

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ
ԱՎԱԳՅԱՆ ՀՈՎՀԱՆՆԵՍ ԽԱՉԻԿԻ

ESCHERICHIA COLI-ի ՀԱԿԱՕՔՍԻԴԱՆՍՅՒՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒ
L-ԱՐԳԻՆԻՆԻ ԵՎ ԿՐԵԱՏԻՆԻ ՆՅՈՒԹԱՓՈՒԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՊԱՏԿԵՐԸ
ԷՐԼԻԽԻ ԱՍՅԻՏՍՅՒՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄՍՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ
ԵՐԵՎԱՆ - 2015

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АВАГЯН ОВАНЕС ХАЧИКОВИЧ

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* И
МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ L-АРГИНИНА И КРЕАТИНА ПРИ
АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЕ ЭРЛИХА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – Биохимия

ЕРЕВАН-2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Ն. Բունիայանի
անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտում

Գիտական ղեկավար՝

կենս.գիտ. դոկտոր,

պրոֆեսոր Գ.Ա. Գևորգյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ

կենս.գիտ. դոկտոր,

պրոֆեսոր Ա.Ն. Թոշունյան

կենս.գիտ. դոկտոր,

Տ.Կ. Դավթյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Մ. Հերացու անվան Երևանի

պետական բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015 թ. նոյեմբերի 20-ին,
ժամը 14⁰⁰-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող կենսաֆիզիկայի
051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1,
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի
գրադարանում

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2015 թ. հոկտեմբերի 20-ին

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,

կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в институте биохимии им. Г. Бунятына НАН РА

Научный руководитель:

доктор биол. наук,

профессор Г.А. Геворгян

Официальные оппоненты:

член-корр. НАН РА,

доктор биол. наук,

профессор А.А. Трчунян

доктор биол. наук,

Т.К. Давтян

Ведущая организация:

Ереванский государственный медицинский
институт им. М. Гераци

Защита диссертации состоится 20-го ноября 2015 г., в 14⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 051 по биофизике ВАК РА при Ереванском
государственном университете (0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ
биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного
университета

Автореферат диссертации разослан 20 - го октября 2015 г.

Ученый секретарь специализированного совета 051,
кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным ВОЗ, рак - одна из основных причин смерти во всем мире, и около 70% всех случаев смерти от него приходится на страны с низким и средним уровнем дохода (ВОЗ/Инф. Бюл., 2012). Число раковых заболеваний и смертность от них продолжают расти, и почти половина онкологических больных не поддается терапии общепринятыми методами (N. Howlader et al., 2013). Злокачественные заболевания сопровождаются иммунодефицитом со снижением противоопухолевого иммунитета и активной малигнизацией клеток, что подтверждается данными о том, что канцерогены подавляют иммунитет (С.А. Куценко, 2003). Иммуностимулирование активирует механизмы врожденной и приобретенной резистентности, препятствуя опухолевому росту в организме, и используется для повышения эффективности онкотерапии (Д.К. Новиков, 2003). На факторы неспецифической резистентности значительное воздействие оказывают иммуностимуляторы, которые входят в состав клеток микроорганизмов (липополисахариды (ЛПС), пептидогликаны, мурамилдипептид, тейхоевые кислоты и др.) и активируют клеточный и гуморальный иммунитет (S. Patar et al., 2010). Основы микробиальной иммунотерапии рака заложены более ста лет назад: первые вакцины на основе *Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens* успешно использовались для лечения саркомы, карциномы, лимфомы, меланомы и миеломы (S.A. Hopton Cann et al., 2003). К новым штаммам микроорганизмов с антиканцерогенным действием, не оказывающим побочных эффектов, относится представитель облигатной микрофлоры млекопитающих, кишечная палочка (*Escherichia coli*), которая, будучи грамотрицательной бактерией, содержит ЛПС в качестве структурного компонента клеточной стенки (Jr. Evans et al., 2007). ЛПС кишечной микробиоты играет важную роль в регуляции иммунного гомеостаза, и его недостаточность сопровождается нарушением системных механизмов функционирования организма с развитием иммунодефицита (М.Ю. Яковлев, 2003). При обработке мышей ЛПС и/или грамотрицательными бактериями такими, как *E. coli* и пр., происходит выброс активированными макрофагами фактора некроза опухоли с последующим селективным лизисом опухолевых клеток (E.A. Carswell et al., 1975). При асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ), показано, что фаго-, и термолизаты *E. coli* повышают эффективность антиопухолевого воздействия ряда лекарственных препаратов, удлиняют среднее время выживаемости, порой вплоть до полного излечения (K. Gambashidze et al., 2012). Возможность практического использования *E. coli* в терапии злокачественных опухолей требует многостороннего изучения ее влияния: путей обмена, сопряженных с иммунной защитой организма, энергетические процессы и оксидативный стресс, вовлеченные в патогенез канцерогенеза.

Новый перспективной стратегией в лечении рака является регулирование метаболизма L-аргинина, который влияет на активность T-клеточного иммунитета и препятствует развитию иммунодефицита (M. Munder, 2009). В органах и тканях содержание аргинина в основном лимитируется аргиназой, которая расщепляет его на орнитин и мочевину, и представлена двумя формами: цитоплазматической (A1) и митохондриальной (A2) (V. Bansal, B. Ochoa, 2003; C.P. Jenkinson et al., 1996). Последние работы свидетельствуют об участии этого фермента в механизмах иммуносупрессии и подавлении противоопухолевого ответа (E.C. Hsueh et al., 2012). Аргиназа экспрессируется в опухолевых клеточных линиях, первичных очагах развития рака человека и мышей и участвует в синтезе полиаминов, промотирующих пролиферацию, а также подавляет активность синтазы оксида азота (NOS), и опосредуемую оксидом азота (NO) цитотоксичность в отношении опухоли (S.M. Mumenthaler et al., 2008). Есть и полностью противоположное проявление, когда

злокачественные опухоли, проявляющие аутокотрофность по аргинину, успешно лечат аргиназой и ее модифицированными формами (L.G. Feun et al., 2008; K. Morrow et al., 2013).

L-аргинин является также субстратом NO синтазы, которая конвертирует его в L-цитруллин и NO, плюрипотентный универсальный биомедиатор, который может оказывать про- и антиканцерогенное действие, альтернативно влияя на пролиферацию клеток, апоптоз, миграцию, инвазию, ангиогенез и другие процессы в биологии рака (A.J. Burke et al., 2013). NO продуцируется в цитоплазме и митохондриях, и его уровень зависит от проявления активности представленных в этих клеточных компартаментах основных форм NOS: конститутивные, нейрональная NOS, участвующая в механизмах сигнальной трансдукции, и эндотелиальная NOS, регулирующая кровообращение, и индуцибельная форма (iNOS), эффекторная молекула врожденной иммунной системы (W.K. Alderton et al., 2001). Развитие иммунодефицита при опухолевой агрессии связано с активированием свободнорадикального окисления (CPO) и подавлением антиоксидантной системы (АОС) организма, в которых iNOS принимает непосредственное участие (B.V. Лебедев, 2004; V. Demichelli et al., 2007).

Редипрокатная регуляция NO синтазы и аргиназы контролирует пул аргинина во всех органах и тканях, в которых они конкурируют за общий субстрат, и их взаимовлияние играет роль в процессах нейро-, и иммунорегуляции (M.J. Mori, 2007). При раке могут коиндуцироваться A1 и iNOS, и они подавляют функции цитотоксических лимфоцитов, участвуя в процессах иммуносупрессии, вследствие чего рассматриваются в качестве возможных терапевтических мишеней (N. Obermajer et al., 2012). Вышеуказанные ферменты в зависимости от внутриклеточной локализации и их взаимодействия могут оказывать разное воздействие на процессы малигнизации, на что влияют тип опухоли, стадия ее развития и прочие факторы. Вдобавок большая доля аргинина используется у млекопитающих для синтеза креатина (M.M.Jr. Sidney, 2004). Креатинкиназная система вовлечена в патогенетические процессы при канцерогенезе: она влияет на рост и апоптическую гибель опухолевых клеток, однако вклад митохондриальной и цитоплазматической изоформ креатинкиназы неоднозначен и требует изучения (S. Vera et al., 2008; X.L. Qian et al., 2012). Развитие опухоли определяется не только свойствами злокачественных клеток, но и фенотипом инфильтрующих и взаимодействующих с ней иммунных клеток, которые могут вызывать как деструкцию опухоли, так и стимулирование ее роста, инвазии в окружающие нормальные ткани и метастазирование (C.E. Lewis, J.W. Pollard, 2006). Исследование биохимических сдвигов в лейкоцитах при канцерогенезе, в частности касающиеся путей превращения аргинина, а также возможностей их модулирования при злокачественных опухолях ЖКТ представляют особый интерес, поскольку их прогноз часто неблагоприятен.

В основе патофизиологии заболеваний ЖКТ лежит взаимодействие между кишечником, микробиотой и нервной системой (S.M. O'Mahony et al., 2011). Одновременное изучение процессов злокачественного перерождения в брюшной полости и метаболических пертурбаций в ЦНС позволит пролить свет на комплексную патобиохимическую картину канцерогенеза и системные молекулярные механизмы микроботерапии, которые по сей день недостаточно изучены.

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение альтернативного метаболизирования L-аргинина, креатинкиназной системы и процессов свободнорадикального окисления в иммунных клетках, сосредоточенных в очаге опухолевого роста и крови, а также тканях головного мозга, и вовлечение этих процессов в механизмы бактериального противоопухолевого воздействия. Для осуществления вышеуказанной цели были поставлены следующие задачи: используя мышиную

модель перевиваемой злокачественной опухоли, асцитную карциному Эрлиха, изучить в митохондриях и цитоплазме лейкоцитов, выделенных из брюшной полости и крови, клеток головного мозга, а также в асците и плазме крови

- содержание L-аргинина и его метаболитов: L-орнитина, стабильных метаболитов оксида азота, L-цитруллина, креатина;
- активность аргиназы;
- активность синтазы оксида азота;
- активность креатинкиназы;
- перикисное окисление липидов;
- исследовать вышеуказанную биохимическую картину при инфицировании мышей-опухоленосителей непатогенным штаммом *E. coli* N 177.

Научная новизна работы. Впервые при АКЭ в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, и тканей головного мозга изучены дихотомическое метаболизирование L-аргинина аргиназой и NO синтазой, а также активность креатинкиназной системы и процессы свободнорадикального окисления. Выявлено, что в терминальной стадии развития опухоли, во всех исследуемых клеточных компартаментах происходит возрастание процессов ПОЛ и ассоциированное повышение содержания аргинина и субклеточной активности аргиназы и NOS, которые по-разному проявляются в лейкоцитах, в зависимости от того локализуются они в очаге развития опухоли или крови. Впервые интрацеллюлярные изменения исследуемых процессов выявлены в клеточных компартаментах тканей головного мозга. Сдвиги в вышеуказанном биохимическом паттерне впервые были изучены при инфицировании животных-опухоленосителей непатогенным штаммом *E. coli*, который преодолевает время выживания животных, со снижением их веса и объема асцитной жидкости. Показано, что введение *E. coli* вызывает системное подавление АКЭ-индуцированных процессов ПОЛ в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, а также клеток головного мозга. При этом в перитонеальных лейкоцитах мышей-опухоленосителей снижаются содержание аргинина, активность обеих изоформ аргиназы и цитоплазматической NOS, а в митохондриях восстанавливается подавленная активность креатинкиназы и повышается уровень креатина в них, с падением содержания последнего в опухолевых клетках. Впервые показано, что при инфицировании кишечной палочкой в гомогенатах клеток АКЭ полностью подавляется активность аргиназы и активируется NOS, что будет препятствовать процессам злокачественного роста. Выяснилось также, что при инфицировании *E. coli* еще больше активируются аргиназа и NOS в цитоплазме лейкоцитов крови, но снижаются их активности в митохондриях, что препятствует дисфункции последних. Впервые в тканях головного мозга выявлено *E. coli*-индуцированное повышение активности обеих изоформ аргиназы, на фоне высокого содержания аргинина, метаболически нацеленное на сдерживание продукции NOS/NO при АКЭ. Выяснилось также, что кишечная палочка оказывает регуляторное влияние на креатинкиназную систему крови и мозга и препятствует оттоку креатина из клеток, снижая его уровень в плазме крови, что способствует подавлению опухолевого роста.

Научно-практическое значение работы. Выявленные при АКЭ особенности альтернативного метаболизма L-аргинина аргиназой и NO синтазой и ассоциированные сдвиги в креатинкиназной системе, в митохондриях и цитоплазме, лейкоцитов брюшной полости, а также изменения исследуемой метаболической картины в крови и головном мозге углубляют и расширяют представления о внутриклеточных механизмах иммунного ответа при развитии опухолевого процесса в организме и системных метаболических сдвигах в системе кишечник-кровь-мозг.

Впервые при введении *E. coli* выявлено подавление процессов ПОЛ в исследуемых тканях, что свидетельствует о ее антиоксидантном влиянии. Обнаружено

модулирование со стороны *E. coli* дихотомических превращений аргинина и креатинкиназной системы в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови и головного мозга. Выявленные метаболические эффекты кишечной палочки необходимо учитывать при использовании ее в адьювантной терапии злокачественных опухолей. Полученные результаты указывают на целесообразность контролирования в клинике таких параметров, как уровень креатина и L-аргинина и продуктов их метаболизирования в перитонеальных лейкоцитах и асците, плазме и лейкоцитах крови онкобольных при их ведении. Они являются основанием для дальнейшего изучения возможностей внедрения авирулентных штаммов *E. coli* в клиническую практику, и необходимости исследования биохимических механизмов противоопухолевого влияния широкого спектра представителей облигатной микрофлоры.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на 2-й Интернет конференции «Грани науки 2013» совета молодых ученых и специалистов Казани, ежегодной международной конференции молодых ученых “Perspectives for development of molecular and cellular biology” (Ереван, 2013), конференции молодых ученых ААВ “New aspects in molecular biotechnology and biochemistry” (Ереван, 2013), расширенном заседании ученого совета института биохимии им. Г. Бунятына НАН РА (Ереван, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ (6 статей и 2 тезиса).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, изложения результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, содержит 15 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 272 источника.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали L-аргинин-HCl, L-валин, дитиотреитол, фиколл-400, верографин, трипановый синий, NEPES, EDTA, реактивы производства (“Sigma-Aldrich” Co. LLC), атакже декстран (70000) (“Pharmacosomes”, Дания), ДМЕМ (жидкая среда с Na₂CO₃, без глутамин) (“Serva”, Германия) и прочие производства “Reanal” (Венгрия) и “Реахим” (Россия). 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-х месячных беспородных белых мышках-самцах массой 20-21 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 обработке непатогенным штаммом *E. coli* N177 (выделенный из фекальной микрофлоры здорового человека и идентифицированный в клиническом центре «Арменикум» и НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Алексаняна МЗ РА). Через 2 дня после перевивки клеток АКЭ мышей разделяли на две опытные группы, одной из которых осуществляли асептическую одноразовую обработку поверхности глаз и полости рта ватным шпателем, пропитанным взвесью живых клеток *E. coli* (1 x 10⁹ кл /мл) (использовали смыв с суточных культур кишечной палочки и необходимые концентрации микробных взвесей получали с помощью эталонного бактериального стандарта мутности); параллельная опытная группа мышей с АКЭ служила “контролем” для

оценки влияния бактерий. На 11-й день после трансплантации АКЭ, всех опытных животных декапитировали.

Формирование асцитной карциномы Эрлиха у мышей осуществляли перевиванием клеток АКЭ, отбираемых у мышей-опухоленосителей, у которых культура клеток АКЭ поддерживалась в асците брюшной полости (Научно-технологический центр органической фармацевтической химии НАН РА). Трансплантацию клеток АКЭ осуществляли введением в брюшную полость мышей неразведенной асцитной жидкости в объеме 0,2 мл (1,5 x 10⁷ кл/мл).

Влияние *E. coli* оценивали по изменениям объема асцитной жидкости и соответственно массы тела, а также среднему времени выживаемости (СВВ) и проценту продления СВВ (ПСВВ), контролируемые в каждой группе путем ежедневной регистрации смертности, и рассчитывали согласно уравнениям (U.K. Mazumder et al., 1997):

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

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

Забор биологического материала. Мышей декапитировали, с последующим извлечением головного мозга, осуществляли забор крови и асцитной жидкости из брюшной полости (Е.В. Инжеваткин, 2004). Контрольным мышам после декапитации и фиксирования на пенопластовом столике в брюшную полость шприцем вводили по 3-5 мл 20 мМ НЕРЕС буфера рН 7,4, и с помощью шприца собирали суспензию клеток, которую центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM (жидкая среда (1x) с Na₂CO₃, без глутамин) и культивировали в термостате при 37°C в течение 24 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин и дважды промывали 20 мМ НЕРЕС буфером рН 7,4. Из асцитной жидкости клетки также осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин и промывали 20 мМ НЕРЕС буфером рН 7,4.

Выделение 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=70000), приготовленном на 0,9 % NaCl, инкубировали 1 ч при 37°C (при наклоне под углом 45 градусов), верхний слой декантировали и центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением лейкоцитов и тромбоцитов - в супернатанте получали плазму (Г. Фрик и др., 1979).

Лейкоциты брюшной полости и крови получали из соответствующих суспензий клеток, разведенных 1:1 (по объему) в 20 мМ НЕРЕС буфере рН 7,4, центрифугированием в двухступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина (1,129 и 1,087 г/см³) при 3000 об/мин 20 мин (Г. Фрик и др., 1979). Мононуклеары (лимфоциты и моноциты/макрофаги) и гранулоциты (полиморфноядерные лейкоциты) получали из верхнего и нижнего интерфазных колец, соответственно, дважды промывали исходным буфером и объединяли в единую фракцию для исследования.

Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций лейкоцитов брюшной полости и крови осуществляли методом дифференциального центрифугирования (Г.П. Дуже и др., 2003). Объединенную фракцию мононуклеаров и гранулоцитов разводили в 20 мМ НЕРЕС буфере рН 7,4, содержащем 0,25 М сахарозу, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (1500 об/мин) в течение 3-5 мин, и гомогенаты центрифугировали при 1200 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали при 11000 об/мин 20 мин при 4°C - в осадке получали митохондриальную фракцию, в супернатанте - цитоплазматическую.

Выделение митохондриальной и цитоплазматических фракций тканей головного мозга. Головной мозг рассекали ножницами и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (1500 об/мин) в течение 3 мин в 10-кратном объеме 20 мМ

HEPES буфера pH 7,4, содержащем 0,25 М сахарозу. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядер. Из надосадочной жидкости центрифугированием при 15000 об/мин 20 мин при 4°C в осадке получали митохондрии, в супернатанте - цитоплазму (J. Bustamante et al., 2007).

Определение стабильных метаболитов NO. Пробы депротеинизировали 0,5 N NaOH и 10% ZnSO₄ (в пропорции 1:1:1 по объему) и центрифугировали при 15000 об/мин 3 мин. В супернатантах уровень стабильных метаболитов определяли реакцией диазотирования с использованием реактива Грисса-Илюсия (смесь 0,3% сульфаниловой кислоты в 30% уксусной кислоте с 0,1% альфа-нафтиламином 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 (H.H.H.W. Schmidt, M. Kelm, 1996).

Активность NOS определяли по аккумуляции стабильных метаболитов NO после долговременной инкубации проб (22 ч, 37°C) в 20 mM HEPES буферер Н 7,4, содержащем 2 mM дитиотреитол, 3 mM MgCl₂·6H₂O в присутствии 5,3 mM L-аргинина, 0,2 mM NADPH, 20 мкМ(6R)-5,6,7,8-тетрагидрибиооптерина, 6 мкМ FAD, 5,5 мкМ FMN и 1,7 mM CaCl₂. В контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствие 5 mM N^G-монометил-L-аргинина, конкурентного неселективного природного ингибитора NOS. Активность NOS выражали в нмоль (NO₂⁻) · мг⁻¹ белка · 22 ч⁻¹.

Активность аргиназы определяли по аргинин-зависимому образованию орнитина в реакционной смеси методом Iyamu и др. (E.W. Iyamu et al., 2008), в собственной модификации. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 0,05 M NaOH-глициновом буфере pH 9,5 и/или 20 mM HEPES буфере pH 7,4 с добавлением 0,05 M MnCl₂ · 4H₂O и 0,1 M L-аргинина. В контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствие 60 mM L-валина, неконкурентного ингибитора аргиназы. Реакцию останавливали 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и центрифугировали при 15000 об/мин 3 мин. 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 · мг⁻¹ белка · ч⁻¹.

Активность креатинкиназы (КК) определяли по методу Эннора и Розенберга (цит. по И.И. Иванову и др., 1974) в собственной модификации. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 20 mM HEPES буфер pH 7,4, содержащий 5,5 mM креатинфосфата и 0,06% АДФ и. Реакцию останавливали осаждением белка в пробах введением 0,5 N NaOH и 10% ZnSO₄ (в пропорции 1:1 по объему), с последующим центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин и в супернатантах определяли содержание креатина. Активность КК оценивали по образованию креатина в обратной реакции переноса фосфатной группы с креатинфосфата на АДФ и выражали в мкмоль креатина · мг⁻¹ белка · ч⁻¹.

Определение содержания креатина. К супернатантам депротеинизированных проб добавляли 1% α-нафтол (приготовленный в 16% Na₂CO₃ и 6% NaOH) и 1% диацетил (в соотношении 1:1:0,2 по объему), выдерживали 20 мин в темноте при комнатной температуре, и спектрофотометрировали при длине волны 536 нм.

Определение содержания L-аргинина осуществляли модифицированным методом Akamatsy и Watanabe (S. Akamatsy, T.J. Watanabe, 1961). К супернатантам депротеинизированных проб добавляли дистиллированную воду, реактивную смесь (0,02% 8-оксихинолин в 96%-ном этиловом спирте, 2,5% сульфосалицилат натрия в 0,01 M глицине и 2,5% NaOH, 1:1:1 по объему) и 1% гипобромит натрия (в соотношении 0,5:1:0,5:0,1 по объему), тщательно перемешивали и спустя 15 мин спектрофотометрировали при длине волны 525 нм.

Определение содержания L-цитруллина осуществляли модифицированным методом Moore и Kauffman (R.B. Moore, N.J. Kauffman, 1970). К супернатантам проб, депротеинизированных 10% ТХУ, добавляли в соотношении 1:2 по объему реактивную смесь (9,6% H_2SO_4 в пропорции 1:1 по объему с реактивом (5мМ диацетилмоноксим, 0,9 мМ тиосемикарбазид и 0,025 мМ $FeCl_3$, в пропорции 1:1:1 по объему), нагревали 10 мин в кипящей водяной бане, после охлаждения спектрофотометрировали при длине волны 490 нм.

Определение показателей оксидативного стресса. Для оценки оксидативного повреждения тканей изучали уровень продуктов ПОЛ, которые являются маркерами оксидативного стресса: **А.** Пробы депротеинизировали 10% ТХУ и в супернатантах, полученных после центрифугирования при 15000 об/мин 5 мин, определяли ТБК-активные продукты по концентрации основного конечного продукта ПОЛ, малонового диальдегида (МДА) (Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, 1972). К супернатантам добавляли 0,72% ТБК и 0,6NНCl (в пропорции 1:0,8:0,2), смесь инкубировали 15 мин в кипящей водяной бане и после охлаждения определяли содержание МДА спектрофотометрически при длине волны 535 нм. **Б.** Свободнорадикальное окисление, индуцируемое двухвалентным железом, изучали в модельной системе неферментативного аскорбат-зависимого ПОЛ. Пробы инкубировали в течение 1ч при 37°C в 20 мМ HEPES буфере рН 7,4, 0,8 мМ аскорбиновой кислоте и 1,2 мкМ соли Мора ($FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$) (в соотношении 1:1 по объему), депротеинизировали 10% ТХУ и в супернатантах, полученных после центрифугирования при 15000 об/мин 5 мин, определяли прирост МДА (В.З. Ланкин, 2001).

Содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта (О.Н. Lowry et al., 1951).

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. Корреляции оценивали на основе расчета коэффициента линейной корреляции Пирсона (r). В качестве критерия достоверности принимали $p < 0.05$.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние инфицирования кишечной палочкой на перекисное окисление липидов при асцитной карциноме Эрлиха

Инфицирование мышей-опухоленосителей *E. coli* на вторые сутки после перевивки клеток АКЭ увеличивает СВВ на 75%, и на 11-й день после трансплантации АКЭ, снижает примерно втрое объем асцитной жидкости, и соответственно вес тела. Все эксперименты по изучению метаболического паттерна АКЭ проводили на 11 сутки развития опухоли. При АКЭ в перитонеальных лейкоцитах активируются процессы ПОЛ с возрастанием уровня МДА в 7,8, 41,1 и 11,3 и образования МДА *in vitro* – 40,7, 25,8 и 15,5 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях, соответственно (табл. 1). Эти параметры много ниже в клетках АКЭ, что обусловлено высокой активностью АОС в них на этой стадии их развития, повышающей их резистентность к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит свободнорадикальный механизм (Л.П. Смирнова, И.В. Кондакова, 2004). *E. coli* подавляет оксидативный стресс в цитоплазме и митохондриях перитонеальных лейкоцитов, препятствуя иммуносупрессии и ПОЛ-индуцированным разрушительным процессам, тогда как в клетках АКЭ образование МДА *in vitro* повышается вдвое. Кластеризация опухолевых клеток липидными рафтами подавляет их резистентность к лиганд-индуцированному

апоптозу, и способствует их эффективной элиминации (B. Rajak et al., 2008).

Таблица 1. Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в брюшной полости при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ).

Перитонеальные лейкоциты	а) пмоль МДА /мг белка		
	Контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	21.1 ± 4.5	165.3 ± 26.4***	85.2 ± 25.7**
Цитоплазма	15.4 ± 3.8	632.6 ± 65.8***	196.5 ± 27.3***
Митохондрии	18.9 ± 4.3	212.7 ± 34.2***	118.6 ± 23.7**
Клетки АКЭ		82.0 ± 11.2	97.0 ± 12.9#
Перитонеальные лейкоциты	б) пмоль МДА /мг белка/ч		
	Контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	4.7 ± 1.8	191.1 ± 29.7***	40.7 ± 9.0***
Цитоплазма	16.7 ± 3.4	431.6 ± 44.3***	181.4 ± 27.5**
Митохондрии	13.5 ± 2.3	209.1 ± 30.6***	168.3 ± 25.2*
Клетки АКЭ		14.8 ± 3.5	22.4 ± 4.1*

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 результатов *E. coli*-обработки по сравнению данными, полученными в отношении неинфицированных мышей-опухоленосителей.

Достоверность представлена обозначениями: # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Таблица 2. Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в крови при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ).

Лейкоциты крови	а) пмоль МДА /мг белка		
	Контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	56.0 ± 11.5	323.6 ± 36.4***	247.7 ± 32.7*
Цитоплазма	46.5 ± 9.8	333.4 ± 35.8***	187.7 ± 25.8*
Митохондрии	52.9 ± 10.3	271.3 ± 26.2***	96.6 ± 13.7***
Плазма	85.3 ± 14.2	391.8 ± 42.9***	266.2 ± 29.6**
Лейкоциты крови	б) пмоль МДА /мг белка/ч		
	Контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	33.6 ± 9.9	443.8 ± 48.2***	200.4 ± 24.7***
Цитоплазма	14.9 ± 3.4	252.5 ± 38.9***	111.6 ± 17.6**
Митохондрии	3.7 ± 1.2	147.7 ± 24.8***	13.3 ± 3.6***
Плазма	5.6 ± 1.4	16.4 ± 4.5**	2.5 ± 1.5***

Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

АКЭ стимулирует ПОЛ в субклеточных фракциях лейкоцитов крови и плазме, Обработка кишечной палочкой препятствует развитию ПОЛ, особенно образованию *in vitro* МДА (табл. 2). В тканях мозга оксидативный стресс менее выражен при АКЭ, но бактериальная обработка и в них подавляет ПОЛ, хотя и в меньшей степени, чем в брюшной полости и крови (табл. 3).

Таблица 3. Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ).

Головной мозг	а) пмоль МДА/мг белка		
	Контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	50.8 ± 7.5	113.1 ± 16.4**	108.4 ± 15.7#
Цитоплазма	110.8 ± 11.8	289.9 ± 32.8***	148.8 ± 17.3***
Митохондрии	49.9 ± 8.3	183.3 ± 24.2***	124.3 ± 12.9*
Головной мозг	б) пмоль МДА/мг белка/ч		
	Контроль	АКЭ	АКЭ/ <i>E. coli</i>
Гомогенат	41.5 ± 15.4	225.1 ± 26.9***	174.0 ± 23.4#
Цитоплазма	34.5 ± 10.6	314.0 ± 34.7***	229.9 ± 22.6*
Митохондрии	59.7 ± 13.2	287.4 ± 31.3***	218.2 ± 24.9*

Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Одним из механизмов подавления АКЭ-индуцированных процессов СРО при бактериальной обработке может быть антиоксидантная активность полиаминов самой *E. coli*, которая складывается из перехвата радикалов и активирования транскрипции протекторных белков за счет взаимодействия с ДНК (А.Г. Ткаченко, М.В. Федотова, 2007).

3.2. Влияние *E. coli* на аргиназную активность, содержание L-аргинина и L-орнитина в брюшной полости, крови и головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха

Аргиназа расщепляет аргинин на орнитин и мочевину, снижает противоопухолевый иммунитет, способствуя малигнизации тканей (Е.С. Hsueh et al., 2012). В органах и тканях млекопитающих аргиназа представлена двумя изоформами цитоплазматической (А1) и митохондриальной (А2) (S.M.Jr. Morris, 2012). Определение аргиназной активности осуществляли при физиологических значениях рН 7.4 и оптимальном для аргиназы рН 9,5. Выяснилось, что при рН 9,5 нивелируются изменения активности фермента и искажается картина внутриклеточных пертурбаций при АКЭ, поэтому анализ осуществляли на базе данных, полученных при рН 7.4. При АКЭ в перитонеальных лейкоцитах возрастают активности А1 и А2 примерно в 5 и 3 раза и не выявляется стимулирующее влияние основной среды (рН 9,5) на изоформы аргиназы (рис. 1). Активирование ПОЛ может выступать в роли триггера для обеих изоформ аргиназы. В макрофагах мышей А1 индуцируется окисленными и ацетилированными липопротеинами (А. Gallardo-Soler et al., 2008). В клетках АКЭ также детектируется аргиназная активность, которая возрастает более чем втрое при

pH 9,5, превышая в 1.2 раза такую в гомогенатах перитонеальных лейкоцитов. *E. coli* снижает в перитонеальных лейкоцитах активность A1 и общую (в гомогенатах), и нормализует A2. Восстанавливается активирующее влияние основной среды на обе изоформы аргиназы, а в клетках АКЭ аргиназная активность подавляется.

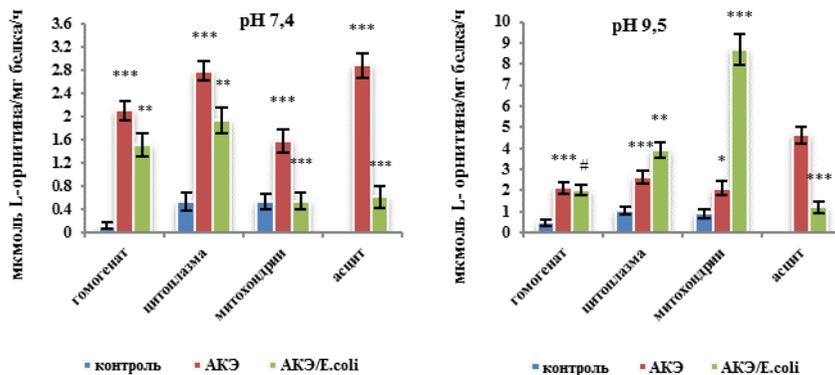


Рис. 1. Влияние *E. coli* на аргиназную активность в перитонеальных лейкоцитах и асците при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Сдвиги аргиназной активности коррелируют с внутриклеточными изменениями содержания L-орнитина (рис. 2). При АКЭ содержание L-аргинина, общего субстрата аргиназы и NOS повышается в 2, 4.4 и 2.3 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов, соответственно. В асците не обнаруживается аргинина и орнитина, которые полностью утилизируются опухолевыми клетками, что опосредованно указывает на функционирование в них биосинтеза полиаминов через обменные пути аргинин-орнитин-путресцин---полиамины.

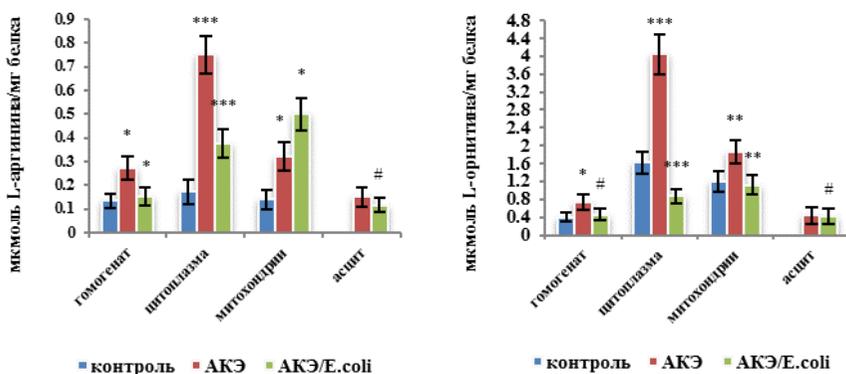


Рис. 2. Влияние *E. coli* на содержание L-аргинина и L-орнитина в перитонеальных лейкоцитах и асците при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

При АКЭ в гомогенатах лейкоцитов крови аргиназная активность возрастает примерно вдвое, а активности изоформ А1 и А2 - в 8 и 12 раз (при pH 7,4), соответственно (рис. 3). В плазме активность аргиназы повышается примерно втрое, и, возможно, высвобождение лейкоцитарного фермента в плазму, хотя у здоровых мышей она функционирует внутриклеточно (L.C. Jacobsen et al., 2007; M.Munder et al., 2005).

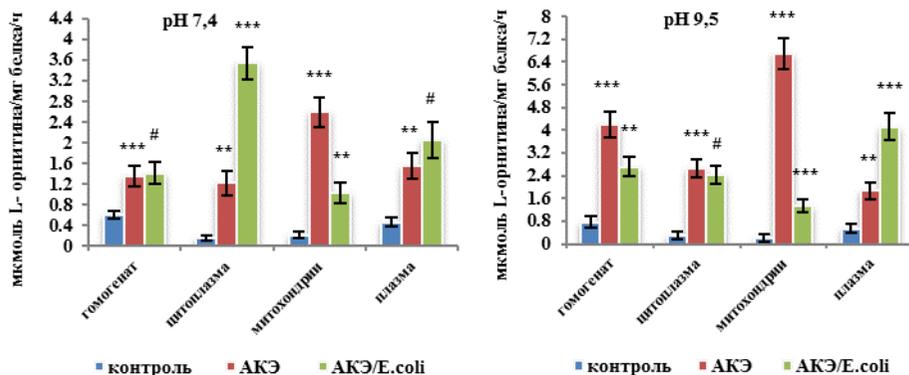


Рис. 3. Влияние *E.coli* на аргиназную активность в крови при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

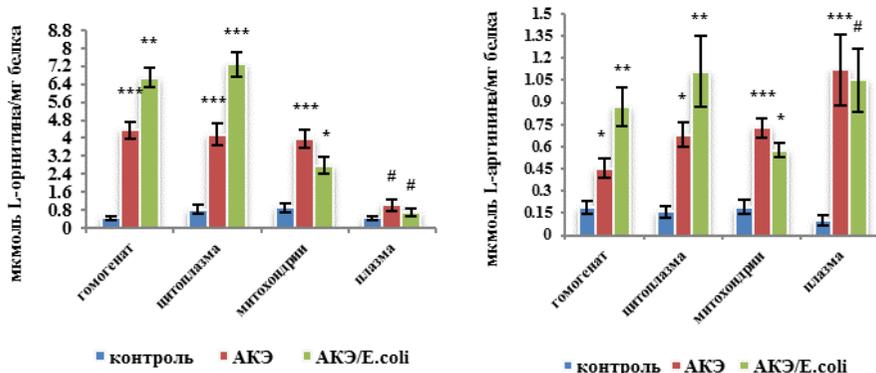


Рис. 4. Влияние *E. coli* на содержание L-орнитина и L-аргинина в крови при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

E. coli оказывает разнонаправленное воздействие на изоформы аргиназы: активность А1 возрастает почти втрое, а таковая А2 снижается в 2.5 раза по сравнению с больными мышами, хотя и выше контрольных значений. Во всех фракциях лейкоцитов крови между аргиназной активностью и содержанием орнитина наблюдается высокая положительная корреляция. При АКЭ в лейкоцитах крови содержание аргинина повышается в 2.4, 4.2 и 3.8 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях, а в плазме в еще большей степени – 11.2 раза (рис. 4). После бактериальной обработки уровень аргинина в гомогенатах и цитоплазме лейкоцитов

крови повышается в 1.9 и 1.6 раза, и не изменяется в митохондриях и плазме по сравнению с мышами-опухоленосителями.

При АКЭ в мозге полностью подавляется активность изоформы A1, а таковая A2 повышается, и соотношение их активностей внутри клеточных компартментов меняется в направлении доминирования A2 так же, как и в лейкоцитах крови. *E. coli* стимулирует A1 и A2, и их активность превышает норму, с доминированием A1. Положительная корреляция между аргиназной активностью и содержанием орнитина подтверждает их метаболическую связь и наблюдается в гомогенатах ($r=0.99$, $p<0.0001$), цитоплазме ($r=0.79$, $p=0.0001$) и митохондриях ($r=0.93$, $p<0.0001$) клеток головного мозга. При АКЭ уровень аргинина возрастает в 6.7, 5.1 и 4 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях клеток мозга, соответственно, а *E. coli* снижает его в 1.6 раза в митохондриях, не влияя в гомогенатах и цитоплазме.

3.3. Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота, содержание стабильных метаболитов оксида азота и L-цитруллин в брюшной полости, крови и головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха

Продукция NO в цитоплазме и митохондриях, зависит от проявления совокупной активности разных изоформ NOS (конститутивные NOS, нейрональная, участвующая в механизмах сигнальной трансдукции и эндотелиальная, регулирующая кровообращение, и индуцибельная (iNOS), которая является эффектором врожденной иммунной системы (W.K.Alderton et al., 2001). Все изоформы NOS представлены в цитоплазме и митохондриях нейтрофилов, лимфоцитов, нестимулированных моноцитов, а также в тканях головного мозга (S.S. Greenberg et al., 1998; T.Wallerath et al., 1997). АКЭ вызывает повышение общей активности NOS в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, а введение кишечной палочки нормализует ее в цитоплазме перитонеальных лейкоцитов, не влияя на таковую в митохондриях, тогда как в лейкоцитах крови снижает активность NOS в митохондриях, повышая ее в цитоплазме (рис. 5 и 6, соответственно). В плазме крови активность NOS отсутствует, но уровень нитритов возрастает в 14.7 раза, что свидетельствует об их высвобождении из лейкоцитов.

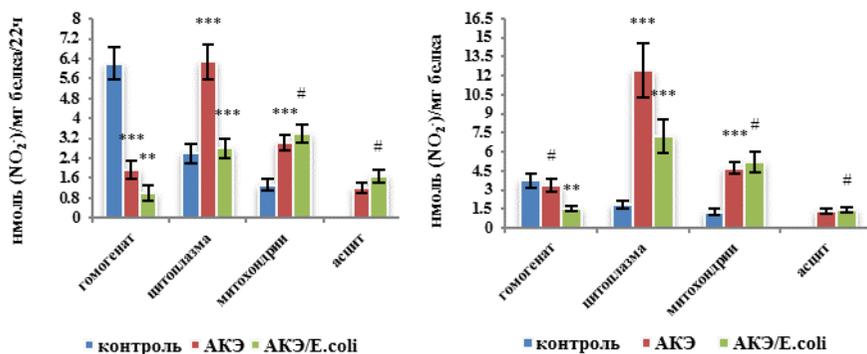


Рис. 5. Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота и содержание стабильных метаболитов NO в перитонеальных лейкоцитах и асците при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Активность NOS и содержание нитритов положительно коррелируют в гомогенатах ($r=0.76$, $p=0.0004$), цитоплазме ($r=0.88$, $p<0.0001$) и митохондриях ($r=0.99$, $p<0.0001$) перитонеальных лейкоцитов так же, как и активность NOS и уровень L-цитруллина в их гомогенатах ($r=0.77$, $p=0.0003$), цитоплазме ($r=0.89$, $p<0.0001$) и митохондриях ($r=0.78$, $p=0.0002$). В клетках АКЭ не детектировалась активность NOS, в асците содержание нитритов ниже, чем в гомогенатах изолированных лейкоцитов брюшной полости, что, возможно, обусловлено активным взаимодействием NO с АФК и метаболитами, продуцируемыми опухолевыми клетками. *E. coli* стимулирует активность NOS в клетках АКЭ, а изменений в уровне нитритов не наблюдается также, вероятно, вследствие взаимодействия NO с АФК с образованием пероксинитрита, мощного оксиданта, который не детектируется реакцией Грисса-Илосвая. В лейкоцитах крови определяется положительная корреляция между активностью NOS и содержанием L-цитруллина в гомогенатах ($r=0.97$, $p<0.0001$), цитоплазме ($r=0.97$, $p<0.0001$) и митохондриях ($r=0.92$, $p<0.0001$), и между активностью NOS и уровнем стабильных метаболитов NO в гомогенатах ($r=0.77$, $p=0.0003$), цитоплазме ($r=0.89$, $p<0.0001$) и митохондриях ($r=0.78$, $p=0.0002$).

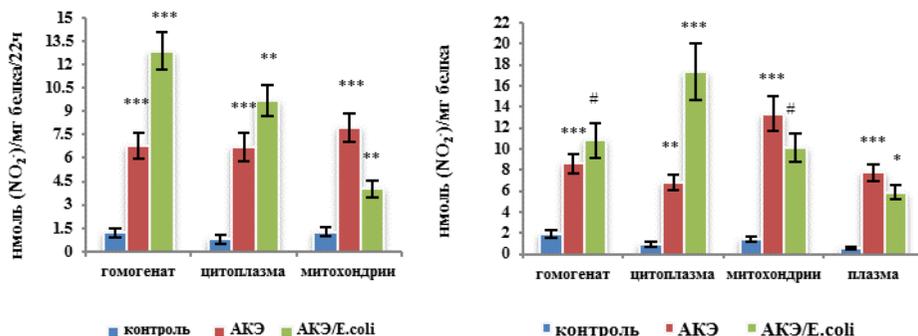


Рис. 6. Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота и содержание стабильных метаболитов NO в крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$.

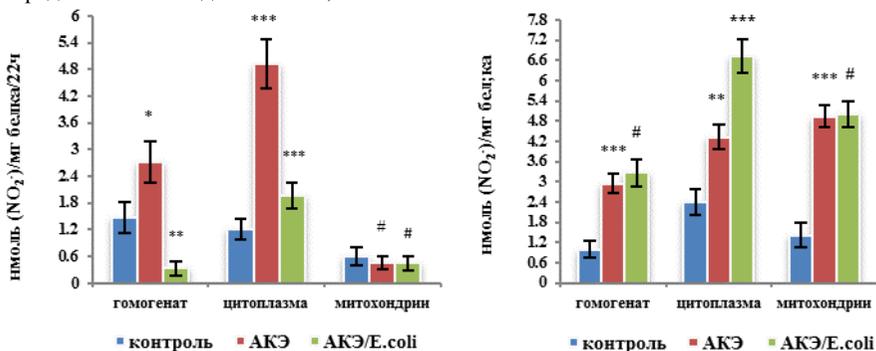


Рис. 7. Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота и содержание стабильных метаболитов NO в головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

В патофизиологии заболеваний ЖКТ играет роль нарушение двунаправленного взаимодействия между кишечником и нервной системой и наоборот (S.M. O'Mahony et al., 2011). Это подтверждается и при АКЭ - возрастает продукция NO и повышается содержание его стабильных метаболитов в гомогенатах и цитоплазме клеток головного мозга (рис. 7). В митохондриях не наблюдается сдвигов активности NOS, и возрастание в них нитритов идет за счет активирования изоформ NOS цитоплазматической локализации. *E. coli* нормализует активность NOS в цитоплазме, не влияя на таковую в митохондриях, однако уровень стабильных метаболитов NO даже несколько возрастает в цитоплазме, что, вероятно, связано со снижением интенсивности процессов оксидативного стресса в клетках головного мозга при введении кишечной палочки, что ограничивает синтез пероксинитрита и увеличивает уровень биодоступного NO.

3.4. Влияние *E. coli* на креатинкиназная активность и содержание креатина в брюшной полости, крови и головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха

Взаимопревращение креатинфосфат - креатин обеспечивает потребность в большом количестве энергии в короткие интервалы времени и осуществляется цитоплазматическими и митохондриальными изоформами креатинкиназы (цКК и мКК, соответственно), которые поддерживают жизнеспособность и пролиферативную активность как нормальных, так и раковых клеток (S. Patra et al., 2012). При АКЭ в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов активность КК возрастает в 5.5 и 2.9 раза, соответственно, а в митохондриях - падает примерно в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 8). Ингибирование мКК дестабилизирует мембранные структуры, энергообмен и функциональную эффективность клеток (O. Speer et al., 2005).

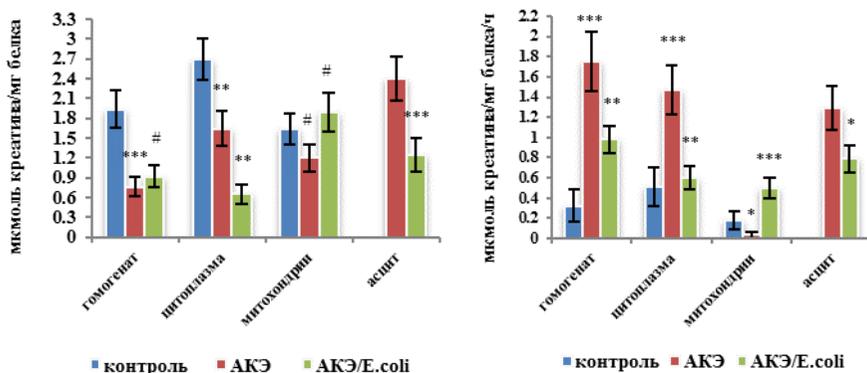


Рис. 8. Влияние *E. coli* на активность креатинкиназы и содержание креатина в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

При инфицировании *E. coli* активность цКК снижается до контрольных значений, а активность мКК возрастает, превышая норму в 2.9 раза. При этом изменение баланса активностей цКК и мКК в перитонеальных лейкоцитах, по-видимому, является одной из причин, препятствующих мобилизации креатина из них и значительного снижения

его уровня в клетках АКЭ, в которых он падает почти в 5 раз, снижая их энергообеспечение и рост.

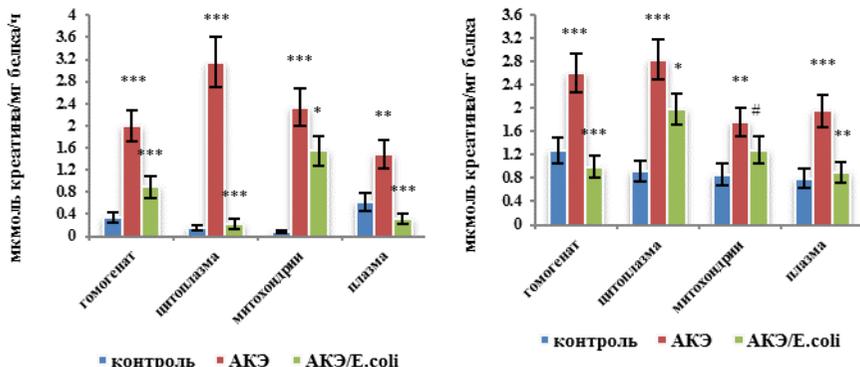


Рис. 9. Влияние *E. coli* на активность креатинкиназы и содержание креатина в крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Как видно из рисунка 9, при АКЭ в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови и в плазме происходит активирование системы креатин/КК. Кишечная палочка нормализует активность цКК и несколько снижает мКК, меняя внутриклеточный баланс активностей что, по-видимому, препятствует оттоку креатина, уровень которого падает в плазме крови, способствуя подавлению опухолевого роста и снижению объема асцитной жидкости.

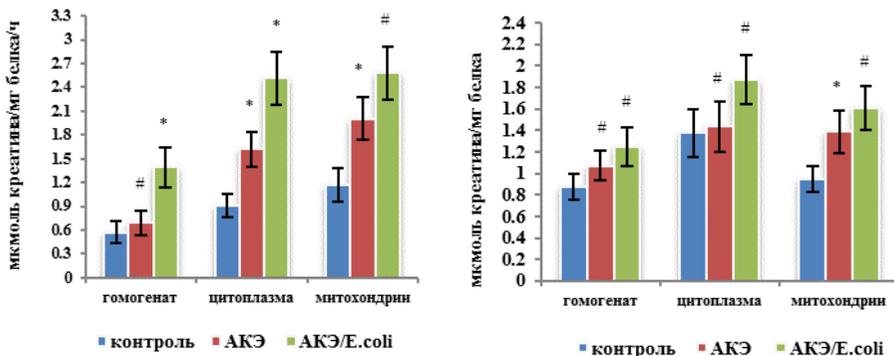


Рис. 10. Влияние *E. coli* на активность креатинкиназы и содержание креатина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=18$. Достоверность представлена обозначениями: # $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

В головном мозге при АКЭ также активируется система креатин/КК, подтверждая системный характер изменений (рис. 10). Введение *E. coli* еще больше активизирует креатинкиназу в цитоплазме, обеспечивая буферные возможности внутриклеточной среды и способствуя резистентности клеток, (M. Tokarska-Schlattner et al., 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На вторые сутки после трансплантации двухмесячным самцам белых мышей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) одноразовая неинвазивная обработка непатогенным штаммом *E. coli* поверхности глаз и полости рта животных продлевает на 75 % среднее время их выживания, а на 11-й день после прививки опухоли втрое снижает объем асцитной жидкости и ингибирует АКЭ-стимулированные процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, клеток головного мозга, а также плазме крови, в которых снижаются уровень МДА и образование МДА *in vitro* (в модельной системе неферментативного ПОЛ). Снижение процессов свободнорадикального окисления подавляет механизмы самоповреждения лейкоцитов и иммуносупрессии. Одновременно в опухолевых клетках *in vitro* вдвое повышается образование МДА, что указывает на ослабление их резистентности.

Впервые при АКЭ выявлено повышение содержания L-аргинина в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, клеток головного мозга, а также плазме, сопровождающееся активированием аргинин-метаболизирующих ферментов: аргиназы и синтазы оксида азота (NOS), коррелирующие с изменением содержания их продуктов: L-орнитина (аргиназная реакция) и L-цитруллина и стабильных продуктов окисления NO (NO синтазная реакция). Возрастание содержания внутриклеточного аргинина, по-видимому, обусловлено интенсивной деградацией белков при АКЭ-индуцированных процессах оксидативного стресса. Аргинин может вносить свой вклад в расщепление белков, через их посттрансляционное аргинилирование с последующей убиквитинизацией и протеолизом. Возрастание при АКЭ продуктов липопероксидации и содержания аргинина является триггером для цитоплазматической изоформы аргиназы (A1) и индуцибельной NOS. Впервые выявлен АКЭ-индуцированный дисбаланс в отношении изоформ аргиназы, отражающий особенности тканевого внутриклеточного метаболизма аргинина в терминальной стадии развития опухоли: в перитонеальных лейкоцитах активность A1 доминирует над митохондриальной изоформой (A2), противоположная картина - в лейкоцитах крови и тканях мозга, в которых активность A2 превалирует над таковой A1, влияя на уровень аргинина и его метаболитов и продукцию NO в митохондриях. Сверхактивирование NOS при АКЭ подавляет АОС лейкоцитов, способствуя оксидативному стрессу и может ингибировать (через нитрование) митохондриальную креатинкиназу (мКК) перитонеальных лейкоцитов, в которых при АКЭ выявлено пятикратное подавление активности мКК, что, по-видимому, облегчает мобилизацию креатина в клетки АКЭ, где его содержание вдвое выше, чем в лейкоцитах.

Впервые при АКЭ в системе ЖКТ-кровь-мозг показано, что инфицирование *E. coli* сопровождается изменениями во внутриклеточном метаболизме аргинина и креатина. Сосредотачиваясь в брюшной полости *E. coli* непосредственно воздействует на микроокружение опухолевых и иммунных клеток, локализованных в асцитной жидкости: в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов снижается содержание аргинина и активности A1 и A2, причем A2 нормализуется так же, как и цитоплазматическая NOS, что будет препятствовать NO-опосредуемым процессам апоптоза, оксидативного стресса, и ингибирования мКК. При инфицировании *E. coli* активность мКК восстанавливается и возрастает выше нормы, препятствуя оттоку креатина в клетки АКЭ, в которых его содержание падает в 5 раз и втрое ниже, чем в лейкоцитах. При этом в опухолевых клетках подавляется аргиназная активность, что может снижать синтез полиаминов и пролиферацию, а одновременное активирование NOS, индуцируемое *E. coli* в клетках АКЭ, может вызывать в них нитрозирующий стресс и подавлять АОС. В крови и мозге проявляется опосредованное влияние *E. coli* с вовлечением ЛПС, что подтверждается данными о стимулировании при введении

бактерии активности A1 и NOS в цитоплазме лейкоцитов крови, а также обеих изоформы аргиназы и цитоплазматической NOS в клетках мозга. Высокая активность NOS будет ограничивать диссеминацию микроба в крови и мозге, а еще большее возрастание активности аргиназы метаболически нацелено на нормализацию NOS. В то же время при введении *E. coli* в лейкоцитах крови снижаются активности A2 и NOS в митохондриях, способствуя нормализации их функций, и наблюдается стимулирование активности мКК в клетках крови и мозга, что препятствует оттоку из них креатина, уровень которого нормализуется в плазме крови, способствуя подавлению опухолевого роста и снижению объема асцитной жидкости.

Ингибирование *E. coli* процессов ПОЛ и модулирующее влияние на внутриклеточный метаболизм L-аргинина и креатина в лейкоцитах брюшной полости и крови и клетках мозга при АКЭ открывают новые перспективы ее использования в адьювантной терапии злокачественных опухолей.

ВЫВОДЫ

При асцитной карциноме Эрлиха

1. В цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови и тканях головного мозга мышей возрастают а) процессы перекисного окисления липидов: содержание малонового диальдегида и образование *in vitro* малонового диальдегида; б) активность аргиназы; в) активность синтазы оксида азота (NOS); г) содержание L-аргинина и продуктов аргиназы и NOS: L-орнитина, L-цитруллина и стабильных метаболитов NO.
2. Нарушается баланс активностей изоформ аргиназы: в лейкоцитах брюшной полости цитоплазматическая изоформа A1 доминирует над митохондриальной изоформой A2, а в лейкоцитах крови и тканях головного мозга - наоборот.
3. В перитонеальных лейкоцитах активность митохондриальной креатинкиназы снижается более чем в 5 раз, и уровень креатина падает вдвое по сравнению с его содержанием в клетках асцитной карциномы Эрлиха.
4. Инфицирование мышей-опухоленосителей на 2-й день трансплантации асцитной карциномы Эрлиха непатогенным штаммом *Escherichia coli* увеличивает на 75% среднее время выживания, втрое снижает объем асцитной жидкости и оказывает модулирующее влияние на исследуемую биохимическую картину:
 - Снижает содержание малонового диальдегида и образование *in vitro* малонового диальдегида в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови и тканей головного мозга. В клетках асцитной карциномы Эрлиха вдвое повышает образование *in vitro* малонового диальдегида.
 - В перитонеальных лейкоцитах снижает содержание L-аргинина и активности A1 и NOS в цитоплазме, нормализует активности A2 и NOS в митохондриях, восстанавливает и стимулирует активность митохондриальной креатинкиназы и повышает содержание креатина. В клетках асцитной карциномы Эрлиха содержание креатина падает в 5 раз, подавляется активность аргиназы, активизируется NOS.
 - В лейкоцитах крови повышает активности A1 и NOS в цитоплазме, снижает активность A2 в митохондриях, нормализует активность цитоплазматической креатинкиназы и уровень креатина в плазме.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Агабабова А.А., Мовсесян О.А., Оганнисян М.Р., Барсесян К.А., Геворкян Г.А. Особенности субклеточного метаболизма и влияние бактериальной терапии при асцитной карциноме Эрлиха: аргинин. Сообщение 1. Мед. Наука Армении, 2013, т. 53 (2), с. 22-33.
2. Авагян О.Х. Особенности субклеточного метаболизма и влияние бактериальной терапии при асцитной карциноме Эрлиха: креатин. Сообщение 2. Мед. Наука Армении, 2013, т. 53 (2), с. 34-42.
3. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Минасян Г.Г. Метаболический профиль L-аргинина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха и влияние противоопухолевой терапии авирулентными штаммами *Escherichia coli*: аргиназа. Сообщение 1. Доклады НАН РА, 2013, т. 113, (3), с. 295-302.
4. Агабабова А.А., Мовсесян Н.О., Акопян А.М., Авагян О.Х. Морфогистохимические изменения при асцитной карциноме Эрлиха на фоне воздействия кишечной палочки. Доклады НАН РА, 2013, т. 113, (3), с. 303-310.
5. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Агабабова А.А. 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. Доклады НАН РА, 2013, т. 113, (4), с. 378-386.
6. Авагян О.Х., Мовсесян О.А., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Мелконян Л.Г., Аванесян Л.Г., Геворкян Г.А. Антиканцерогенная и антиоксидантная активность непатогенного штамма кишечной палочки при асцитной карциноме Эрлиха. Мед. Наука Армении, 2015, т. 55 (2), с. 36-47.
7. Avagyan N.Kh. *Escherichia coli* antitumor activity and changes in L-arginine metabolic pathways in peritoneal and blood leucocyte. International young scientists conference "Perspectives for development of molecular and cellular biology-4" Yerevan, Armenia, October 21-22, 2013. Abstracts, Биол. Ж. Арм., 2013, доп. 1, т. 65 (3), с. 41-42.
8. Авагян О.Х., Алчуджян Н.Х., Мовсесян Н.О., Агабабова А.А., Мовсесян О.А. Антиопухолевые эффекты авирулентных штаммов кишечной палочки и ассоциированные изменения в перекисном окислении липидов и метаболизме L-аргинина при асцитной карциноме Эрлиха. 2-я Интернет конференция «Грани науки 2013». Совет молодых ученых и специалистов Казани. <http://grani2.kznscience.ru/>. Казань, апрель-июнь 2013, с. 369-370.

ԱՎԱԳՑԱՆ ՀՈՎՀԱՆՆԵՍ ԽԱՉԻԿԻ

***ESCHERICHIA COLI*-Ի ՀԱԿԱՕՔՄԻՂԱՆՍԱՑԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ L-ԱՐԳԻՆԻՆԻ ՈՒ ԿՐԵԱՏԻՆԻ ԼՅՈՒԹԱՓՈԽՆԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՊՏԱԿԵՐԸ ԷՐԼԻՄԻ ԱՍՑԻՏԱՑԻՆ ԿԱՐՑԻՆՈՄՍԱՑԻ ՇԱՄԱՆԱԿ**

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Հանգուցային բաւեր՝ Escherichia coli, ազոտի օքսիդի սինթազ, արգինազ, բջջապլազմա, գլխուղեղ, Էրլիխի սացիտային կարցինոմա, լեյկոցիտներ, լիպիդների գերօքսիդացում, կրեատին կինազ, միտոքոնդրիոմներ

Էրլիխի սացիտային կարցինոմայի (ԷԱԿ) փոխպատվաստման երկրորդ օրը երկամսյա արու սպիտակ մկների աչքերի ու բերանի խոռոչի միանվագ մշակումը *E. coli*-ի ոչ պաթոգեն շտամի օգտագործմամբ 75 %-ով երկարացնում է միջին գոյատևման ժամանակը, իսկ փոխպատվաստման 11-րդ օրը 3 անգամ նվազեցնում է սացիտային հեղուկի ծավալը և արգելակում ԷԱԿ-ինդուկցված լիպիդների գերօքսիդացման (ԼԳ) պրոցեսները՝ իջեցնում մալոնային դիալդեհիդի (ՄԴԱ) մակարդակը և նրա *in vitro* գոյացման գործընթացը (ոչ ֆերմենտային ԼԳ մոդել) որովայնի և արյան լեյկոցիտների ու գլխուղեղի բջիջների բջջապլազմայի և միտոքոնդրիոմների մեջ, և արյան պլազմայում, մեղմելով օքսիդատիվ սթրեսի և իմունային ճնշման գործընթացները: Մինչդեռ, ուռուցքային բջիջներում կրկնակի աճում է ՄԴԱ-ի գոյացումը *in vitro* պայմաններում, վկայելով իրենց դիմադրողականության նվազման մասին:

ԷԱԿ-ի վերջնափուլում առաջին անգամ բացահայտվել է L-արգինինի մակարդակի աճ որովայնի և արյան լեյկոցիտների և գլխուղեղի հյուսվածքների բջջապլազմայի և միտոքոնդրիոմների մեջ, ինչպես նաև արյան պլազմայում, որն ուղեկցվում է արգինին-նյութափոխանակող ֆերմենտների՝ ազոտի օքսիդի սինթազի (NOS) և արգինազի իզոմերի, ակտիվության խթանմամբ: Այդ փոփոխությունները փոխադարձ կապակցված են արգինինի մետաբոլիտների մակարդակի հետ՝ L-օրնիտինի (արգինազի ռեակցիան), L-ցիտրուլինի և NO-ի կայուն միացությունների (NOS-ի ռեակցիան): Արգինինի ներբջջային պարունակության աճը մասնավորապես պայմանավորված է ԷԱԿ-ինդուկցված օքսիդատիվ սթրեսի ժամանակ սպիտակուցների քայքայմամբ, որը կարող է խթանվել արգինինի կողմից՝ սպիտակուցների էտորանսպալցիոն արգինիլացման միջոցով, որին հետևում է նրանց ուրիկվիտինացումը և պրոթեոլիզը: Արգինինի աճը և ԼԳ արգասիքների գոյացման գործընթացները խթանում են արգինազի բջջապլազմային իզոֆերմենտի (A1) և ինդուկցվող NOS-ի ակտիվությունները: Բացահայտվել է արգինազի իզոմերի անհավասարակշռություն, որը պայմանավորված է արգինինի ներբջջային նյութափոխանակության հյուսվածքային առանձնահատկություններով ԷԱԿ-ի ժամանակ. որովայնի լեյկոցիտներում՝ A1-ի ակտիվությունը գերիշխում է արգինազի միտոքոնդրիոմային իզոֆերմենտի (A2) նկատմամբ, իսկ արյան լեյկոցիտներում և գլխուղեղի բջիջներում՝ A2-ի ակտիվությունը գերիշխում է A1-ի նկատմամբ, ինչը անդրադառնում է արգինինի ու նրա մետաբոլիտների մակարդակի և NO-ի

գոյացման վրա միտոքոնդրիումներում: NOS-ի գերակտիվությունը ԷԱԿ-ի ժամանակ խթանում է ազատ ռադիկալային օքսիդացման գործընթացը, արգելակում բջիջների հակաօքսիդանտային համակարգը, և կարող է միտոքոնդրիումներում եղանակով արգելակել միտոքոնդրիումային կրեատին կինազը (մԿԿ) ակտիվությունը, որի հնգապատիկ անկումը գրանցվել է որովայնի լեյկոցիտներում, նպաստելով կրեատինի արտահոսքի ԷԱԿ-բջիջներ, որոնց մեջ վերջինիս մակարդակը կրկնակի անգամ ավելի բարձր է քան լեյկոցիտներում:

Առաջին անգամ բացահայտվել է, որ ԷԱԿ-ի ժամանակ ստամոքսաաղիքային ուղի-արյուն-գլխուղեղ համակարգում աղիքային ցուպիկը ազդում է L-արգինինի և կրեատինի ներբջջային նյութափոխանակության վրա: Ներմուծված *E. coli*-ն կենտրոնանում է որովայնում և ուղղակիորեն ազդում է ասցիտային հեղուկում գտնվող ուռուցքային և իմունային բջիջների վրա. որովայնի լեյկոցիտների հոմոգենատներում և բջջապլազմայում նվազում են արգինինի մակարդակը, A1-ի ու A2 ակտիվությունները, կարգավորվում է NOS-ի ակտիվությունը բջջապլազմայում և խափանում NO-միջնորդավորված գործընթացները օքսիդատիվ սթրեսն ու ապոպտոզը, և մԿԿ-ի արգելակումը: *E. coli*-ի ներմուծումը կարգավորում է մԿԿ-ի ակտիվությունը որովայնի լեյկոցիտներում, կանխարգելում է կրեատինի արտահոսքը ԷԱԿ-բջիջներ, որտեղ նրա մակարդակը ընկնում է հինգ անգամ և երեք անգամ ավելի ցածր է, քան լեյկոցիտներում: Ուռուցքային բջիջներում արգելակվում է արգինազային ակտիվությունը, համապատասխանաբար պոլիամինների սինթեզն ու պրոլիֆերացիան, և խթանվում է NOS-ը, որը կարող է արգելակել հակաօքսիդանտային համակարգը և առաջացնել միտոքոնդրիումներում սթրես: Արյան մեջ և գլխուղեղում LՊՍ-ը միջնորդավորվում է *E. coli*-ի ազդեցությունը՝ դրա ապացույցն է արյան լեյկոցիտների բջջապլազմայում A1-ի և NOS-ի և գլխուղեղում արգինազի երկու իզոմերների և բջջապլազմայի NOS-ի ակտիվության խթանումը: NOS-ի բարձր ակտիվությունը արյան լեյկոցիտներում և գլխուղեղի բջիջներում կնպաստի մանրէի վերացմանը, իսկ արգինազի իզոմերների բարձր ակտիվությունը նյութափոխանակորեն միտված է կարգավորելու NOS-ի ակտիվությունը: *E. coli*-ի մշակման արդյունքում արյան լեյկոցիտներում նվազում է A2-ի ու NOS-ի ակտիվությունը միտոքոնդրիումներում նպաստելով նրանց ֆունկցիաների կարգավորմանը, իսկ արյան և գլխուղեղի ԿԿ համակարգի խթանումը ուղեկցվում է արյան պլազմայում կրեատինի մակարդակի կարգավորմամբ և ճնշում է ուռուցքի աճը և նվազեցնում ասցիտային հեղուկի ծավալը:

E. coli-ի արգելակիչ ազդեցությունը լիպիդների գերօքսիդացման գործընթացի վրա և արգինինի ու կրեատինի ենթաբջջային նյութափոխանակության կարգավորումը որովայնի և արյան լեյկոցիտներում ու գլխուղեղի հյուսվածքներում ԷԱԿ-ի ժամանակ նոր հեռանկարներ են բացում այդ մանրէի հետագա օգտագործման համար չարորակ ուռուցքների աղյուսանտային թերապիայում:

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ESCHERICHIA COLI* AND METABOLIC PROFILE OF L-ARGININE AND CREATINE IN EHRlich ASCITES CARCINOMA

SUMMARY

Key words: *Escherichia coli*, arginase, brain, creatine kinase, cytoplasm, Ehrlich ascites carcinoma, leukocyte, lipid peroxidation, mitochondria, nitric oxide synthase

Two days after Ehrlich ascites carcinoma (EAC) transplantation to two-month-old white male mice they were subjected to a single treatment of the eyes and mouth with non-pathogenic *E. coli* strain that increases life span by 75 %, and on 11-th day of EAC development decreases thrice the volume of ascitic fluid, and inhibits EAC-induced lipid peroxidation (LP) processes reducing the level of malondialdehyde (MDA) and its *in vitro* formation (in a non-enzymatic LP model system) in the cytoplasm and mitochondria of the peritoneal and blood leukocytes and brain tissues, as well as in blood plasma. Reduction of free radical oxidation processes could inhibit mechanisms of immunosuppression restoring leucocyte functional activity. Meanwhile, in tumor cells the MDA *in vitro* formation increased twice pointing to their diminished resistance.

For the first time we found an increase in the L-arginine content accompanied by upregulation of nitric oxide synthase (NOS) and arginase in the cytoplasm and mitochondria of peritoneal and blood leukocytes and brain tissues following EAC. The changes were correlated with the levels of L-ornithine (arginase reaction) and NO and L-citrulline (NOS reaction). EAC-induced exacerbation of oxidative stress apparently intensifies intracellular protein degradation that increases the content of arginine, which in turn could stimulate a posttranslational arginylation of proteins, subsequent ubiquitination and proteolysis. Elevated levels of L-arginine and lipid peroxidation products may trigger cytoplasmic isoform of arginase (A1) and inducible NOS. For the first time we revealed the EAC-induced imbalance in the arginase isoforms activity coupled to tissue-specific metabolic pathways at terminal stage of EAC. The A1 activity prevails over that of arginase mitochondrial isoform (A2) in the peritoneal leukocytes, whereas the A2 activity dominates that of A1 in blood leukocytes and brain tissues influencing arginine and its metabolites content and NO production in mitochondria. EAC-induced upregulation of the NOS may inhibit the antioxidant system and stimulate oxidative stress and contribute also to the five-fold inhibition of mitochondrial creatine kinase (mCK) (through its nitration) in the peritoneal leukocytes facilitating creatine mobilization by the EAC cells in which its level is two-fold higher than that of peritoneal leukocytes.

We showed for the first time that in gut-blood-brain axis *E. coli* treatment is accompanied by changes in the L-arginine and creatine intracellular pathways. After administration *E. coli* is generally accumulated in the peritoneal cavity and could exert direct effect on the tumor and immune cells localized in the ascitic fluid: the L-arginine levels are reduced in homogenate and cytoplasm of the peritoneal leukocytes, as well as the activities of A1 and A2. Since, the A2 and cytoplasmic NOS activities are normalized this may prevent NO-mediated processes, nitrosative stress, apoptosis, and mCK inhibition. Bacterial treatment stimulates the mCK activity which is restored and even overcomes the norm, and interferes with the creatine outcome from the leukocyte to EAC cells, in which the level of creatine dropped by 5 times and was thrice lower than that of leukocyte. *E. coli* infection is accompanied by an inhibition of the arginase activity in the tumor cells that may decrease the polyamine synthesis and cells proliferation, concomitantly *E. coli*-induced activation of the NOS in the EAC-cells may cause detrimental nitrosative stress and suppression of

antioxidant system. In blood and brain *E. coli* effects are mediated by LPS that is suggested by stimulation of the A1 and NOS activities in the cytoplasm of blood leukocytes, as well as those of A1 and A2 isoforms and cytoplasmic NOS in brain. Overactivation of NOS should restrict *E. coli* dissemination in blood and brain, whereas high arginase activity is metabolically aimed to modulation of the NOS activity. At the same time, *E. coli* causes a decrease in the A2 and NOS activities in the mitochondria of blood leukocyte contributing to the normalization of their functions, and activates the creatine kinase in the blood leukocyte and brain, preventing creatine outflow from cells and normalizing its level in the blood plasma thereby contributing to suppression of tumor growth and reduction of the ascitic fluid volume.

E. coli contribution to the inhibition of lipid peroxidation processes and modulation of the intracellular pathways of L-arginine and creatine in the peritoneal and blood leukocytes, and brain following EAC offer the potential of the further study to use *E. coli* in the adjuvant therapy of malignant tumors.