

УДК 577.152.27:851.48+616.34-006

**Особенности субклеточного метаболизма и влияние
бактериальной терапии при асцитной карциноме
Эрлиха: креатин
Сообщение 2**

О.Х. Авагян

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

Ключевые слова: Escherichia coli, асцитная карцинома Эрлиха, креатин, креатинкиназа, лейкоциты, митохондрии, мозг, плазма, цитоплазма

Согласно современным представлениям, иммунодефицитное состояние может сопутствовать целому ряду заболеваний, в том числе онкологических. Снижение противоопухолевого иммунитета способствует ускользанию опухоли от иммунологического надзора, и применение в комплексном лечении иммуностимулирующей терапии в целях повышения естественной резистентности организма будет способствовать повышению его эффективности [5]. Элементы, составляющие микробную клетку (липополисахариды (ЛПС), пептидогликаны, тейхоевые кислоты и др.), обладают значительным воздействием на факторы неспецифической резистентности, активируя клеточный и гуморальный иммунитет [4]. Поэтому, наряду с традиционными методами лечения злокачественных заболеваний, одним из перспективных альтернативных направлений онкотерапии является использование микробов [8]. Изначально было обнаружено антиканцерогенное действие патогенных микробов, которое изучалось в практической медицине [15]. Позднее выяснилось, что могут быть использованы и авирулентные бактерии, такие как кишечные палочки (*Escherichia coli*), представители облигатной микрофлоры кишечника [13]. Получены данные, свидетельствующие о том, что фаго- и термолизаты *E. coli* способны повышать эффективность антиопухолевого воздействия ряда лекарственных препаратов [14]. Возможность практического использования *E. coli* в медицине, включая адъювантную терапию, требует изучения ее влияния на метаболические процессы, сопряженные с малигнизацией. В представленной работе исследовалось влияние *in vivo* живых необработанных клеток *E. coli* на системные интрацеллюлярные сдвиги обмена креатина при асцитной карциноме Эрлиха.

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: 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) [6]. Мышей декапитировали на 11-й день после трансплантации АКЭ, когда переход экспоненциальной фазы роста в константную (плато) стабилизирован, число клеток в асците практически постоянное и объем асцитной жидкости достигает 5–12 мл [22].

Бактериальная обработка. Через 2 дня после прививки АКЭ, одну из опытных групп животных однократно 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 клеточки 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 [18]:

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

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

Забор биологического материала. Мышей декапитировали, извлекали головной мозг, осуществляли забор крови и клеток брюшной полост-

ти. Контрольным здоровым мышам после декапитации в брюшную полость шприцем вводили 3-5 мл 20 мМ HEPES буфера, pH 7,4, и с помощью шприца собирали суспензию клеток, которую центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин [6]. 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. Из брюшной полости опытных групп мышей с АКЭ вытягивали асцитную жидкость, из которой осаждали клетки в вышеуказанном режиме центрифугирования. Осадки клеток, полученные от контрольных и опытных животных, разводили в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4, и выделяли субпопуляции перитонеальных лейкоцитов.

Выделение лейкоцитов и плазмы крови. Кровь стабилизировали антикоагулянтом, 5% цитратом натрия (в соотношении 5:1 по объему) и для седиментации эритроцитов смешивали (в соотношении 1:2 по объему) с 6% декстраном (мол. вес=70 000), приготовленным на 0,9 % NaCl, и инкубировали 1 ч при 37°C, после чего декантировали верхний слой плазмы, содержащий лейкоциты и тромбоциты. Из полученной взвеси клеток лейкоциты осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин при 4°C, осадок промывали дважды, ресуспендируя в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,4, с последующим центрифугированием при 3000 об/мин 20 мин при 4°C. Надосадочную жидкость, содержащую обогащенную тромбоцитами плазму, центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин при 4°C для осаждения тромбоцитов и в супернатанте получали плазму.

Выделение субпопуляций лейкоцитов крови и брюшной полости осуществляли из взвеси клеток крови и/или брюшной полости центрифугированием в двуступенчатом градиенте плотности фикол-верографина (1,129 и 1,087 г/см³) при 3000 об/мин 20 мин [7]. Мононуклеары и полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) 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 ПМЯЛ гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (1500 об/мин) в течение 3-5 мин.

Для выделения митохондриальной и цитоплазматической фракций исследуемых тканей применяли метод дифференциального центрифугирования [2].

Выделение митохондрий и цитоплазмы клеток головного мозга. Головной мозг гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (1500 об/мин) в течение 3 мин в 10-кратном объеме 20 мМ HEPES буфера, содержащем 0,25 М сахарозу, pH 7,4. Гомогенат центрифугировали на центрифуге К-24 (Германия) (для выделения клеточных компартментов здесь и далее использовалась вышеуказанная центрифуга) при 3000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции, и из полученной надосадочной жидкости последующим центрифугированием при 15 000 об/мин 20 мин

при 4°C получали в супернатанте цитоплазматическую фракцию, в осадке – митохондриальную [12].

Выделение митохондрий и цитоплазмы перитонеальных лейкоцитов. Гомогенаты объединенных в одну фракцию мононуклеаров и ПМЯЛ из брюшной полости здоровых животных и/или асцита центрифугировали при 1200 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции. Далее надосадочную жидкость центрифугировали при 11 000 об/мин 20 мин при 4°C и получали в супернатанте – цитоплазму, а в осадке – митохондрии.

Активность креатинкиназы (КК) определяли по методу Эннора и Розенберга [цит. по 3] в собственной модификации. Оценивали ферментативное образование креатина в обратной реакции переноса фосфатной группы с креатинфосфата на АДФ. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 20 mM HEPES буфере, pH 7,4, с добавлением 5,5 mM креатинфосфата и 0,06% АДФ. Реакцию останавливали осаждением белка 0,5 N NaOH и 10% ZnSO₄ (в пропорции 1:1:1 по объему), центрифугировали при 15 000 об/мин 3 мин при комнатной температуре на настольной микроцентрифуге фирмы Eppendorf (США) и в супернатантах определяли содержание образовавшегося креатина. Активность креатинкиназы выражали в мкмоль креатина · мг⁻¹ белка · ч⁻¹.

Определение содержания креатина. В супернатантах проб, депротеинизированных вышеуказанным методом, определяли содержание креатина: пробы, 1% α-нафтол (приготовленный в растворе 16% Na₂CO₃ и 6% NaOH) и 1% диацетил смешивали в соотношении 1:1:0,2 по объему, инкубировали 20 мин при комнатной температуре, после чего спектрофотометрировали при длине волны 536 нм [3].

Содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [17].

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

АКЭ – модель злокачественного новообразования, которая широко применяется для изучения фармакологических препаратов и немедикаментозных методов терапии в экспериментальной онкологии [22], использовалась для оценки влияния *in vivo* однократной интраокулярной обработки

мышей-опухоленосителей суспензией живых необработанных клеток клинических непатогенных штаммов *E. coli* на систему креатин/креатинфосфат (КФ)/креатинкиназа, которая играет существенную роль в энергообмене. КК в тканях представлена цитоплазматическими изоформами (цКК), к ним относится цКК мозгового типа, которая встречается в тканях головного мозга и в небольшом количестве в любых клетках организма (ее активность возрастает при онкологических заболеваниях, включая ЖКТ), и митохондриальными (мКК) (саркомерная и несаркомерная, общая) [27]. Для запасания энергии АТФ мКК катализирует обратимый перенос фосфорильного остатка с АТФ на креатин с образованием макроэргического соединения, КФ, который транспортируется в цитоплазму, в которой цКК использует его для синтеза АТФ из АДФ в участках, где необходима энергия [24]. КК обеспечивает потребность в большом количестве энергии в короткие интервалы времени, и ее повышенный уровень отмечается в некоторых злокачественных опухолях (рак мочевого пузыря, молочной железы, кишечника, легкого, матки, простаты, печени) [23].

При АКЭ в гомогенатах лейкоцитов (ГЛ), выделенных из брюшной полости мышей (совокупность мононуклеаров и ПМЯЛ), и цитоплазме активность КК возрастает в 5,5 и 2,9 раза, тогда как в митохондриях она падает примерно в 5 раз по сравнению с контрольными мышами (рис. 1).

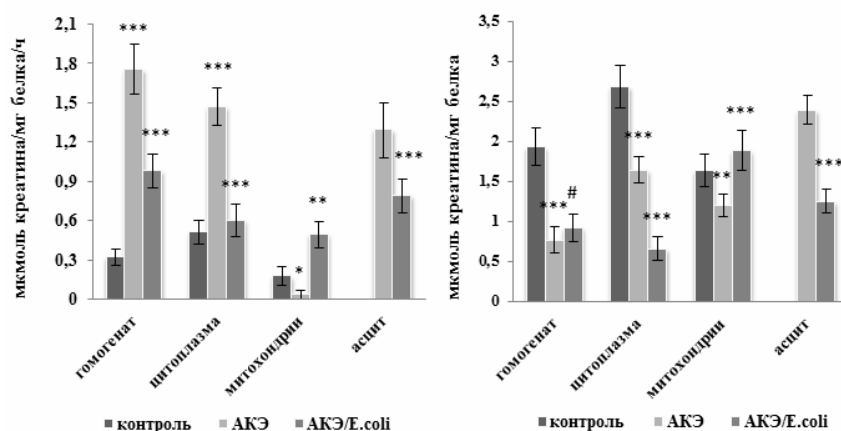


Рис. 1. Креатинкиназная активность и содержание креатина в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) и *E. coli*-терапии. Здесь и далее результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность параметров (p), оцениваемых при АКЭ определялась по сравнению с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

Подобные данные сообщались относительно линии раковых клеток человека HeLa, в которых обнаружен высокий уровень экспрессии цКК и низкий – мКК, тогда как в нормальных клетках (кератиноцитах) наблюдается противоположная картина [16]. В асцитной жидкости, которая в основном представлена смесью опухолевых клеток и лейкоцитов, активность КК ниже чем в ГЛ (1.3 ± 0.21 vs. 1.8 ± 0.2 мкмоль/мг белка), что свидетельствует о ее подавлении в опухолевых клетках. В то же время уровень креатина в асците выше чем в ГЛ, что может быть обусловлено по меньшей мере двумя причинами. Первая связана с тем, что в опухолевых клетках при АКЭ повышена экспрессия и активность ферментов синтеза креатина, аргинин-глицин аминотрансферазы и N-гуанидиноацетат метилтрансферазы [10]. Вторая причина заключается в том, что креатин мобилизуется из тканей хозяина в клетки АКЭ даже против более высокого градиента концентрации. Это подтверждается данными о повышенном уровне мРНК транспортера креатина в асците, благодаря чему при сравнительно низком уровне креатина в клетках АКЭ последние могут поглощать и высвобождать его значительные количества [10]. При подавлении мобилизации креатина из тканей хозяина в опухолевую ткань аналогом креатина – бета-гуанидинопропионовой кислотой подавляется рост АКЭ и продлевается жизнь мыши [19]. По-видимому, оттоком креатина из перитонеальных лейкоцитов обусловлено снижение его уровня в гомогенатах и цитоплазме, несмотря на одновременное АКЭ-индуцированное повышение в них активности КК. Отметим, что низкая активность КК в асците не достаточна для поддержания пула креатин/КФ, скорее всего в пролиферирующих раковых клетках она необходима для метаболизма в направлении синтеза полиаминов.

Наши эксперименты показали, что даже одноразовая обработка непатогенными клиническими штаммами кишечной палочки оказывает противоопухолевое действие [1]. Одновременно *E.coli*-терапия полностью аннулирует активирование цКК и восстанавливает активность мКК до контрольных значений в перитонеальных лейкоцитах мышей с АКЭ. Следует отметить, что мКК существует в виде двух взаимопревращаемых, существующих в состоянии динамического равновесия олигомерных форм – димера и октамера (68 и 32 % соответственно), тогда как цКК представлена только димерной формой [25]. Именно октамерная форма мКК способствует образованию и укреплению контактных сайтов внутренней и внешней мембран митохондрий, укрепляя их структуру и повышая резистентность, обеспечивая тем самым эффективность энергообразования [26, 28]. Восстановление баланса активностей цКК и мКК в перитонеальных лейкоцитах при *E. coli*-терапии, по-видимому, является одной из причин значительного снижения уровня креатина в асците, а именно: если у нелеченых мышей он вдвое превышает таковой в ГЛ, то

после лечения – лишь в 1,4 раза, при этом в опухолевых клетках он падает в 5 раз, препятствуя опухолевому росту.

Изучение метаболического профиля креатина в лейкоцитах (совокупная фракция мононуклеаров и ПМЯЛ) крови показало, что при АКЭ в ГЛ, цитоплазме и митохондриях резко возрастает активность КК – в 6, 21 и 27 раз соответственно, а в плазме она повышается в 2,4 раза, одновременно во всех фракциях возрастает содержание креатина (рис. 2). Отметим, что при повреждении клеток происходит высвобождение КК и поступление ее в кровь. После бактериальной обработки активность цКК нормализуется, а таковая мКК снижается в 1,5 раза, но тем не менее значительно превышает контрольный уровень, в то время как в плазме ее активность падает вдвое ниже. При этом содержание креатина в плазме крови снижается в 2,2 раза по сравнению с нелечеными мышами с АКЭ. Ранее было показано, что снижение уровня креатина в плазме крови подавляет опухолевый рост и снижает почти вдвое объем асцитной жидкости [19]. Подобный эффект наблюдается и в наших экспериментах при обработке мышей *E. coli*, при этом объем асцитной жидкости снижается более чем в четыре раза и примерно на 75% продлевается среднее время выживания животных [1]. Исходя из вышесказанного, *E. coli*, оказывая влияние на креатин/КК систему праймированных ПМЯЛ и мононуклеаров крови, по-видимому, препятствует повышению уровня креатина в плазме, стимулирующего прогрессирование опухоли.

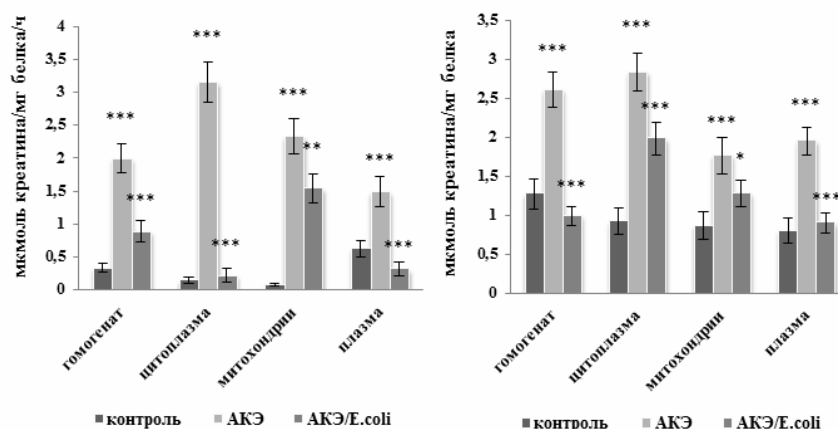


Рис. 2. Креатинкиназная активность и содержание креатина в лейкоцитах и плазме крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) и *E. coli*-терапии

Взаимодействие и взаимовлияние центральной нервной системы и желудочно-кишечного тракта – важнейший механизм, необходимый для поддержания гомеостаза – он нарушается при болезнях и проявляется в

оси головной мозг – кишечник [21]. Это касается и креатина, который играет особую роль для органов и тканей с высоким потреблением энергии, и прежде всего мозга, который, составляя около 2% от массы тела, потребляет до 20% всей энергии [9]. Нами исследовалась система креатин/КК в клетках цельного головного мозга. Как видно из рис. 3, при АКЭ примерно в одинаковой степени возрастает цКК и мКК – в 1,8 и 1,7 раза, а обработка *E. coli* в свою очередь оказывает дополнительное активирующее действие – в 1,6 и 1,3 раза соответственно. Увеличение активности изоформ КК в тканях головного мозга, возможно, является проявлением адаптационных изменений в ответ на малигнизацию в брюшной полости. Одновременно возрастает содержание креатина, которое положительно коррелирует с креатинкиназной активностью в гомогенатах ($r=0.91$, $p<0.0001$), цитоплазме ($r=0.94$, $p<0.0001$) и митохондриях ($r=0.99$, $p<0.0001$).

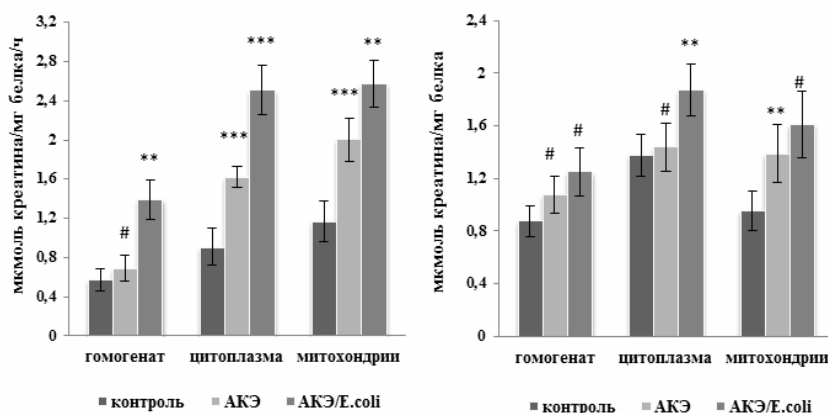


Рис. 3. Креатинкиназная активность и содержание креатина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) и *E. coli* -терапии

В условиях *in vivo*, показано, что в ЦНС мышей и крыс креатин может поглощаться из крови против градиента концентрации, но несмотря на то, что специфический транспортер креатина, SLC6A8, синтезируется эндотелием микрокапилляров гематоэнцефалического барьера, его отсутствие в астроцитах и их отростках, выстилающих эндотелий, затрудняет транспорт в ЦНС периферического креатина, синтезируемого в печени и почках [20]. В то же время в ЦНС экспрессируются оба фермента биосинтеза креатина, которые, в основном, пополняют пул креатина в мозге [11]. Активирование в головном мозге системы креатин/КК при *E. coli* -терапии, будет способствовать резистентности клеток при АКЭ, ибо, наряду с хорошо изученным эргогенным действием креатина и КФ, они

взаимодействуют с фосфолипидами клеточных мембран, протектируя мембранную проницаемость и препятствуя лизису клеток [28].

Таким образом, на экспериментальной мышинной модели асцитной карциномы Эрлиха нами изучены сдвиги в системе креатин/КК в асците, перитонеальных лейкоцитах, плазме и лейкоцитах крови и тканях цельного мозга. Впервые показано специфическое влияние на нее альтернативного антиопухолевого лечения с использованием клинического штамма *E. coli*, зависящее от клеточной компартментализации, органа и ткани, что необходимо учитывать при бактериальной онкотерапии.

Поступила 27.02.13

**Ենթաբջջային նյութափոխանակության
առանձնահատկությունները և բակտերիալ բուժման
ազդեցությունը Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի ժամանակ.
Կրեատին
Հադոբոլում 2**

Հ.Խ. Ավագյան

Փորձարարական ուռուցքի՝ Էրլիխի ասցիտային կարցինոմայի օգտագործմամբ ուսումնասիրվել են քաղցկեղի բակտերիալ բուժման ենթաբջջային մեխանիզմները: Առաջին անգամ բացահայտվել է *Escherichia coli*-ի ոչ ախտածին կլինիկական շտամի ազդեցությունը կրեատին/կրեատինկինազի համակարգի վրա ասցիտային հեղուկում, արյան պլազմայում, ինչպես նաև որովայնի և արյան լեյկոցիտների ու գլխուղեղի հյուսվածքների բջջային բաղադրամասերում: Ելնելով ստացված արդյունքներից՝ կրեատինի ենթաբջջային նյութափոխանակության ուղիները կարող են ներառվել *Escherichia coli*-ի հակաուռուցքային ազդեցության մեխանիզմների մեջ, քանի որ, ըստ վերջին տվյալների, կրեատին/կրեատինկինազի համակարգը ազդում է քաղցկեղի բջիջների գոյատևման և ուռուցքի զարգացման գործընթացի վրա:

Subcellular metabolism peculiarities and effect of bacterial therapy in Ehrlich ascites carcinoma: creatine

Report 2

H.Kh. Avagyan

Ehrlich ascites carcinoma experimental tumor was used to study the intracellular mechanisms of bacterial cancer therapy. We have shown for the first time the diverse effects of non-pathogen clinical strain *Escherichia coli* on the creatine/creatine kinase system in ascite, blood plasma, as well as cellular compartments of peritoneal and blood leukocyte, and whole brain tissues. Since the new data suggest the role of creatine/creatine kinase in cancer cell survival and tumor progression, the mentioned system might be involved in the intracellular mechanisms of *E. coli*-therapy in cancer.

Литература

1. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Агабабова А.А., Мовсесян О.А., Оганнисян М.Р., Барсегян К.А., Геворкян Г.А. Особенности субклеточного метаболизма и влияние бактериальной терапии при асцитной карциноме Эрлиха: аргинин. Сообщение 1. Мед. наука Армении НАН РА, 2013, т. LIII, 2, с. 22-33.
2. Дижэ Г.П., Ещенко Н.Д., Дижэ А.А., Красовская И.Е. Введение в технику биохимического эксперимента. СПб., 2003.
3. Иванов И.И., Корвкин Б.Ф., Маркелов И.М. Введение в клиническую энзимологию. Л., 1974.
4. Медуницын Н.В. Вакцинология. М., 2004.
5. Новиков Д.К. Патология системы иммунитета. М., 2003.
6. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. разработка Красноярск. Гос. ун-та. Сост. Е.В. Инжеваткин. Красноярск, 2004.
7. Фрик Г., Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю. В кн.: Иммунологические методы. (под ред. Х.Фримеля), М., 1979.
8. Alibek K., Bekmurzayeva A., Mussabekova A., Sultankulov B. Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. Infect. Agent. Cancer, 2012, 7 (1), p. 33–37.
9. Beard E., Braissant O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. J. Neurochem., 2010, v. 115, p. 297–313.
10. 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.
11. Braissant O., Henry H. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. J. Inherit. Metab. Dis., 2008, v. 31, p. 230–239.
12. Bustamante J., Czerniczyniec A., Lores-Arnaiz S. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. Front. Biosci., 2007, v. 12, p. 1034–1040.
13. Evans Jr., Doyle J., Evans D.G. *Escherichia Coli*. Med. Microbiol., 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 2007.
14. 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.

15. *Hoption C.S.A., van Netten J.P., van Netten C. Dr.* William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad. Med. J.*, 2003, v. 79, p. 672–680.
16. *Lenz H., Schmidt M., Welge V., Kueper T. et al.* Inhibition of cytosolic and mitochondrial creatine kinase by siRNA in HaCaT- and HeLaS3-cells affects cell viability and mitochondrial morphology. *Mol. Cell Biochem.*, 2007, v. 306 (1-2), p. 153–162.
17. *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.
18. *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.
19. *Ohira Y., Ishine S., Inoue N., Yunoki K.* Reduced growth of Ehrlich ascites tumor cells in creatine depleted mice fed beta-guanidinopropionic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, v. 1097 (2), p. 117–122.
20. *Ohtsuki S.* New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, v. 27, p. 1489–1496.
21. *O'Mahony S. M., Hyland N. P., Dinan T. G., Cryan J. F.* (2011). Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl.)*, 214, 71–88.
22. *Ozaslan M., Karagöz I.D., Guldur M.E.* Ehrlich ascites carcinoma. *African J. Biotechnol.*, 2011, v. 10 (13), p. 2375–2378.
23. *Patra S., Ghosh A., Roy S.S., Bera S., Das M., Talukdar D., Ray S., Wallimann T., Ray M.* A short review on creatine-creatine kinase system in relation to cancer and some experimental results on creatine as adjuvant in cancer therapy. *Amino Acids*, 2012, v. 42(6), p. 2319–2330.
24. *Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T.* Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, v. 1762 (2), p. 164–80.
25. *Schnyder T., Rojo M., Furter R., Wallimann T.* The structure of mitochondrial creatine kinase and its membrane binding properties. *Mol. Cell Biochem.*, 1994, v. 133–134, p. 115–123.
26. *Speer O., Bäck N., Buerklen T., Brdiczka D., Koretsky A., Wallimann T., Eriksson O.* Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem. J.*, 2005, v. 385 (Pt 2), p. 115–123.
27. *Takagi Y., Yasuhara T., Gomi K.* Creatine kinase and its isozymes. *Rinsho Byori*, 2001, suppl. v. 116, p. 52–61.
28. *Tokarska-Schlattner M., Epand R.F., Meiler F., Zandomenighi G., Neumann D.* Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS ONE*, 2012, v. 7 (8), p. e431–e478.