

С.П. Залеток
С.В. Гоголь
О.О. Кленов
Г.Б. Артамонова
Ю.В. Яніш
В.В. Бентрад
О.В. Карнаушенко
М.А. Книрик

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: карцинома
Ерліха, карцинома легені
Льюїс, протипухлинний ефект,
інгібітори аргінази і синтезу
поліамінів, індукційна
синтаза оксиду азоту, оксид
азоту.

ПІДСИЛЕННЯ НОРАРГІНІНОМ ПРОТИПУХЛИННОЇ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ ФЕРМЕНТІВ СИНТЕЗУ ПОЛІАМІНІВ *IN VIVO*

Поліаміни (ПА) є визначальними чинниками для численних ланок сигнальної трансдукції, відповідальних за проліферацію, диференціацію та програмувану смерть клітин. Метаболізм аргініну і ПА в клітинах взаємопов'язаний, оскільки синтез останніх залежить від ресурсу орнітину, як харчового походження, так і синтезованого з аргініну за участю аргінази. За відсутності оптимальних концентрацій ПА проліферація та ріст клітин не відбуваються. Аргінін є субстратом і для синтази оксиду азоту, які також залучені у контроль клітинної проліферації. Це свідчить, що метаболічні шляхи ПА і аргініну можуть бути перспективною мішенню для протипухлинного впливу. **Мета:** дослідити вплив інгібіторів аргінази та ферментів синтезу ПА на ріст перещеплених пухлин у експериментальних тварин та вивчити можливі механізми протипухлинної дії інгібіторів. **Об'єкт і методи:** карцинома легені Льюїс та асцитна форма карциноми Ерліха; використано методи експериментальної онкології, вестерн-блотинг, біохімічні і статистичні методи. **Результати:** показано, що включення в схеми лікування спільно з інгібіторами синтезу ПА (α -дифторметилорнітин і метилглюксаль(біс)гуанілгідрозон) інгібітора аргінази (нораргініну) сприяло гальмуванню розвитку карциноми Ерліха та інгібуванню росту і метастазування карциноми легені Льюїс в експериментальних тварин. Пригнічення росту пухлин супроводжувалося зниженням вмісту ПА, змінами активності аргінази та підвищенням експресії індукційної синтази оксиду азоту (iNOS) і рівня оксидів азоту (NO) у пухлинних клітинах. **Висновок:** підвищення протипухлинного ефекту при комбінованому застосуванні інгібіторів аргінази і ферментів синтезу ПА може бути зумовлене збільшенням експресії iNOS та зростанням рівня NO у пухлинних клітинах.

ВСТУП

Результати, описані в численних публікаціях, та отримані нами дані свідчать, що поліаміни (ПА) — спермідин і спермін — необхідні для росту і проліферації клітин [1–3]. Для пухлинних клітин характерним є підвищення рівня ПА, головним чином внаслідок активації ферментів їх синтезу — орнітиндекарбоксилази (ОДК) та S-аденозил-L-метіоніндекарбоксилази (S-АМДК). ПА у високих концентраціях підвищують здатність пухлинних клітин до росту, інвазії і метастазування та знижують протипухлинну імунну відповідь [1–4]. Згідно з сучасними уявленнями, для синтезу ПА у клітинах, окрім орнітину, що надходить в організм із харчовими продуктами, також може бути використаний L-аргінін. При дії на L-аргінін аргінази утворюються L-орнітин і сечовина, а з L-орнітину за участю ОДК синтезується путресцин, який в подальшому використовується для біосинтезу спермідину і сперміну. Для синтезу останніх необхідні також метіонін і аденозинтрифосфат. Метіонін, перш ніж бути використаним для синтезу спермідину і сперміну, взаємодіє з аденозинтрифосфатом, утворюючи S-аденозил-L-метіонін (S-AM), декарбоксилювання S-AM ката-

лізується ферментом S-АМДК. Декарбоксилюваний S-AM забезпечує амінопропіловими групами біосинтез спермідину і сперміну, що здійснюється двома синтазами: спермідинсинтазою і спермінсинтазою. Спермідинсинтаза каталізує утворення спермідину шляхом приєднання до путресцину однієї амінопропілової групи. Спермінсинтаза додає іншу таку саму групу до спермідину, внаслідок чого утворюється спермін [3].

Відомо, що в клітинах L-аргінін за участю синтази азоту метаболізується в L-цитрулін і оксиди азоту (NO). У багатьох роботах показана важлива роль NO для розвитку злоякісного процесу, хоча його значення в біології пухлин повністю не з'ясоване. Повідомлялося, що NO у низьких концентраціях стимулює ріст і проліферацію пухлинних клітин та підвищує їх метастатичну активність, тоді як у високих, навпаки, може пригнічувати ріст пухлин та індукувати апоптоз [5–7]. Це свідчить, що цитостатична дія NO залежить від його концентрації. Є дані про те, що NO бере участь у деяких етапах канцерогенезу, регулюючи механізми репарації ДНК та процес апоптозу. NO залучені також у розвиток запалення та імунних реакцій. Показано, що пухлини модифі-

кують імунну відповідь та васкуляризацію за участю NO [8–11]. Виявлено, що NO пригнічує шляхом нітрозилування активність ОДК, ключового ферменту синтезу ПА, та негативно регулює поглинання клітинами ПА, зокрема путресцину [9].

Вищенаведене свідчить, що залучені у контроль клітинної проліферації ПА і аргінін та їх пули в клітині залежать від декількох метаболічних шляхів, зокрема аргінази, ОДК, синтаз NO та аргініндекарбоксілази. За участю останньої з аргініну синтезується агматин, який, на відміну від ПА, проявляє антипроліферативні властивості [10]. Дисбаланс в шляхах перетворення аргініну в ПА, NO і агматин може суттєво впливати на проліферацію і ріст клітин.

Як протипухлинні препарати таргетної дії можуть бути використані агенти, які впливають на метаболізм ПА та аргініну. На сьогодні синтезовано та доведено протипухлинні властивості різноманітних аналогів ПА, а також інгібіторів ферментів їх синтезу і катаболізму. Випробування деяких із цих речовин в онкологічних клініках США та інших країн показали обнадійливі результати [12–14]. Разом з тим питання щодо широкого застосування інгібіторів/модуляторів метаболізму ПА у хворих онкологічного профілю ще далеко від вирішення і потребує подальшого детального вивчення.

Було показано, що введення інгібітора N-гідрокси-нор-1-аргініну тваринам із перещепленими пухлинами сприяє зниженню активності аргінази та пригніченню росту пухлин [15]. З іншого боку, є дослідження, в яких продемонстровано інгібування росту пухлин за умов введення аргінази та інших ферментів, що беруть участь у деградації аргініну [16–21].

Необхідно зазначити, що пошук модуляторів/інгібіторів аргінази та ферментів обміну ПА серед природних та синтетичних речовин на сьогодні вважається одним із перспективних шляхів створення нових протипухлинних засобів. Багатообіцяючим, на нашу думку, є і пошук нових схем протипухлинного впливу на основі комбінованого застосування інгібіторів метаболічних шляхів ПА і аргініну. Але досліджень у такому аспекті проводилося мало.

Основними завданнями цієї роботи було дослідити вплив інгібіторів ферментів синтезу ПА та аргінази при окремому і поєднаному їх застосуванні на розвиток у експериментальних тварин карциноми Ерліха (КЕ) та карциноми легені Льюїс (КЛЛ), вивчити вплив інгібіторів на активність аргінази, експресію індукцибельної синтази окиду азоту (iNOS), рівні NO у пухлинних клітинах та оцінити можливий зв'язок між цими показниками і ростом пухлин.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на мишах-самках лінії C₅₇Bl/6 і нелінійних мишах масою 20–25 г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецько-

го Національної академії наук (НАН) України. Усі досліди з тваринами проводили, керуючись Міжнародними правилами роботи з експериментальними тваринами [22]. У дослідженнях використано моделі перещеплених пухлин — КЛЛ та асцитної форми КЕ. Пухлинні штами були отримані з банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. КЕ перещеплювали нелінійним мишам у черевну порожнину по $5 \cdot 10^5$ клітин у 0,2 мл фізіологічного розчину хлориду натрію (NaCl). КЛЛ перещеплювали мишам-самкам лінії C₅₇Bl/6 внутрішньом'язово по $5 \cdot 10^5$ клітин у 0,2 мл фізіологічного розчину NaCl.

Як інгібітори метаболізму аргініну і ПА використано нораргінін (N ω -hydroxy-nor-arginine, фірми «Cayman Chemical», США), α -дифторметилорнітин (α -ДФМО, фірми «Sigma», США) та метилгліоксаль(біс)гуанілгідрозон (МГБГ, фірми «Sigma», США). α -ДФМО, МГБГ та нораргінін вводили тваринам у черевну порожнину в 0,2 мл фізіологічного розчину NaCl: α -ДФМО — у дозі 800 мг/кг/добу; МГБГ — по 10 мг/кг/добу; нораргінін — по 60 мг/кг маси тварин на добу. Тваринам із КЛЛ препарати вводили 5 разів (на 7; 8; 11; 12-ту та 13-ту добу після перещеплення пухлин); мишам із КЕ — 7 разів, починаючи з наступної доби після перещеплення пухлин. Мишам із перещепленими пухлинами контрольних груп вводили по 0,2 мл фізіологічного розчину NaCl.

Тварин із КЕ забивали під ефірним наркозом через добу після закінчення терапії. Пухлинні клітини вимивали з черевної порожнини фізіологічним розчином NaCl та підраховували їх кількість у камері Горяєва. Тварин із КЛЛ забивали під ефірним наркозом на 15-ту та 27-му добу пухлинного росту. Пухлини видаляли, зважували та використовували для подальших досліджень.

Визначення продукції NO пухлинними клітинами проводили за методом [23]. Активність аргінази визначали за модифікованим методом [24].

Для визначення експресії iNOS гел-електрофорез білкових препаратів (клітинних екстрактів пухлин), денатурованих за допомогою SDS, проводили за модифікованою методикою Леммлі [25]. Для роботи були використані акриламід та метилен-біс-акриламід фірми «Anachem», США, кумасі блакитний K-250 («Sigma», США), маркери молекулярної маси — Molecular Weight Calibration Kits — LMW (14 400–94 000) («Pharmacia»). Для визначення рівня експресії iNOS застосовано вестерн-блот аналіз, який проводили за раніше описаною методикою з деякими модифікаціями [26]. Після електрофорезу здійснювали електроперенесення білків із поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану Hybond P («Amersham Pharmacia Biotech», Швеція) у наступній буферній системі: 48 мМ трис; 39 мМ гліцин; 0,037% SDS; 20% метанол. Електроперенесення проводили протягом 30 хв при силі струму 0,8 мА на 1 см² нітроце-

люлозної мембрани. Після чого мембрани поміщали на 2 год при 22–24 °С у 5% розчин знежиреного сухого молока (у PBS) для блокування вільних місць зв'язування. Далі мембрани 5 разів промивали (по 5 хв) у 15–20 мл PBS з 0,05% Tween-20 і поміщали на 4 год при 37 °С у розчин моноклональних антитіл (АТ) миші проти білка iNOS («Santa Cruz Biotech.», СА, США) (концентрація АТ 0,2 мкг/мл). Після цього мембрани 5 разів відмивали, як описано вище, і поміщали у розчин вторинних імуноглобулінів G кози проти АТ миші, кон'югованих із пероксидазою хрину («Santa Cruz Biotech.», СА, США). Реакція тривала 1,5 год. Після відмивання мембрану інкубували 2 хв у системі детекції ECL («Santa Cruz Biotech.», СА, США) (0,125 мл кожного реагента ECL на 1 см мембрани), потім прикладали до неї рентгенівську плівку («Фотон», Україна). Експозиція тривала 2–3 хв при кімнатній температурі. Отримані дані вестерн-блотингу були оброблені за допомогою комп'ютерної програми TotalLab. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента. Дані представлені як $M \pm m$. Достовірними вважали розбіжності при $p \leq 0,05$ [27].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження показали, що кожен із досліджуваних інгібіторів при окремому застосуванні пригнічує розвиток КЕ у мишей. Після 7-кратного введення нораргініну, α -ДФМО і МГБГ гальмування росту пухлин становило 42; 38 і 46% відповідно (рис. 1). Поєднане введення α -ДФМО і МГБГ призводило до зростання гальмувального ефекту до 61%. Найбільш сильне гальмування розвитку асцитного раку Ерліха спостерігали при комбінованому застосуванні інгібіторів аргінази, ОДК і S-АМДК (α -ДФМО + МГБГ + нораргінін). Індекс гальмування в цьому випадку становив 69% (див. рис. 1). Отримані дані свідчать, що включення в схему лікування інгібітора аргінази нораргініну підсилює протипухлинний ефект α -ДФМО і МГБГ — інгібіторів ключових ферментів синтезу ПА.

При вивченні дії досліджуваних інгібіторів на ріст та метастазування КЛЛ виявлено, що введення їх тваринам призводило до гальмування росту первинних пухлин (рис. 2). На 15-ту та 27-му добу розвитку маса пухлин у тварин, які отримували інгібітори, була статистично достовірно меншою порівняно з контрольними нелікованими тваринами. Так, гальмування росту пухлин після введення нораргініну становило 24% (на 15-ту добу) і 35% (на 27-му добу), α -ДФМО у поєднанні з нораргініном — 21% (на 15-ту добу) і 24% (на 27-му добу). Після введення тваринам тільки α -ДФМО на 15-ту добу розвитку статистично достовірного пригнічення росту КЛЛ не виявлено, але на 27-му добу маса пухлин у тварин цієї групи була на 20% меншою порівняно з контролем. Результати гальмування росту КЛЛ при застосуванні нораргініну узгоджуються

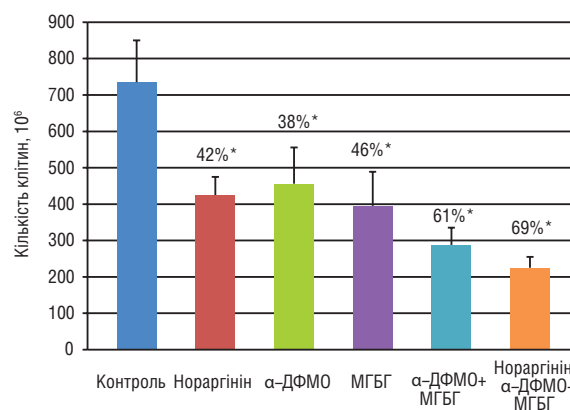


Рис. 1. Вплив α -ДФМО, МГБГ і нораргініну при окремому та комбінованому застосуванні на клітинність асцитної рідини у мишей із КЕ. *Гальмування росту пухлин (%)

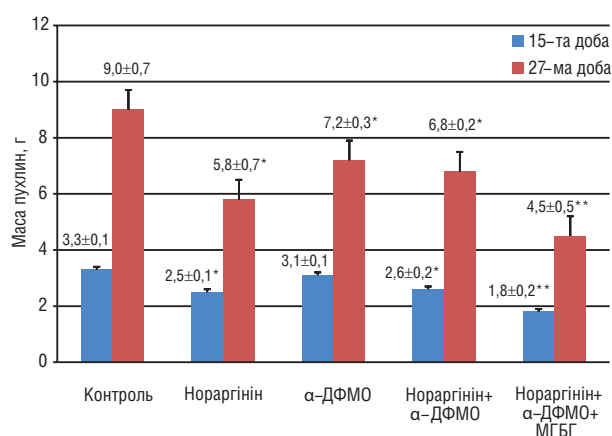


Рис. 2. Вплив інгібіторів обміну ПА на масу КЛЛ у мишей. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ порівняно з контрольною групою

з даними, отриманими Р.С. Rodriguez і співавторами на цій моделі пухлин [15]. Найбільший протипухлинний ефект нами зафіксовано при поєднаному використанні інгібіторів: нораргінін + α -ДФМО + МГБГ. Пригнічення росту пухлин у цьому випадку становило: на 15-ту добу — 45%, на 27-му — 50% (див. рис. 2).

Окрім впливу на ріст первинної пухлини, ми також аналізували вплив досліджуваних агентів на метастазування КЛЛ. Виявлено, що у тварин, яких лікували α -ДФМО, α -ДФМО у поєднанні з нораргініном та при застосуванні комбінації інгібіторів (α -ДФМО + нораргінін + МГБГ), об'єм метастазів був значно менший (у 16,3; 13,5 та 12,8 раза відповідно), ніж у контрольних мишей (рис. 3, а). Суттєве зменшення (на 23%) кількості метастазів фіксували лише при комбінованому введенні трьох інгібіторів (α -ДФМО, МГБГ та нораргініну) (рис. 3, б). Водночас після введення тваринам тільки нораргініну відзначали тенденцію до збільшення кількості метастазів ($16,6 \pm 3,2$ проти $11,0 \pm 2,2$ у контролі). Окрім цього, нораргінін практично не впливав на об'єм

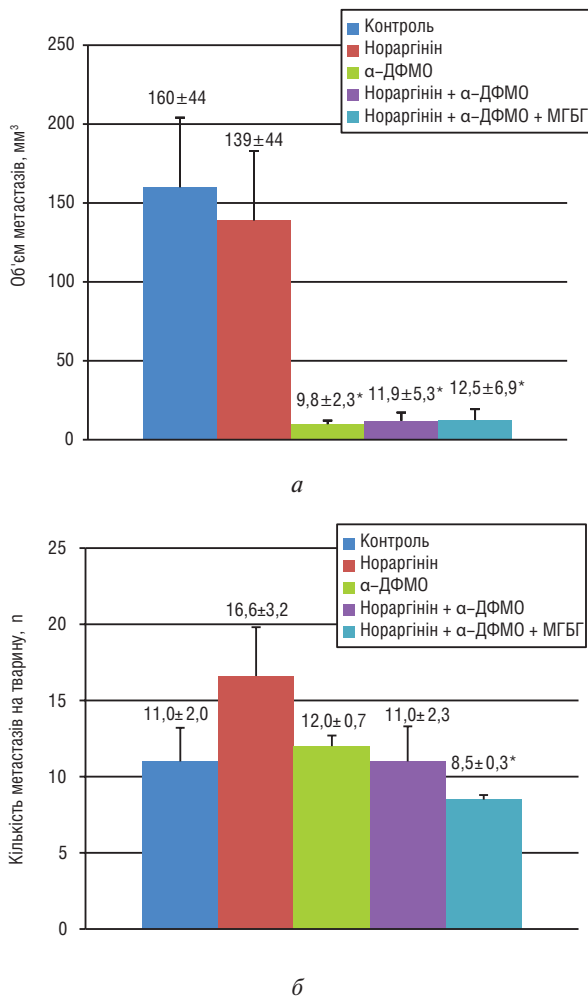


Рис. 3. Вплив нораргінину, α-ДФМО і МГБГ на об'єм (а) та кількість (б) метастазів у легенях мишей із перещепленою КЛЛ. * $p < 0.05$ порівняно з контрольною групою

метастазів ($139,0 \pm 44,0$ мм² проти $160,0 \pm 44,0$ мм² у контролі) (див. рис. 3).

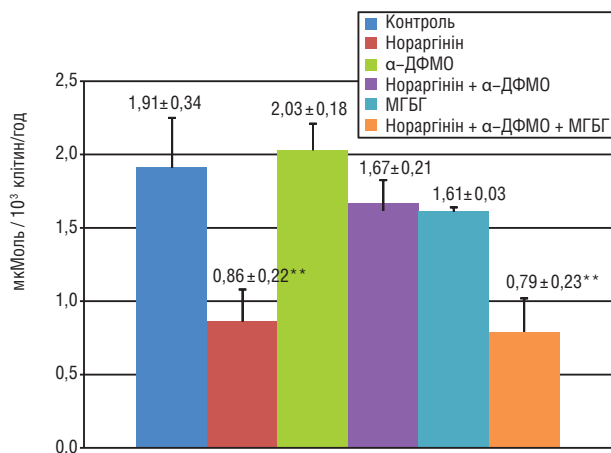
Отже, результати досліджень показали, що нораргінін, α-ДФМО і МГБГ при окремому їх застосуванні спричиняють гальмування розвитку КЕ у тварин та пригнічення росту первинної пухлини у мишей із КЛЛ. Найбільший ефект в обох випадках спостерігали при застосуванні в лікувальних схемах комбінації інгібіторів: інгібітора аргінази нораргінину (що пригнічує синтез із аргініну попередника ПА орнітину) у поєднанні з інгібіторами ферментів синтезу α-ДФМО і МГБГ. Найсуттєвіший антиметастатичний ефект (зменшення як кількості, так і об'єму метастазів) у мишей із КЛЛ також виявлено при поєднаному застосуванні інгібіторів: нораргінін + α-ДФМО + МГБГ. Водночас антиметастатичного ефекту при використанні лише нораргінину не відмічено. Нораргінін, при його окремому введенні, навпаки, призводив навіть до деякого (статистично недостовірного) збільшення кількості метастазів у легенях мишей і не впливав на їх об'єм. З'ясування причин цієї ситуації потребує подальших досліджень.

Продемонстровано, що гальмування росту досліджуваних пухлин супроводжується значним зниженням вмісту путресцину і спермідину та зменшенням індексу молярного співвідношення спермідин/спермін (спд/спн) у пухлинних клітинах. Згідно з нашими даними та даними літератури індекс спд/спн відображає інтенсивність проліферації клітин [2, 3]. Найбільш суттєве зниження вмісту путресцину в клітинах КЕ виявлено при окремому введенні тваринам α-ДФМО (кількість путресцину зменшувалася до слідових значень), введення нораргінину призводило до зниження концентрації путресцину в 4,2 раза. При комбінованому введенні 3 інгібіторів (α-ДФМО + МГБГ + нораргінін) вміст путресцину в пухлинних клітинах зменшувався до слідових кількостей та в 3,3 раза знижувалася концентрація спермідину, індекс молярного співвідношення спд/спн знижувався до 0,7 проти 2,7 у пухлинних клітинах контрольних нелікованих тварин.

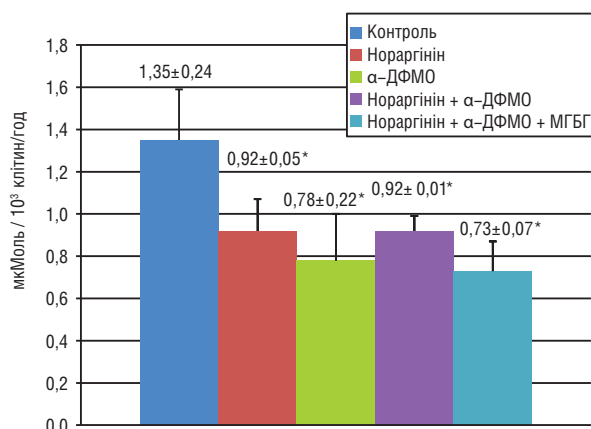
Подібні дані були отримані нами і при дослідженні ПА у клітинах КЛЛ. Так, концентрація путресцину в пухлинних клітинах (на 15-ту добу після перещеплення пухлин та після 5-разового поєднаного введення 3 інгібіторів) знижувалася у 5,45 раза, спермідину — у 3,3 раза, а індекс спд/спн зменшувався з 1,03 до 0,31 порівняно з показниками у контролі. Результати проведених досліджень узгоджуються з отриманими раніше даними про те, що в умовах дії інгібіторів ОДК і S-АМДК знижується концентрація ПА в пухлинах, що і призводить до гальмування їх розвитку. Цікавими є й інші можливі механізми залучення ПА у пухлинний ріст. Зокрема, С.С. Науес і співавтори [28] отримали дані про те, що пригнічення росту пухлин, яке відбувається при поєднаному застосуванні інгібітора ОДК (α-ДФМО) та інгібітора транспорту ПА (АМХТ1501), потенціюється тим, що виснаження ПА призводить до реверсії імуносупресії. Виснаження ПА змінює імуносупресивне мікросередовище пухлини на протилежне шляхом зміни «поляризації» мієлоїдних клітин від М2-фенотипу (проангіогенного) до М1-фенотипу (протипухлинного) [28]. Висновки щодо взаємозв'язку між протипухлинними ефектами α-ДФМО та індукцією протипухлинної Т-клітинної імунної відповіді зроблено також С. Уе і співавторами [29]. Варто зазначити, що на існування зв'язку між ПА та станом імунної системи при пухлинному рості вказують також результати наших попередніх досліджень [4, 30].

З метою вивчення інших можливих механізмів, залучених у протипухлинну дію досліджуваних агентів, у клітинах КЕ та КЛЛ нами визначено експресію білка iNOS, рівень NO та активність аргінази. На рис. 4 представлено дані дослідження активності аргінази в клітинах КЛЛ на 15-ту та 27-му добу їх розвитку при включенні в лікувальні схеми окремо та поєднано нораргінину, α-ДФМО та МГБГ.

Виявлено, що на 15-ту добу розвитку активність аргінази суттєво знижується в пухлинних клі-



а



б

Рис. 4. Активність аргінази (мкМоль/10⁴ клітин/год) у клітинах КЛЛ на 15-ту (а) та 27-му (б) добу розвитку пухлини при окремому та комбінованому застосуванні α-ДФМО, МГБГ та нораргініну. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ порівняно з контрольною групою

тинах лише після введення нораргініну та при застосуванні інгібіторів у комбінації (нораргінін + α-ДФМО + МГБГ). Активність аргінази в цих випадках становила відповідно 45 та 41% від показників у пухлинах контрольних тварин. У клітинах пухлин решти дослідних груп тварин відмічено незначні коливання активності аргінази. На 27-му добу експерименту активність аргінази статистично достовірно знижувалася в пухлинних клітинах тварин усіх дослідних груп. Найбільш суттєве зниження активності аргінази (у 2,1 раза порівняно з контролем) виявлено в клітинах КЛЛ тварин, яким нораргінін, α-ДФМО і МГБГ вводили поєднано (див. рис. 4).

Дослідження iNOS показали, що на 15-ту добу розвитку експресія iNOS у клітинах КЛЛ тварин усіх лікованих груп помітно підвищувалася (рис. 5). При поєднаному застосуванні нораргініну, α-ДФМО і МГБГ експресія iNOS зростала в 2,2 раза (див. рис. 5). На 27-му добу розвитку зміни експресії iNOS у пухлинних клітинах мали аналогічний характер (дані не наведено).

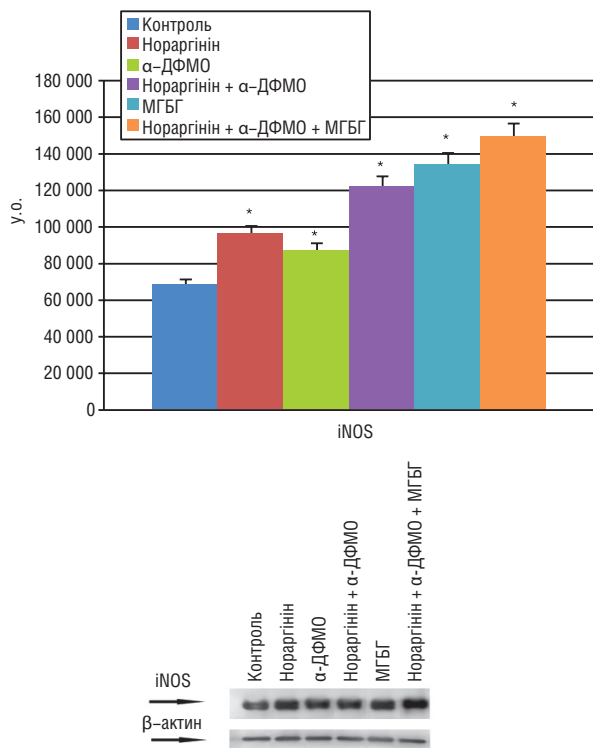


Рис. 5. Експресія iNOS у клітинах КЛЛ в умовах дії нораргініну, α-ДФМО та МГБГ при окремому та комбінованому їх застосуванні. * $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою

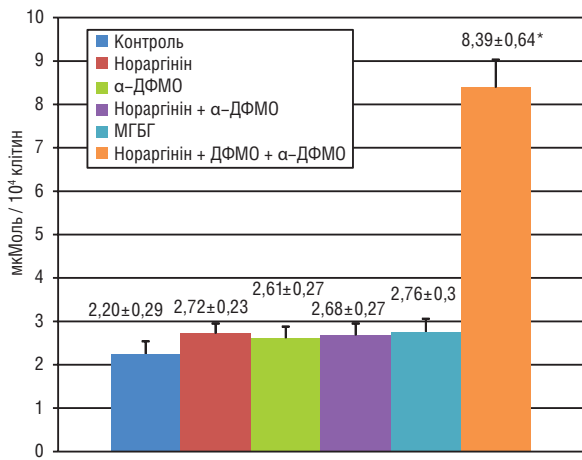
Щодо продуктів iNOS — NO, то характер дії досліджуваних агентів на їх рівень на 15-ту та 27-му добу був подібним до впливу на експресію iNOS: тільки при застосуванні комбінованої схеми, що включала нораргінін, α-ДФМО та МГБГ, спостерігали значне (в 3,8 та 3,0 раза відповідно) підвищення рівня NO у пухлинних клітинах (рис. 6).

Аналогічні дослідження біохімічних показників були проведені також на клітинах КЕ. Результати дослідження показали, що нораргінін у застосованих дозах призводить до зниження активності аргінази в пухлинних клітинах на 14% ($p < 0,05$) (рис. 7).

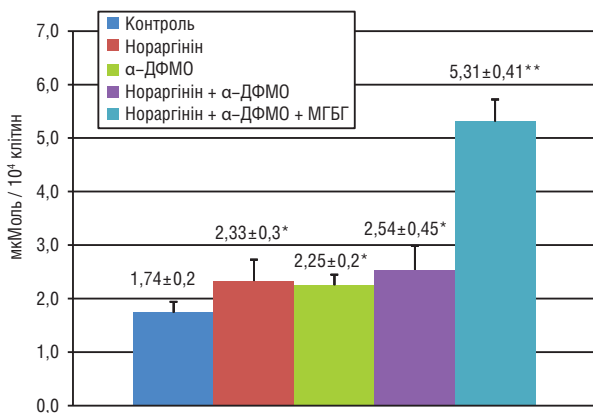
При використанні інгібіторів ферментів синтезу ПА (α-ДФМО і МГБГ) окремо або поєднано відмічали незначні зміни активності аргінази ($p > 0,05$). Разом з тим, при комбінованому введенні тваринам α-ДФМО, МГБГ і нораргініну активність аргінази знижувалася на 31% ($p < 0,01$) (див. рис. 7).

Експресія iNOS в клітинах КЕ, як при введенні мишам інгібіторів окремо, так і при застосуванні їх комбінацій, підвищувалася порівняно з показниками контрольних нелікованих тварин. Особливо помітно рівень експресії iNOS зростав при введенні тваринам лише нораргініну, α-ДФМО поєднано з МГБГ та у випадку комбінованого застосування всіх трьох інгібіторів (α-ДФМО + МГБГ + нораргінін) (рис. 8).

Введення тваринам із перещепленою КЕ α-ДФМО, МГБГ та нораргініну призводило до змін продукції NO пухлинними клітинами (рис. 9). Найбільшу кількість NO продукували пухлинні клітини, вилу-



а



б

Рис. 6. Рівень NO в клітинах КЛЛ на 15-ту (а) та 27-му (б) добу розвитку при окремому та комбінованому застосуванні α-ДФМО, МГБГ та нораргініну. *p < 0,05; **p < 0,01 порівняно з контрольною групою

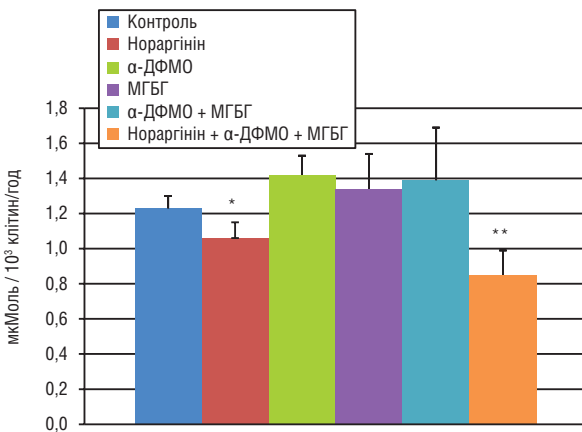


Рис. 7. Вплив α-ДФМО, МГБГ та нораргініну при комбінованому застосуванні на активність аргінази в клітинах КЕ; *p < 0,05; **p < 0,01 порівняно з контрольною групою

чені у тварин, які отримували комбінацію інгібіторів (α-ДФМО + МГБГ + нораргінін). Показники тварин цієї групи перевищували контрольні більше ніж у 5 разів. Двократне підвищення продукції NO виявлено в пухлинних клітинах тварин, що отримували норар-

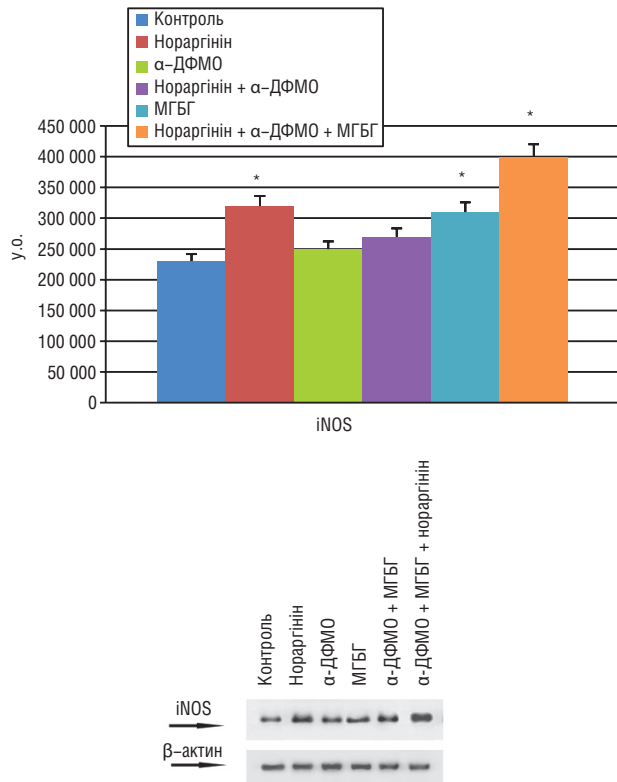


Рис. 8. Вплив α-ДФМО, МГБГ і нораргініну та їх дія при комбінованому застосуванні на експресію iNOS в клітинах КЕ. *p < 0,05 порівняно з контрольною групою

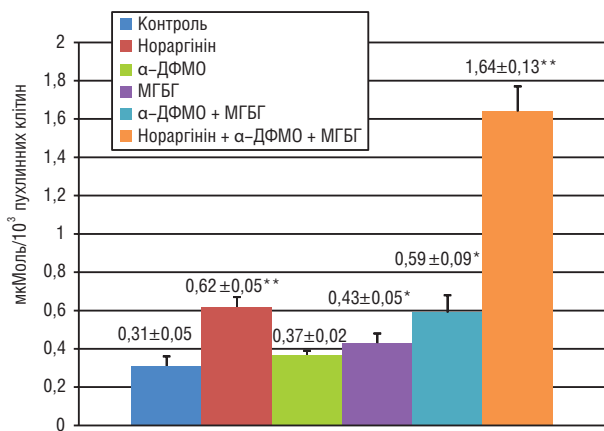


Рис. 9. Рівень NO в клітинах КЕ при окремому та комбінованому застосуванні α-ДФМО, МГБГ та нораргініну. *p < 0,05; **p < 0,01 порівняно з контрольною групою

гінін, а також α-ДФМО поєднано з МГБГ. При введенні тваринам лише α-ДФМО або МГБГ кількість NO, що продукувався пухлинними клітинами, була також вищою порівняно з показниками у контролі. Отримані дані корелювали з результатами експресії iNOS в клітинах КЕ відповідних груп тварин [31].

Отже, застосування інгібіторів ферментів синтезу ПА (α-ДФМО і МГБГ) у комбінації з інгібітором аргінази нораргініном призводило не тільки до зниження вмісту ПА, а й гальмування аргінази, зростання експресії iNOS та суттєвого збільшення продукції NO у пухлинних клітинах.

ВИСНОВКИ

1. Найвищий протипухлинний ефект, як у випадку перещеплення КЕ, так і КЛЛ, виявлено при комбінованому застосуванні у терапевтичних схемах інгібітора аргінази та інгібіторів синтезу ПА (нораргінін + α -ДФМО + МГБГ).

2. Використання в лікувальних схемах інгібітора ОДК (α -ДФМО), окремо чи в комбінаціях, призвело до різкого зменшення об'єму метастазів у легенях мишей із КЛЛ.

3. Гальмування росту пухлин супроводжувалося значним зменшенням вмісту путресцину і спермідину та зниженням індексу молярного співвідношення спд/спн в пухлинних клітинах.

4. Поєднане застосування інгібіторів (нораргінін + α -ДФМО + МГБГ) призвело до зростання експресії iNOS та різкого підвищення рівня NO у пухлинних клітинах, що, ймовірно, є однією з причин підсилення нораргініном протипухлинного ефекту α -ДФМО і МГБГ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Kuniyasu S. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; **30**: 95–9.
- Залеток СП. Полиаміни — маркери злоякісного росту і мішень для протипухлинної терапії. [Автореф дис... док биол наук]. Київ, 2007. 37 с.
- Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 244–58.
- Бердинских НК, Хоменко АК, Залеток СП и др. Полиамини и ферменты их синтеза при беременности и при опухолевом росте. Вестник АМН СССР 1980; (6): 72–4.
- Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4392–6.
- Edwards P, Cendan JC, Topping DB, et al. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis *in vivo*. *J Surg Res* 1996; **63**: 49–52.
- Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide dependent or independent mechanisms. *Cancer Res* 1994; **54** (9): 2462–7.
- Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* 2004; **26** (4): 321–9.
- Blachier F, Davila AM, Benamouzig R, Tome D. Channeling of arginine in NO and polyamine pathways in colonocytes and consequences. *Front Biosci* 2011; **16**: 1331–43.
- Blantz RC, Satriano J, Gabbai F, Kelly C. Biological effects of arginine metabolites. *Acta Physiol Scand* 2000; **168** (1): 21–5.
- Janakiram NB, Rao CV. Nitric Oxide: immune modulation of tumor growth/nitric oxide and cancer: pathogenesis and therapy. *B Bonavida*, ed. Springer International Publishing Switzerland, 2015: 159–70.
- Raj KP, Zell JA, Rock CL, et al. Role of dietary polyamines in a phase III clinical trial of difluoromethylornithine (DFMO) and sulindac for prevention of sporadic colorectal adenomas. *Br J Cancer* 2013; **108** (3): 512–8.
- Meyskens FL, Simoneau AR, Gerner EW. Chemoprevention of prostate cancer with the polyamine synthesis inhibitor difluoromethylornithine. *Recent Results Cancer Res* 2014; **202**: 115–20.
- Evageliou NF, Haber M, Vu A, et al. Polyamine antagonist therapies inhibit neuroblastoma initiation and progression. *Clin Cancer Res* 2016; **22** (17): 4391–404.

15. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 2004; **64** (16): 5839–49.

16. Kuo MT, Savaraj N, Feun LG. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *Oncotarget* 2010; **1** (4): 246–51.

17. Glazer ES, Stone EM, Zhu C, et al. Bioengineered human arginase I with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma xenografts. *Translational Oncol* 2011; **4** (3): 138–46.

18. Stone EM, Glazer ES, Chantranupong L, et al. Replacing Mn²⁺ with Co²⁺ in human arginase I enhances cytotoxicity towards L-Arginine auxotrophic cancer cell lines. *ACS Chem Biol* 2010; **5** (3): 333–42.

19. Курлищук ЮВ, Винницкая-Мироновская БО, Бобак ЯП, Стасык ОВ. Влияние метаболитов аргинина на жизнеспособность человеческих опухолевых клеток в условиях дефицита этой аминокислоты *in vitro*. *Біологічні Студії/Studia Biologica* 2011; **5** (2): 5–16.

20. Mauldin JP, Zeinali I, Kleypas K, et al. Recombinant human arginase toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation. *Translational Oncology* 2012; **5** (1): 26–31.

21. Tsai WB, Aiba I, Lee SY, et al. Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1 α /Sp4. *Mol Cancer Ther* 2009; **8** (12): 3223–33.

22. Кожем'якін ЮМ, Хромов ОС, Філоненко МА, Сайфедінова ГА. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. К.: Авіценна (Міністерство охорони здоров'я України. Державний фарм центр), 2002. 156 с.

23. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; **126** (1): 131–8.

24. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994; **174** (1–2): 231–5.

25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–5.

26. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; **166** (2): 368–79.

27. Лакін ГФ. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

28. Hayes CS, Shicora AC, Keough MP, et al. Polyamine-blocking therapy reverses immunosuppression in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2014; **2** (3): 274–85.

29. Ye C, Geng Z, Dominguez D, et al. Targeting ornithine decarboxylase by α -difluoromethylornithine inhibits tumor growth by impairing myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2016; **196** (2): 915–23.

30. Бердинских НК, Залеток СП. Полиамини и опухолевый рост. К.: Наукова думка, 1987. 141 с.

31. Яніш ЮВ, Артамонова АБ, Залеток СП. Вплив модулаторів метаболізму аргініну і поліамінів на активність аргінази та продукцію оксидів азоту клітинами асцитного раку Ерліха *in vitro*. *Клін онкол* 2016; **23** (3): 89–91.

NORARGININE ENHANCES THE ANTITUMOR ACTIVITY OF INHIBITORS OF POLYAMINES SYNTHESIS *IN VIVO*

S.P. Zaletok, S.V. Gogol, O.O. Klenov,
G.B. Artamonova, Yu.V. Yanish, V.V. Bentrud,
O.V. Karnauschenko, M.A. Knyrik

Summary. The polyamines are the determining factors for multiple links of the signal transduction pathway responsible for cell proliferation, differentiation and programmed cell death. The metabolism of arginine and polyamines

in the cells are interconnected, since the latter depends on the synthesis of ornithine resource as of foodborne and synthesized from arginine with the participation of arginase. In the absence of optimal concentrations of polyamines proliferation and growth of cells does not occur. Arginine is a substrate for nitric oxide synthase, which is also involved in the control of cell proliferation. This indicates that the metabolic pathways of arginine and polyamines may be a promising target for anticancer therapy.

Objective: to investigate the effect of arginase and polyamine synthesis inhibitors on growth of transplanted tumors in experimental animals and explore the possible mechanisms of antitumor effect of inhibitors. **Subjects and methods:** Lewis lung carcinoma and Ehrlich carcinoma; methods of experimental oncology, biochemistry, Western blot analysis and statistical methods were used. **Results:** it is shown that the inclusion in treatment of arginase inhibitor (norarginine) together with polyamine synthesis inhibitors (α -DFMO and MGBG) leads to increased inhibition of growth of Ehrlich carcinoma and growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in experimental ani-

mals. Inhibition of tumor growth was associated with decreased content of polyamines, changes of arginase activity, increased expression of iNOS and NO level in tumor cells. Conclusions: the increase of anti-tumor effect of the combined action of inhibitors of polyamines synthesis and arginase may be due to increase of iNOS expression and the increment of NO level in tumor cells.

Key Words: Ehrlich carcinoma, Lewis lung carcinoma, antitumor effect, inhibitors of arginase and polyamine synthesis, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide.

Адреса для листування:

Гоголь С.В.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: tantattoo72@gmail.com; seraban@yahoo.com

Одержано: 02.11.2016