и усиление апоптических процессов. Однако это требует дополнительных исследований.

Таким образом, нами впервые продемонстрировано модулирующее влияние *E. coli*-терапии на субклеточный метаболический паттерн аргинина, в частности на активность изоформ аргиназы в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей с АКЭ, что необходимо учитывать при использовании бактерий в адьювантной терапии онкологических заболеваний.

Поступила 27.02.13

**Ենթաբջջային նյութափոխանակության
առանձնահատկությունները և բակտերիալ բուժման
ազդեցությունը Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի
ժամանակ. արգինին
Հադոբդում 1**

**Հ.Խ. Ավագյան, Ն.Խ. Ալշուջյան, Ն.Հ. Մովսեսյան,
Ա.Ա. Աղաբաբովա, Հ.Ա. Մովսեսյան, Մ.Ռ. Հովհաննիսյան,
Կ.Ա. Բարսեղյան, Գ.Ա. Գևորգյան**

Escherichia coli-ի կլինիկական շտամների հակաուռուցքային ազդեցությունը Էրլիխի ասցիտային կարցինոմակիր մկների վրա ուղեկցվում է նրա կարգավորիչ ազդեցությամբ արգինազի իզոմերի ակտիվության վրա որովայնի լեյկոցիտների բջջային բաղադրամասերում և ասցիտում: *Escherichia coli*-ի բուժումը ազդում է նաև արգինինի և նրա նյութափոխանակության արգասիքների (օրնիտինի, որը առաջանում է արգինազի ռեակցիայում, ցիտրուլինի և ազոտի օքսիդի կայուն միացությունների, որոնք առաջանում են արգինինից ազոտի օքսիդի սինթազի ռեակցիայում) քանակի վրա: Ստացված տվյալները անհրաժեշտ է հաշվի առնել *E. coli*-ի կիրառման ժամանակ հակաուռուցքային բուժման գործընթացում:

Subcellular metabolism peculiarities and effect of bacterial therapy in Ehrlich ascites carcinoma: arginine Report 1

**H.Kh. Avagyan, N.Kh. Alchujyan, N.H.Movsesyan, A.A. Aghababova, H.A.
Movsesyan, M.R. Hovhannisyan, K.A. Barseghyan, G.A. Kevorkian**

Clinical strains of *Escherichia coli* exhibited significant antitumor activity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice and associated with a simultaneous modulation of the arginase isoforms activity in ascite and the cellular compartments of peritoneal leukocytes. *E. coli* therapy influenced also the levels of arginine and its metabolites (ornithine produced by arginase, citrulline and nitric oxide stable intermediates produced from arginine by nitric oxide synthase). The data obtained should be taken into account in application of *E. coli* in cancer therapy.

Литература

1. Дижэ Г.П., Ещенко Н.Д., Дижэ А.А., Красовская И.Е. Введение в технику биохимического эксперимента. СПб., 2003.
2. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. разработка. Красноярск. Гос. ун-та. Сост. Е.В. Инжеваткин, Красноярск, 2004.
3. Фрик Г., Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю. В кн.: Иммунологические методы. (Под ред. Х.Фримеля), М., 1979,
4. Akamatsy S., Watanabe T.J. Assay for L-arginine in biological liquids. J. Biochem., 1961, v. 77 (3), p. 484.
5. Bera S., Wlliman T. Ray S., Ray M. Enzymes of creatine biosynthesis, arginine and methionine metabolism in normal and malignant cells. FEBS J., 2008, v. 275 (23), p. 5899–5909.
6. Bermudes D., Zheng L., King I.C. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 2002, v. 5(2), p. 194–199.
7. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. Cell Mol. Life Sci., 1999, v. 55(8-9), p. 1015–1028.
8. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nat. Rev. Immunol., 2005, v. 5, p. 641–654.
9. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci., 1975, v. 72, p. 3666–3670.
10. de Boniface J., Mao Y., Schmidt-Mende J., Kiessling R., Poschke I. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase 1 in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. Oncoimmunol., 2012, v. 1(8), p. 1305–1312.
11. Fiore N., Green S., Williamson B., Carswell E., Old L.J., Hlinka J. Tumor necrosis factor: Further studies. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1975, v. 16, p. 125–132.
12. Gambashidze K., Khorava P., Azaladze T., Kalandarishvili K., Jaiani E., Lasareishvili B., Azaladze A., Tediashvili M. Antitumor and adjuvant effects of phagelysates of *E.coli* in mice with Ehrlich carcinoma. Exp. Oncol., 2012, v. 34 (2), p. 107–111.
13. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. Nat. Rev. Immunol., 2009, v. 9 (3), p. 162–174.

14. *Hsueh E.C., Knebel S.M., Lo W.H., Leung Y.C., Cheng P. N.M., Hsueh C.T.* Deprivation of arginine by recombinant human arginase in prostate cancer cells. *J. Hematol. Oncol.*, 2012, v. 5, p. 17–23.
15. *Inoue M., Sato E.F., Park A.M., Nishikawa M., Kasahara E., Miyoshi M., Ochi A., Utsumi K.* Cross-talk between NO and oxyradicals, a supersystem that regulates energy metabolism and survival of animals. *Free Rad. Res.*, 2000, v. 33 (6), p. 757–770.
16. *Iyamu E.W., Asakura T., Woods G.W.* A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of arginase activity in vitro. *Anal. Biochem.*, 2008, v. 383 (2), p. 332–334.
17. *Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D.* Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B.Biochem. Mol. Biol.*, 1996, v. 114 (1), p. 107–132.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265–275.
19. *Mazumder U.K., Gupta M., Maiti S., Mukherjee M.* Antitumor activity of *Hygrophilaspinoso* on Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180 induced mice. *Indian J. Exp. Biol.*, 1997, v. 35, p. 473–477.
20. *Moore R.B., Kauffman N.J.* Simultaneous determination of citrulline and urea using diacetylmonoxime. *Anal. Biochem.*, 1970, v. 33 (2), p. 263–272.
21. *Morris S.M. Jr.* Arginases and arginine deficiency syndromes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2012, v. 15 (1), p. 64–70.
22. *Mumenthaler S.M., Rozengurt N., Livesay J.C., Sabaghian A., Cederbaum S.D., Grody W.W.* Disruption of arginase II alters prostate tumor formation in TRAMP mice. *Prostate*, 2008, v. 68, p. 1561–1569.
23. *Munder M.* Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British J. Pharmacol.*, 2009, v. 158, p. 638–651.
24. *Obermajer N., Wong J.L., Edwards R.P., Odunsi K., Moysich K., Kalinski P.* PGE(2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-derived suppressor cells. *Immunol. Invest.*, 2012, v. 41 (6-7), p. 635–657.
25. *Ozaslan M., Karagöz I.D., Guldur M.E.* Ehrlich ascites carcinoma. *African J. Biotechnol.*, 2011, v. 10 (13), p. 2375–2378.
26. *Patyar S., Joshi R., Byrav P., Prakash A., Medhi B., Das B.K.* Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J. Biomed. Sci.*, 2010, v. 17, p. 21–34.
27. *Raber P., Ochoa A.C., Rodriguez P.C.* Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol. Invest.*, 2012, v. 41 (6-7), p. 614–634.
28. *Rega A., Terlizzi M., Luciano A., Forte G., Crother T.R., Arra C., Arditi M., Pinto A., Sorrentino R.* Plasmacytoid dendritic cells play a key role in tumor progression in Lipopolysaccharide-stimulated lung tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 2013, v. 190(5), p. 2391–2402.
29. *Tracey W.R., Linden J., Peach M.J., Johns R.A.* Comparison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: non-specificity of the diazotization reaction for NO and failure to detect EDRF. *J. Farm. Exp. Ther.*, 1989, v. 252 (3), p. 922–928.
30. *Wheatley D.N., Philip R., Campbell E.* Arginine deprivation and tumour cell death: arginase and its inhibition. *Mol. Cell Biochem.*, 2003, v. 244 (1-2), p. 177–185.
31. *Wu G., Jaeger L.A., Bazer F.W., Rhoads J.M.* Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, v. 15(8), p. 442–451.