

**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**

**ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА  
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ**

**03.00.04 — БИОХИМИЯ**

**Научный руководитель:**

**доктор биологических наук, проф. Г.А. Геворкян**

**Ереван – 2015**

<b>О Г Л А В Л Е Н И Е</b>	<b>Стр.</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	3
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА ПЕРВАЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	10
1.1. L-аргинин: метаболизм, иммунорегуляция и канцерогенез.....	10
1.2. Креатин-креатинфосфат-креатинкиназная система: функции и малигнизация тканей .....	25
1.3. Микробы в онкотерапии: иммунобиохимические механизмы влияния .....	29
<b>ГЛАВА ВТОРАЯ. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	35
<b>ГЛАВА ТРЕТЬЯ. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	42
3.1. Влияние инфицирования кишечной палочкой на перекисное окисление липидов при асцитной карциноме Эрлиха .....	43
3.2. Влияние <i>E. coli</i> на аргиназную активность и содержание L-аргинина и L-орнитина в брюшной полости, крови и головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха .....	53
3.3. Влияние <i>E. coli</i> на активность синтазы оксида азота и содержание стабильных метаболитов оксида азота и L-цитруллина в брюшной полости, крови и головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха .....	65
3.4. Влияние <i>E. coli</i> на креатинкиназную активность и содержание креатина в брюшной полости, крови и головном мозге при асцитной карциноме Эрлиха .....	76
<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	83
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	100
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	102
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	104

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- A1 – цитоплазматическая аргиназа  
A2 – митохондриальная аргиназа  
АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха  
АОС – антиоксидантная система  
АСЛ – аргининосукцинатлиаза  
АСС – аргининосукцинатсинтетаза  
АФА – активные формы азота  
АФК – активные формы кислорода  
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста-1  
КК – креатинкиназа  
мКК – митохондриальная креатинкиназа  
цКК – цитоплазматическая креатинкиназа  
КФ – креатинфосфат  
ЛПС – липополисахарид  
МДА – малоновый диальдегид  
МСК – миелоидные супрессорные клетки  
ОАМ – опухоль-ассоциированные макрофаги  
ОКТ– орнитинкарбамоилтрансфераза  
ПН – пероксинитрит  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СОД – супероксиддисмутаза  
СРО – свободнорадикальное окисление  
IFN- $\gamma$  – интерферон-гамма  
NO – оксид азота  
NOS –синтаза оксида азота  
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота  
TNF- $\alpha$ – фактор некроза опухоли-альфа

## ВВЕДЕНИЕ

### 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). Общее 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, теихоевые кислоты и др.) и активируют клеточный и гуморальный иммунитет (S. Patyar 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 микробиоты 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 (Е.А. 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 (К. Gambashidze et al., 2012). Возможность практического использования *E. coli* в терапии злокачественных опухолей требует всестороннего изучения ее влияния на пути обмена, сопряженные с иммунной защитой организма, а также энергетические процессы и оксидативный стресс, вовлеченные в патогенетические механизмы канцерогенеза.

Одним из ныне разрабатываемых направлений и новой перспективной стратегией в лечении рака является регулирование метаболизма L-аргинина, который влияет на активность Т-клеточного иммунитета и препятствует развитию иммунодефицита (М. Munder, 2009). В органах и тканях содержание аргинина в основном лимитируется аргиназой, которая расщепляет его на орнитин и мочевину, и представлена двумя формами: цитоплазматической (А1) и митохондриальной (А2) (V. Bansal, В. Ochoa, 2003; С.Р. Jenkinson et al., 1996). Последние работы свидетельствуют об участии этого фермента в механизмах иммуносупрессии и подавлении противоопухолевого ответа (Е.С. 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). В то же время, есть и полностью противоположное проявление - злокачественные опухоли, проявляющие ауксотрофность по аргинину, успешно лечат аргиназой и ее модифицированными формами (L.G. Feun et al., 2008; К. Morrow et al., 2013).

Одновременно, L-аргинин является субстратом NO синтазы, конвертирующей 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 (А.А. Burke et al., 2013). NO продуцируется в цитоплазме и митохондриях, и его уровень зависит от проявления активности представленных в этих клеточных компартментах основных форм

NOS: конститутивные, к которым относятся 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.B. Лебедев, 2004; V. Demichelli et al., 2007).

Реципрокная 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 (Mori M.J., 2007). При раке могут коиндуцироваться A1 и iNOS, и есть данные, что 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 также влияют тип опухоли, стадия ее развития и прочие факторы. Примечательно, что 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, а также возможностей корректирующего воздействия кишечных коменсалов 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 метаболизма L-аргинина, креатинкиназной системы и процессов свободно-радикального 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, и 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;
- перекисное 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 компартментах

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 компартментах тканей головного мозга. Сдвиги в вышеуказанной биохимической картине впервые были изучены при инфицировании непатогенным штаммом *E. coli*, который продлевает время выживания мышей, снижает объем асцитной жидкости и соответственно вес животных. Показано, что введение *E. coli* вызывает системное подавление АКЭ-индуцированных процессов ПОЛ в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов, выделенных из 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 NO синтаза, что будет препятствовать процессам злокачественного роста. Выяснилось также, что при инфицировании *E. coli* еще больше активируются аргиназа и NOS в цитоплазме лейкоцитов крови, при одновременном снижении их активности в митохондриях, что будет препятствовать 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 позволяют углубить и расширить 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 косвенно свидетельствует о ее антиоксидантном влиянии. Показано также что *E. coli* оказывает модулирующее воздействие на дихотомические превращения аргинина и креатинкиназную систему в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, и головного мозга. Выявленные метаболические эффекты кишечной палочки необходимо учитывать при использовании ее в адъювантной терапии злокачественных опухолей. Полученные результаты указывают также 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.

**Место выполнения работы.** Биохимические эксперименты проводились в институте биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА. Выражаем глубокую благодарность старшему научному сотруднику Г.М. Степаняну (научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА) за предоставление клеток асцитной карциномы Эрлиха, а также микробиологу клинического центра «Арменикум» И.С. Акопян, директору НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Алексаняна МЗ РА, д.м.н., профессору Г.Г. Мелик-Андреасян и зав. лабораторией микробиологии к.м.н. Н.М. Арутюняну за предоставление непатогенного штамма *E. coli* N177, выделенного, из фекальной микрофлоры здорового человека и идентифицированного в клиническом центре «Арменикум» и НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Алексаняна МЗ РА.

## ГЛАВА ПЕРВАЯ

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. L-аргинин: метаболизм, иммунорегуляция и канцерогенез

L-аргинин, условно незаменимая аминокислота - ее экзогенные поступления необходимы в период роста, восстановления после физического стресса, хирургии и/или травмы: он оказывает иммуномодулирующие эффекты, влияя на активность Т-клеток естественных киллеров, уровень некоторых провоспалительных цитокинов и стимулирует секрецию гормона роста, пролактина, инсулина, инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), осуществляющих эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма (P.J. Porovic et al., 2007). Аргинин предотвращает инволюцию тимуса и повышает количество лимфоцитов после хирургического вмешательства (B.C. Tong, A. Barbul, 2004). Аргиназа является один из важнейших ферментов, катаболизирующих L-аргинин, она лимитирует его содержание в тканях и представлена цитоплазматической (A1) и митохондриальной (A2) изоформами – оба содержащие двухвалентный марганец тримерные белки с молекулярным весом 34700 и 35100 Да, соответственно (M. Mori, 2007). Первоначально высокая активность и экспрессия A1 были выявлены в печени и эритроцитах, тогда как A2 также обнаруживалась в почках, кишечнике, моноцитах/макрофагах, мозге млекопитающих, включая человека. Изоформа A1 широко экспрессируется в разных органах и тканях мышей так же, как универсальный митохондриальный изофермент A2 (H. Yu, 2003). При этом A2 вначале синтезируется, как пробелок, который импортируется в митохондрии, где после процессинга превращается в зрелую форму (S.D. Cederbaum et al., 2004).

Различия во внутриклеточной локализации разных изоформ обеспечивают дифференциацию их функций. Одна из важнейших функций A1 у млекопитающих - это участие в механизмах нейтрализации аммиака в цикле мочевинообразования, или цикле Кребса-Гензеляйта, в процессе которого из аммиака и углекислого газа синтезируется метаболически активная форма аммиака, макроэргическое соединение карбамоилфосфат, последний взаимодействует с орнитином с образованием цитруллина, из которого

синтезируется аргинин, далее следует замыкание цикла, с расщеплением аргинина аргиназой на орнитин и мочевины (G. Wu, S.M. Morris, 1998). Примечательно, что митохондриальная изоформа карбамоилфосфатсинтетазы I поставляет субстрат для образования цитруллина из орнитина, а цитоплазматическая карбамоилфосфатсинтетаза II, функционирует в синтезе пиримидинов (G. Wu et al., 2004). Нормальные клетки способны синтезировать аргинин внутриклеточно при участии фермента орнитинкарбамоилтрансферазы (ОКТ), которая переносит к орнитину карбамильный остаток карбамоилфосфата с образованием фосфорной кислоты и цитруллина - последний трансформируется в аргинин при последовательном воздействии двух тесно связанных ферментов, аргининосукцинатсинтетазы (АСС) и аргининосукцинатлазы (АСЛ), завершая процесс рециклизации аргинина из орнитина (R.J. Haines et al., 2011). Как следствие, чувствительность клеток к дефициту аргинина зависит от их способности к регенерации аргинина из таких альтернативных интермедиатов цикла мочевины, как орнитин, цитруллин и аргининосукцинат. В норме высокий уровень экспрессии ОКТ детектируется в печени и тонком кишечнике, а в некоторых органах и тканях и при определенных формах рака она подавляется эпигенетически вследствие метилирования ДНК (B.J. Dillon et al., 2004; D.N. Wheatley, 2005).

Орнитин, продуцируемый в аргиназной реакции, участвует в синтезе пролина и полиаминов и играет важную роль в клеточной пролиферации и заживлении ран (V. Bronte, P. Zanovello, 2005). В тканях млекопитающих L-орнитин декарбоксилаза является единственным источником путресцина, предшественника полиаминов (C.S. Coleman et al., 2004). Путресцин, агматин, а также полиамины играют важнейшую роль в иммунитете и стресс-ответе организма (R.A. Casero, A.E. Pegg, 2009). При этом в отличие от аргинина и агматина, которые легко преодолевают ГЭБ, у путресцина, спермина и спермидина этот процесс затруднен, и поэтому они синтезируются непосредственно в мозге из орнитина, который образуется при расщеплении аргинина аргиназой (J.E. Piletz et al., 2003). Обе изоформы аргиназы обнаружены в нейронах (но не глии), головного мозга грызунов и они влияют на уровень аргинина, орнитина, а также глутамата и ГАМК, участвуя в метаболическом контроле синтеза нейротрансмиттеров (C.P. Jenkinson et al., 1996; H. Yu et

al., 2001).

Дефицит аргиназы относится к нейрометаболическим болезням, вызывая спастическую параплегию, из-за чего при выявлении в раннем детстве, часто неправильно диагностируется, как ранняя стадия церебрального паралича (J.P. Tsang et al., 2012). Авторы описали дефицит аргиназы у 20-летней девушки, у которой обнаружили новую гомозиготную мутацию (NM\_000045.2 (ARG1):c.673del (p.Arg225GlyfsX5), сопровождающуюся спастической параплегией, прогрессирующей дистонией, периферической нейропатией, деменцией, эпилепсией, циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой. Мыши, гомозиготно делетированные по A1 умирают на 10-14 день после рождения вследствие нарушения цикла мочевины, а нокаутированные по A2 выживают, хотя у них снижается плодовитость (R.K. Iyer et al., 2002; O. Shi et al., 2001).

В физиологических условиях большую роль в регуляции уровня биодоступного аргинина играют аргининдекарбоксилаза и аргининдеиминаза, последняя активна при физиологических pH и ее сродство к аргинину ( $K_m$ ) в 1000 раз выше, чем у аргиназы, (B.J. Dillon et al., 2002; S.M.Jr. Morris, 2007). Аргининдекарбоксилаза синтезирует агматин, который является нейротрансмиттером, взаимодействует с разными рецепторами, включая имидазолиновые, оказывает нейропротекторное действие, влияет на механизмы наркозависимости и анальгезии, при депрессии снижается его содержание в мозге и тромбоцитах (A. Halaris, J. Plietz, 2007).

Аргиназная активность обнаружена в разных мышечных миелоидных клеточных линиях, а также в дендритных клетках и гранулоцитах (M. Munder et al., 2005). Chikungunya virus и Ross River virus (RRV) вызывают артритогенную альфа-вирусную инфекцию, воспалительные поражения опорно-двигательного аппарата и инфильтрацию макрофагов с M2-подобным фенотипом, для которых характерна высокая экспрессия A1 и Ym1/Chi3l3 в отсутствие FIZZ1/Relm $\alpha$ , причем мыши, делетированные по A1 в нейтрофилах и макрофагах, способны резко сократить вирусную нагрузку и ограничить поражение тканей на поздней стадии пост-RRV инфекции (K.A. Stoermer et al., 2012). ЛПС и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывают повышенный выброс супероксид-аниона с возрастанием вдвое активности A1 и уровня мРНК A1, а их стимулирующий эффект снимается при

ингибировании NADPH оксидазы апоцинином (S. Matthiesen et al., 2008). В мышечных макрофагах была продемонстрирована индукция A1 окисленными и ацетилированными липопротеинами (A. Gallardo-Soler et al., 2008).

L-аргинин является также субстратом для синтазы оксида азота (NOS), которая окисляет его до цитруллина с высвобождением оксида азота (NO) (U.A. Shinde et al., 2000). Наиболее изучены и известны “конститутивные”  $Ca^{2+}$ -кальмодулин (CaM)-зависимые NOS (сNOS) (нейрональная и эндотелиальная, nNOS и eNOS, соответственно) регулирующие работу нервной, сердечно-сосудистой и прочих систем организма, и  $Ca^{2+}$ -CaM-независимая “индуцибельная” NOS (iNOS), эффекторная молекула врожденной иммунной системы, участвующая в противоопухолевой, антипатогенной и противовоспалительной защите (W.K. Alderton et al., 2001). Изоформы NO синтазы имеют разное функциональное предназначение, причем в организме они могут оказывать прямо противоположное действие. Так, NO продуцируемый сNOS, блокирует активирование ядерного транскрипционного фактора (NF- $\kappa$ B) и тормозит высвобождение провоспалительных медиаторов, в то время как iNOS/NO – стимулирует (G.B. Stefano et al., 2000).

Оксид азота является универсальной полифункциональной сигнальной молекулой: он взаимодействует с широким спектром молекулярных мишеней и влияет на множество метаболических процессов, лежащих в основе важнейших физиологических эффектов: регулирует сократительную способность гладкой мускулатуры стенок сосудов и ЖКТ, мозговое кровообращение и работу сердца, влияет на активность генетического аппарата на уровне транскрипции и трансляции РНК (И.П. Серая, Я.Р. Нарциссов, 2002). Биофункции NO зависят как от локальной концентрации молекулярного кислорода, который окисляет его в нитриты и прочие окислы азота, так и от уровня супероксида, активно взаимодействующего с NO с образованием мощного окислителя пероксинитрита ( $ONOO^-$ , ПН) (R. Bruckdorfer, 2005). NO влияет на содержание свободного железа в организме, взаимодействуя с последним гораздо активнее, чем с кислородом, и тормозит образование в реакциях Фентона высокоактивных гидроксильных и феррильных радикалов и перферрильных ионов, препятствуя процессам перикисного окисления липидов (J. Kanner et al., 1991). NO обладает высоким сродством к гемопroteинам, тиолам

и связанными с ними молекулами, с которыми он образует диссоциируемые комплексы, влияя на их функции, и активное взаимодействие NO с металлами в составе пептидов и белков, к которым относятся множество оксидаз и оксигеназ, железосерные и медьсодержащие белки, препятствуя переходу железа и других металлов в высокоокисленную форму, предотвращает развитие разрушительных процессов, протектируя белки (M. Inoue et al., 2000; A. Tsai, 1994).

Программируемая клеточная гибель, или апоптоз инициируется NO: он вызывает апоптоз нейронов, мононуклеаров, клеток миелоидного ряда и т.д., стимулируя синтез супрессора роста опухолей p53, активируя каспазы, а также способствует выбросу из митохондрий проапоптических факторов, вызывая угнетение дыхания и деполяризацию митохондриальной мембраны (B. Brune et al., 1998). Однако, возможно и противоположное действие - NOS/NO-опосредуемое S-нитрозилирование остатков цистеина в активном центре каспаз ингибирует их активность (J. Li, T.R. Billiar, 2000). У многих клеток апоптоз сопровождается расщеплением поли(АДФ-рибоза)полимеразы, которая участвует в механизмах репарации ДНК и активируется оксидом азота (U.K. Mesmer et al., 1996). Авторы при этом отмечают, что сильное активирование фермента сопровождается падением запасов NAD<sup>+</sup> (донор ADP-рибозы), а попытки ресинтеза НАД истощают запасы АТФ, вызывая гибель клеток. Система NOS/NO в иммунных клетках представляет существенную антиканцерогенную и антипатогенную защиту (С.Я. Проскуряков и др., 2000). Сниженный уровень индуцированного синтеза оксида азота в иммунокомпетентных органах является одним из признаков наследственного дефекта в иммунной системе (С.В. Васильева и др., 2002).

Реципрокная регуляция NOS 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 (P.J. Popovic et al., 2007). Аргиназа не только конкурирует с NOS за общий субстрат, но и, снижая уровень аргинина, влияет на ее активность, поскольку L-аргинин стабилизирует структуру всех изоформ NOS (W.K. Alderton et al., 2001). Сборка димеров является лимитирующим фактором для iNOS: на RAW 264.7 линии макрофагов мышей показано, что лишь 25% синтезированных

субъединиц фермента собираются в активный димер, - процесс, зависящий от тетрагидробиоптерина, L-аргинина и включения гема в молекулу фермента (Q.A. Albaricri, D.J. Stuehr, 1996). Примечательно, что диетические добавки L аргинина повышают концентрацию кофактора NOS, тетрагидробиоптерина и синтез NO в клетках эндотелия, улучшая сосудистую функцию (R. Kohli et al., 2004). Тетрагидробиоптерин в еще большей мере, чем L-аргинин способствует сборке активных димеров изоформ NOS и стабилизации их структуры (R.H. Foxton et al., 2007).

При расщеплении аргинина аргиназой образуются орнитин и мочевины, которая подавляет самосборку мономеров NOS в активный димер в макрофагах, индуцируя их пролиферацию (Т. Moeslinger et al., 1999). В свою очередь первый интермедиат реакции NOS, N<sup>G</sup>-гидрокси-L-аргинин, является мощным ингибитором аргиназы печени и макрофагов (J.L. Boucher et al., 1994). Он ингибирует также аргиназу в клетках Caco-2 (клеточная линия рака толстой кишки человека) и при концентрации 3 mM подавляет их пролиферацию на 85%, которая предотвращается добавлением в клеточную культуру избытка орнитина, путресцина и полиаминов, а NO в форме DETA/NO (при концентрации от 1 до 30 mM) не влияет на аргиназу, но сGMP-независимо оказывает цитостатический эффект на клетки Caco-2, подавляя в них орнитиндекарбоксилазу (G.M. Vuga et al., 1998).

Взаиморегуляция iNOS и аргиназы обнаружена в лейкоцитах рыб, и, по-видимому, является эволюционно древней программой (M. Joerink et al., 2006). Аргиназа и NOS селективно регулируются TH1/TH2-цитокинами (A.R. Barksdale et al., 2004; M. Modolell et al., 1995). Оба фермента в макрофагах индуцируются ЛПС и смешанной реакцией лимфоцитов, а в мышечных миелоидных макрофагах аргиназа специфически индуцируется IL-4, IL-10, PGE-2 и нетоксичными или детоксифицированными производными ЛПС, тогда как IFN- $\gamma$  индуцирует исключительно NOS (I.M. Corraliza et al., 1995). Широкий диапазон воспалительных стимулов индуцирует аргиназу и iNOS: внутрибрюшинные инъекции соединений с провоспалительным действием - тиогликолята, каррагинана, казеина, вакцин против туберкулеза и болезни Ньюкасла (БН) стимулируют экспрессию и активность iNOS и аргиназы в перитонеальных макрофагах мышей и крыс: казеин – оба фермента, тиогликолят – аргиназу, БН-вакцина – iNOS (A. Hrabák et al., 2006). Отметим, что

каррагинан может быть причиной воспалительных заболеваний кишечника и вызывает рак ЖКТ крыс (J.K. Tobacman, 2001).

Цитокины хелперных Т- лимфоцитов (Th) CD4<sup>+</sup> играют важную роль в экспрессии iNOS при разворачивании защитных процессов и регулируют в макрофагах конкурентный баланс экспрессии iNOS и аргиназы, фермента, катаболизирующего субстрат для синтеза NO (M. Mori, T. Gotoh, 2000). При доминирующем иммунном Th1 ответе индуцируются IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , которые в свою очередь индуцируют iNOS и подавляют аргиназную активность, и наоборот – при Th2 ответе (при хронизации инфекции) продуцируется ряд цитокинов, в том числе IL-4, IL-10, усиливающих выработку аргиназы и подавляющих экспрессию iNOS (S.M. Morris et al., 1998). При гипоксии и иммуностимуляции цитокинами (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) и ЛПС (структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий), и тейхоевыми кислотами (составная часть клеточной стенки грамположительных бактерий) в условиях *in vitro* и *in vivo* могут индуцироваться разные изоформы NOS (A.C.F. Gorren, B. Mayer, 2002). В свою очередь экспрессия аргиназы в мышечных макрофагах индуцируется цитокинами Th2 клетками такими, как интерлейкины-4, -10, и -13 (C.I. Chang et al., 2000). Примечательно, что NO синтаза влияет на продукцию IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 и оказывает воздействие на весь спектр их биологических эффектов (A. Diefenbach et al., 1999; A.H. Miller et al., 2009).

Поскольку экспрессия A1 и iNOS реципрокно регулируется Th1 и Th2 цитокинами, предполагалось их альтернативное активирование подвидами иммунокомпетентных клеток (P. Sinha et al., 2005). Однако недавно было показано, что оба фермента образуются CD11b+IL-4  $\alpha$ 1 рецепторными МСК, которые производят Th1 и Th2 цитокины (IFN- $\gamma$  и ИЛ-13), и здесь действуют иные механизмы их селективного регулирования (G. Gallina et al., 2006). Условия микроокружения влияют на проявление про-, и противовоспалительного фенотипа макрофагов M1 или M2, соответственно: ЛПС-зависимое формирование специфического фенотипа цитокинового ответа макрофагов M1 индуцируется *in vitro* цитокинами Th1 клеток (IFN- $\gamma$ ) и характеризуется повышенной продукцией провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- $\alpha$ ), тогда как M2 активируется цитокинами Th 2



(IL-4 и/или IL-13) с возрастанием уровня противовоспалительных цитокинов таких, как IL-10 (S. Gordon, P.R. Taylor, 2005; D.M. Mosser, J.P. Edwards, 2008). Макрофаги экспрессируют обе изоформы аргиназы (J. Khallou-Laschet et al., 2010). Доказано, что повышенная экспрессия A1 в M2 клетках лимитирует биодоступность аргинина и препятствует перепродукции iNOS/NO, включаясь в противовоспалительные эффекты M2 макрофагов: у мышей, инфицированных *Schistosoma mansoni*, в развитии фиброза печени при шистосомозе ключевую роль играет активирование A1 цитокинами Th2, а IFN- $\gamma$  цитокиновый ответ Th1, стимулирующий iNOS, сопровождается селективным ингибированием A1 макрофагов со снижением строго регулируемого ею синтез пролина (M. Hesse et al., 2001; R. Rutschman et al., 2001). A2 экспрессирующие макрофаги играют противовоспалительную роль в печени (C. Marathe et al., 2008). Есть данные и об их провоспалительной роли: макрофаги костномозгового происхождения, которые экспрессируют исключительно A2, оказывают подобный эффект через АФК, продуцируемые митохондриями (X-F. Ming et al., 2010).

Обе изоформы аргиназы и NOS в норме коиндуцируются в перитонеальных макрофагах мышей при введении эндотоксина (Salimuddin et al., 1999). Авторы отмечают, что в отличие от мышей в перитонеальных макрофагах крыс ЛПС вызывает индукцию только A1, причем в/б введение ЛПС мышам вначале индуцирует A2 и iNOS в легких и селезенке, одновременно с транспортером катионных аминокислот, CAT 2 и мРНК ACC и ОДК, и только позже A1 в перитонеальных макрофагах и легких, то есть гены для двух изоформ аргиназ регулируются дифференциально, влияя на регуляцию продукции АФА и синтеза полиаминов, при этом имеют место видовые различия. Макрофагоподобные клетки мыши линии RAW 264.7, трансфецированные плазмидой A2 и обработанные LPS/IFN- $\gamma$ , избегали NO-зависимого апоптоза, вызваемого одновременной индукцией iNOS (T. Gotoh, M. Mori, 1999). И в этом случае индукция аргиназы идет медленнее, чем коиндукция iNOS, предположительно вследствие разновременной экспрессии ферментов: вначале iNOS и активно вырабатывается NO, а затем аргиназа, которая, лимитируя содержание аргинина препятствует устойчивой перепродукции iNOS/NO и повреждающему действию АФА. ЛПС *in vivo* вызывает коиндукцию iNOS и

исключительно A1 в перитонеальных макрофагах, легких и селезенке крыс (T. Sonoki et al., 1997). В клетках линии RAW 264.7 ЛПС индуцирует только митохондриальную A2, и iNOS, причем митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) опосредует экспрессию iNOS, а МАРК фосфатаза-1 переключает метаболизм аргинина с продукции NO на образование орнитина, хотя сверхэкспрессия МАРК фосфатазы-1, равно как ее дефицит не оказывает существенного влияния на экспрессию изоформ аргиназы, воздействуя только на экспрессию iNOS (T. Gotoh et al., 1996; L.D. Nelin et al., 2007).

Регулирование метаболизма L-аргинина с вовлечением аргиназы является новой перспективной стратегией в лечении рака и нежелательных иммунных и аутоиммунных отклонений (M. Munder, 2009). Кроме того в механизмах инициации, прогрессирования и распространения злокачественного роста играют роль L-аргинин-зависимый ферментативный синтез NO (D.S. Lind, 2004). Экспрессия аргиназы в первичных очагах развития рака человека, мышей, а также опухолевых клеточных линиях связана с ее участием в синтезе полиаминов, промотирующих малигнизацию, и подавлением NO-опосредуемой цитотоксичности в отношении опухоли (G. Wu et al., 1998; S.M. Mumenthaler et al., 2008). В то же время оба фермента, A1 и iNOS коиндуцируются и участвуют в процессах иммуносупрессии при раке (N. Obermayer et al., 2012).

Развитие опухоли определяется не только свойствами злокачественных клеток, но и фенотипом инфильтрирующих опухоль и взаимодействующих с ней лейкоцитов, МСК, которое может привести как к разрушению опухоли, так и стимулированию ее роста, инвазии тканей и метастазам (C.E. Lewis, J.W. Pollard, 2006). Ключевым механизмом уклонения опухоли от иммунной защиты является индуцированное нарушение функций T-клеток (M.H. Kershaw et al., 2005). Иммуногистохимический анализ срезов тканей меланомы *in situ*, инвазивной меланомы на разных стадиях роста и метастатической меланомы показал, что баланс экспрессии iNOS и аргиназы в опухоль-ассоциированных макрофагах (ОАМ) играет ключевую роль в прогрессировании опухоли, а именно: iNOS-позитивные ОАМ преобладают в меланоме *in situ* и тонких меланомах (в около- и внутриопухолевых тканях), а ОАМ-позитивные по аргиназе – в более развитых и плотных опухолях (D. Massi et al., 2007). Авторы показали, что кокультивирование клеточной

линии меланомы мышей B16 с ОАМ стимулирует в последних продукцию iNOS/NO, которая лишь в присутствии IFN- $\gamma$  достигает концентраций, оказывающих противоопухолевый эффект.

Транспортная система у(+) осуществляет селективный транспорт катионных аминокислот, включая L-аргинин (E.I. Closs et al., 2004). CAT (cationic amino acid transporters) строго регулируется и коиндуцируется с аргинин-метаболизирующими ферментами, поставляя для них субстрат, как это наблюдается у раковых больных и в экспериментальных моделях злокачественных опухолей у мыши (W.C. Lin et al., 2005; P.C. Rodriguez, A.C. Ochoa, 2008). Макрофаги мышей конститутивно экспрессируют CAT-1, а CAT-2 индуцируется при их классическом (IFN- $\gamma$ ) или альтернативном (IL-4, IL-10) активировании, и усиление катаболизма аргинина при индукции iNOS и аргиназы происходит за счет координированного повышения поглощения аминокислоты этими клетками (P.C. Rodriguez et al., 2008; A.Yeremian et al., 2006). В условиях *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что главная роль CAT2 – оптимизировать продукцию NO в классически активированных макрофагах мышей, и лимитировать аргиназную активность в их альтернативном типе, включаясь в регуляцию иммунитета, причем конститутивный транспортер аргинина CAT1 обеспечивает поддержание активности аргиназы (R.W. Thompson et al., 2008). В МСК мышей-опухоленосителей CAT и CAT2B коиндуцируются с A1 (P.C. Rodriguez et al., 2004). Эффективный контроль роста 3LL карциномы легких мышей осуществляется посредством ингибирования экспрессируемой в тканях опухоли циклооксигеназы-2 с предотвращением индукции аргиназы в МСК простагландином E2 (P.C. Rodriguez et al., 2005). Подавление A1 в МСК мышей ингибиторами фосфодиэстеразы-5 повышает спонтанный антиопухолевый ответ и эффективность адаптационной Т-клеточной терапии (P. Serafini et al., 2006).

На ранних стадиях у пациентов с раком груди наблюдается значительное возрастание A1 в крови, а также внутри опухоли, но не за счет гранулоцитов, а МСК, при этом повышение экспрессии A1 коррелирует с прогрессированием опухоли и наоборот: снижением уровня A1 сопровождается подавлением опухолевого роста (J. deBoniface et al., 2012). Активность A2 также повышается при раке груди, толстой кишки и простаты для

постоянного снабжения полиаминами необходимыми для роста опухоли (R. Singh et al., 2000; S.M. Mumenthaler et al., 2008). Мышиная клеточная линия карциномы почек характеризуется высоким уровнем экспрессии A2 вызывает селективное расщепление экстрацеллюлярного аргинина, которое приводит к Т-клеточной дисфункции и стимулированию роста опухоли (D.J.Jr. Tate et al., 2008). Отметим, что Т-лимфоциты не способны генерировать аргинин и транспортируют его извне - депривация аргинина подавляет экспрессию CD3 $\zeta$  цепочки Т-клеточных рецепторов в кокультивируемых Jurkat Т-клетках, причем ингибиторы аргиназы существенно подавляют рост клеток в клеточных линиях с высокой активностью A2 (D.J.Jr. Tate et al., 2012).

При раке подавление Т-клеточного ответа снижает терапевтическую эффективность антиканцерогенных вакцин и других форм иммунотерапии, при этом в опухолевой ткани, крови и лимфоидных органах аккумулируются активированные миелоидные (костномозгового происхождения) супрессорные клетки (МСК), которые состоят из миелоидных предшественников незрелых моноцитов/макрофагов, гранулоцитов, и дендритных клеток, последние выполняют антигенпрезентирующую функцию, промотируют пролиферацию и дифференцировку антигенспецифических Т-лимфоцитов, инициируя и стимулируя иммунный ответ (D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj, 2009). При малигнизации в МСК возрастает активность A1 и iNOS, и продукция АФК и АФА, благодаря чему они мощно подавляют различные функции Т-клеток и являются терапевтической мишенью в онкотерапии (V. Bronte, P. Zanovello, 2005). В крови детектируется возрастание на порядок числа МСК и ассоциированное стимулирование изоформы A1 с одновременным снижением чувствительности Т-лимфоцитов, причем экспрессия A1 в опухоли даже выше, чем в крови (P. Raber et al., 2012). При раке пищевода в периферической крови больных возрастают доля МСК с 1% до 15% и уровней мРНК iNOS и A1 примерно втрое (Z.-J. Jiao et al., 2012). Примечательно, что количество A1-экспрессирующих клеток крови миелоидной популяции падает после хирургического удаления опухоли (J. de Boniface et al., 2012). При раке поджелудочной железы человека также возрастает активность A1 гранулоцитов и мононуклеаров, которая коррелирует с числом CD16+ циркулирующих клеток – оба параметра значительно снижаются после

хирургического удаления опухоли (P.J. Porovic et al., 2007). Активированные Т-клетки при их культивировании в среде без аргинина, или при кокультивировании с МСК, выделенными из опухолей и продуцирующими А1, характеризуются пониженной пролиферацией, низкой экспрессией CD3 $\zeta$  цепочки Т-клеточного рецептора и подавленной продукцией ЦК (P.C. Rodriguez et al., 2004). У большинства мышей с подкожной BW-Sp3 лимфомой активируется CD8(+) Т-клеточный ответ, вызывающий регрессию опухоли, но у некоторых реципиентов опухоль прогрессирует, вследствие инактивирования цитоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), обусловленное непосредственным клеточным контактом (Y. Liu et al., 2003). Авторы показали, что при этом супрессорная популяция ЦТЛ проявляет высокую аргиназную активность, предположительно связанную с супрессорным фенотипом альтернативно активированных клеток миелоидного ряда.

Накоплен обширный доказательный материал в условиях *in vitro* и *in vivo*, что удаление, или лишение аргинина представляется весьма перспективным направлением в онкотерапии (L.G. Feun et al., 2008). Предлагаются патенты по использованию аргинин-расщепляющих ферментов, в том числе и бактерий, богатых аргининдезиминой, молочнокислых бактерий для профилактики и лечения опухолей, включая глиому, нейробластому, чешуйчатую карциному ротовой полости, лимфоидные опухоли, рак ободочной-прямой кишки, печени, простаты, мочевого пузыря, молочной железы, плевры и брюшины, (патент 006018 Евразийская патентная организация, ЕАПВ Россия). Пищевые добавки аргинина стимулируют специфические и неспецифические противоопухолевые механизмы, замедляют рост опухоли и продлевают выживаемость животных в некоторых моделях опухоли (J.K. Stechmiller et al., 2004). Диетический аргинин-аспартат снижает содержание ИФР-1 и связывающего его белка-3 (S. Blazejewski et al., 2009). Однако показано, что уровень ИФР-1 и гормона роста повышается в сыворотке крови спортсменов, которые при тяжелых нагрузочных тренировках получали диетические добавки аргинина и орнитина (A. Zajac et al., 2010). Доказано участие в инициации и прогрессировании неопластических процессов ИФР-1 и его рецепторов: высокий уровень их экспрессии является характерным признаком озлокачествления ткани, который ассоциируется с резистентностью к хемо- и радиотерапии, и их ингибирование может

быть использовано в терапевтических целях (F.I. Arnaldez, L.J. Helman, 2012). Примечательно, что введение рецепторов ИФР-1 повышает жизнеспособность клеток HeLa (карциномы шейки матки человека), препятствуя цитотоксичному действию эводиамина, которое опосредуется АФК и NO подавлением G2/M клеточного цикла (через регуляцию p53, p21, клеточного цикла деления 25C (Cdc25C), Cdc2 и циклинаB1) (J. Yang et al., 2010). В опухолевых клеточных линиях человека: карциномы кератиноцитов A431, аденокарциномы легких A549, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, аденокарциномы молочной железы MCF7 и эмбриональной почки HEK293 частичный дефицит АСС и ОКТ (и ОКТ-дефицитные кератиноциты HaCaT, рак шейки матки HeLa, карциномы яичников SKOV3, рак поджелудочной железы MIAPaCa-2 и меланомы MeWo, WM115, WM451) несмотря на неспособность на синтез *de novo* внутриклеточного аргинина и на различия в проявлении активности двух изоформ аргиназы, нет очевидной корреляции между ними и чувствительностью опухолевых клеток к депривации аргинина *in vitro* (Y.P. Vobak et al., 2010). Сравнительный анализ экспрессии АСС, ОКТ, А1 и А2 в эпителиальных клетках при культивировании в аргинин-содержащей и аргинин-дефицитной среде показал, что дефицит аргинина может вызвать значительное повышение экспрессии АСС (но не ОКТ, А1 и А2) в исследуемых эпителиальных клеточных линиях.

Ингибирование аргиназы может подавлять цикл мочевины в печени, вызывая гипераммонемия, и поэтому предлагаются иные подходы для подавления индукции iNOS и аргиназы в МСК, промотирующих рост опухоли. Так, нитроаспирин (NCX 4016), высвобождая NO, ингибирует iNOS по принципу обратной связи и опосредованно подавляет аргиназу, воздействуя на индуцирующие ее пути, корректируя таким образом МСК-опосредуемую иммунную дисфункцию Т-клеток, и вызывая регрессию карциномы толстой кишки мышей (C. DeSanto et al., 2005). Следует отметить, что эндогенно продуцируемый NO оказывает плеiotропное влияние и поэтому способен альтернативно воздействовать на пролиферацию клеток, апоптоз, миграцию, инвазию, ангиогенез и многие другие важные процессы в биологии рака, оказывая анти-, и проканцерогенное действие (A.J. Burke et al., 2013). NO может вовлекаться в специфические механизмы развития опухолевого процесса, способствуя канцерогенезу (K. Koslovska et al., 2002).

Скорость клеточного синтеза NO играет важную роль в проявлении его цитотоксических или цитопротекторных эффектов в анатомических участках его продукции, и для понимания роли NO в биологии опухолевых процессов необходимо определение и изучение клеточных процессов, регулирующих скорость синтеза iNOS/NO. Некоторые из линий опухолевых клеток человека, экспрессируя iNOS сами могут производить NO, благодаря чему стимулируют ангиогенез, обеспечивая собственный рост и размножение (L. Morbidelli et al., 2004). Богатый антиоксидантами экстракт листьев *Morus alba* вызывает подавление активности iNOS со снижением содержания NO и одновременной индукцией апоптоза линий раковых клеток, рака груди (MCF-7) и толстой кишки (HCT-15) человека (M. Deera et al., 2013). Показано, что ACC и GTP-циклогидролаза-I, которые катализируют лимитирующие стадии синтеза субстрата iNOS (аргинина) и его кофактора (тетрагидробиоптерина), коиндуцируются одновременно с экспрессией iNOS в клеточных линиях опухолей человека (A.K. Nussler et al., 1996). Коиндукция этих метаболических путей способствует поддержанию максимального синтеза iNOS/NO в опухолевых клетках человека, и могут служить мишенью для фармакологической интервенции в продукцию NO опухолевыми клетками человека. Взаиморегуляция вышеуказанных процессов проявляется *in vitro* и *in vivo* на уровне обратимого инактивирования ACC в результате S-нитрозилирования фермента (G. Nao et al., 2004).

NO-донор, (3,3-бис(нитроксиметил)оксетан, в комбинации с цитостатиками (циклофосфан, цисплатин, доксорубицин) повышает их химиотерапевтическую эффективность в отношении экспериментальных опухолей, перевиваемых мыши, лейкемии P388 и L1210, меланомы B16 и LL карциномы, повышает антиметастатический индекс, задерживает развитие лекарственной резистентности, благодаря чему увеличивается средняя продолжительность жизни, а в ряде случаев достигается 100% излечение животных (Н.П. Коновалова и др., 2003). В то же время в плазме крови пациентов с раком молочной железы до лечения показано накопление стабильных продуктов окисления NO – повышение концентрации нитритов втрое, а нитратов вдвое, одновременно имеет место активация свободнорадикального окисления (возрастание уровня продуктов ПОЛ, в частности содержание наиболее токсичных оснований Шиффа

превышало показатели контроля в 4,5 раза), а лечение в комплексе с озонотерапией приводит к нормализации конечных продуктов метаболизма NO и CPO (И.Е. Окрут и др., 2011). Пероксинитрит (ПН), который образуется при взаимодействии NO с супероксид-анионом, окисляет белки и липиды клеточных мембран, ингибирует рибонуклеотидредуктазу, ингибирующую репликацию ДНК, в присутствии ПН и/или продуктов его распада образуются тиольные радикалы глутатиона, в результате чего последний из антиоксиданта превращается в прооксидант и инициирует ПОЛ (О.С. Янченко, 2006). Нитриты могут оказывать токсическое действие на организм - в высоких концентрациях они реагируют с гемоглобином крови, образуя метгемоглобин, который не может выполнять функции переносчика кислорода, что приводит к гипоксии тканей (З.А. Лупинская, 2003). Кроме того нитриты участвуют в образовании нитрозаминов, которые оказывают проканцерогенное действие.

Механизмы антипролиферативного действия NO многогранны: инактивация железосерных ферментов, отвечающих за синтез АТФ и репликацию ДНК, прямое повреждение ДНК пероксинитритом и высвобождаемым свободным железом (окисление ДНК), а также, через регуляцию наработки определенных цитокинов, в частности IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, продуктов циклооксигеназного окисления, ингибирование синтеза которых хорошо коррелирует с увеличением уровня продукции NO и внутриклеточного cGMP (С.А. Куценко, 2003). Изучение динамических аспектов роста АКЭ показало, что скорость свободного роста опухолевых клеток в асците брюшной полости значительно выше у iNOS(- / -) –дефицитных мышей, чем у мышей дикого типа, тогда как солидная опухоль (перевиваемая подкожно) быстро прогрессирует у последних, но не растет у iNOS – дефицитных мышей, то есть iNOS/NO преимущественно подавляет рост леток АКЭ в свободной форме, однако усиливает рост солидной АКЭ (M. Nishikawa et al., 2004). Парадоксальный факт был получен при трансфекции ДНК iNOS макрофагов мыши в клетки субклональной линии аденокарциномы прямой кишки человека DLD-1 (полученной при перевивке голым мышам, у которых они развиваются в подкожную опухоль) - их рост *in vitro* замедлялся, по сравнению с клетками дикого типа, но, когда эти же клетки вводили мышам, они росли в 2 раза быстрее и были более васкуляризованы и



инвазивны, чем при трансплантации клеток дикого типа (D.C. Jenkins et al., 1995). Предполагается, что наномолярные цитотоксические концентрации NO оказывают противоопухолевое действие, тогда как более низкие (20 пмоль/мин/мг белка) промотируют опухолевый рост, активируя в частности сигнальный каскад неоваскуляризации.

## **1.2. Креатин-креатинфосфат-креатинкиназная система: функции и малигнизация тканей**

Значительные количества аргинина, синтезируемого у взрослого человека (в норме около двух граммов в день), расходуется на синтез креатина ( $\alpha$ -N-метилгуанидиноуксусная кислота), а взрослый организм в результате спонтанного расщепления без участия ферментов ежедневно теряет 1-2 г креатина, на синтез которого требуется 1.75-3.5 г аргинина (M.M.Jr. Sidney, 2004). Для восполнения клеточного фонда креатина, необходимо его дополнительное поступление из экзогенных источников или аргинина. Синтез креатина осуществляется из глицина и аргинина, и пул креатина и КФ является одной из составляющих процессов клеточного энергоснабжения и играет особую роль для органов и тканей с высоким потреблением энергии, и прежде всего мозга, который, составляя около 2% от веса тела, потребляет до 20% всей энергии (E.Beard, O.Braissant, 2010).

Креатин и креатинфосфат (КФ) относятся к наиболее распространенным клеточным метаболитам млекопитающих и человека, их эргогенное действие благоприятно влияет на многие процессы, в том числе обучения, памяти, протекание беременности и т. д., улучшая качество жизни (J.T. Brosnan, M.E. Brosnan, 2007). Креатин и КФ оказывают плейотропные физиологические и фармакологические эффекты *in vitro* и *in vivo*, которые подробно освещены в последних обзорах (T. Wallimann et al. 2011). Недавно выяснилось, что креатин и КФ, а также их циклические аналоги, которые успешно используются в пищевых добавках, взаимодействуя с фосфолипидами клеточных мембран, протектируют мембранную проницаемость и препятствуют лизису клеток (M.Tokarska-Schlattner et al. 2012).

Креатин является субстратом креатинкиназной ферментативной системы,

ответственной в клетке за депонирование и транспорт энергии в виде КФ от источников ее образования к местам использования. Креатинкиназа (КК) обеспечивает потребность в большом количестве энергии в короткие интервалы времени, например, при работе мышц. В детском возрасте в связи с интенсивным ростом активность КК выше, чем у взрослых, причем у мужчин активность КК превосходит таковую у женщин. В регуляции энергообмена решающую роль играют регуляторные возможности ферментов и участие в ней структурных компонентов клетки. КК в тканях в основном представлена двумя изоферментами: цитоплазматическим (цКК) и митохондриальным (мКК), активность которого во многом зависит от взаимодействия с митохондриальной мембраной: мКК катализирует обратимый перенос фосфорильного остатка с АТФ на креатин с образованием макроэргического соединения КФ, который транспортируется в цитоплазму, и цКК использует его для синтеза АТФ из АДФ в участках, где необходима энергия (Y. Takagi et al., 2001).

Молекула КК состоит из двух различных субъединиц: В (от "brain"- мозговая) и М (от "muscle" - мышечная). Активной формой КК является димер, в тканях она представлена следующими цитоплазматическими изоформами: изоформа ВВ, характерная для мозга, желудка, кишечника, мочевого пузыря и легких, а в небольших количествах она встречается в любых клетках организма (она отражает патологию клеток головного мозга и онкологические сдвиги в ЖКТ); изоформа МВ содержится преимущественно в миокарде и изоформа ММ - в скелетных мышцах. К митохондриальные изоформы КК представлены саркомерной и не саркомерной, или универсальной КК, активность которых проявляется повсеместно и во многом зависит от взаимодействия с митохондриальной мембраной (M. Tachikawa et al., 2004). В отличие от цитоплазматических изоформ, представленных только димерной формой, мКК известна в виде двух взаимопревращаемых, существующих в состоянии динамического равновесия олигомерных форм – димера и октамера (68 и 32 % соответственно) (T. Schnyder et al., 1994). Активирование свободнорадикального окисления (СРО) при ишемии головного мозга изменяет соотношение димер/октамер: кратковременная (30 мин) ишемия смещает соотношение в сторону образования димера, тогда как долговременная (18 ч) приводит к

росту доли октамера (Е.И. Ерлыкина, Т.Ф. Сергеева, 2010). Именно мКК взаимодействует с фосфолипидами клеточных мембран, причем ее октамер способствует образованию и укреплению контактных сайтов внутренней и внешней мембран, укрепляя их структуру и повышая резистентность, тем самым обеспечивая эффективность энергообразования в митохондриях (O. Speer et al., 2005). Уровень КК может быть повышен при злокачественных опухолях (рак мочевого пузыря, молочной железы, кишечника, легкого, матки, простаты, печени), и при повреждении клеток происходит высвобождение КК и поступление ее в кровь. (H. Lenz et al., 2007).

Специфический транспортер креатина, SLC6A8 синтезируется эндотелием микрокапилляров ГЭБ, но отсутствует в астроцитах и их отростках, выстилающих эндотелий, что затрудняет транспорт в клетки ЦНС периферического креатина, синтезируемого в печени и почках (M. Tachikawa et al., 2004). Оба фермента биосинтеза креатина: L-аргинин:глицин амидинотрансфераза и гуанидиноацетатметилтрансфераза, экспрессируются в ЦНС (их наличие подтверждено у человека и мыши), которые, по-видимому, в основном пополняют пул креатина в мозге (O. Braissant et al., 2010). Благоприятное терапевтическое воздействие креатина продемонстрировано при нейродегенеративных болезнях с характерной биоэнергетической недостаточностью таких, как болезни Гантингтона и Паркинсона (B. Gualano et al. 2010). Креатин в ЦНС функционирует как нейромодулятор/нейротрансмиттер (R.H. Andres et al., 2008). При синдроме дефицита креатина почти полное отсутствие его в мозге сопровождается развитием ряда неврологических симптомов таких как задержка умственного развития, замедленное овладение речью и эпилепсия (S. Stockler et al., 2007). При нокаутировании одной из изоформ КК нарушается поведенческая активность, связанная с изменениями нейрональных процессов в гиппокампе, у дважды нокаутированных по КК животных уменьшаются размеры гиппокампа, снижается вес тела, пространственная память и привитые навыки (C.R. Jost et al., 2002; F. Streijger et al., 2005). Креатин участвует в регуляции аппетита и веса, влияя на специфические ядра гипоталамуса (R.A. Galbraith et al., 2006). Вдобавок он является одним из основных осмолитов в ЦНС, о чем свидетельствует повышение захвата креатина астроцитами при гиперосмотическом шоке

(R.R. Alfieri et al., 2006). В ЦНС мышей и крыс *in vivo* креатин поглощается из крови против градиента концентрации (S. Ohtsuki et al., 2004).

В раковых клетках человека HeLa обнаружен высокий уровень экспрессии цКК и низкий КК, обратная картина в нормальных клетках (кератиноцитах) (H. Lenz et al., 2007). Авторы, используя селективное подавление экспрессирования цКК мозгового типа и универсальной мКК выяснили, что последняя играет решающую роль в поддержании жизнеспособности и пролиферативной активности как раковых, так и нормальных клеток, поскольку стабилизирует контактные участки между внутренней и внешней мембранами митохондрий и поддерживает локальные метаболитные каналы, предотвращая открытие митохондриальной поры, активирование каспаз и гибель клетки, - подавление мКК вызывает в обоих типах клеток возрастание апоптотической гибели, что подтверждается электронно-микроскопическими данными, о существенных изменениях морфологии митохондрий, а также топологии их мембран. Активирование мКК в опухолевых тканях при раке груди, ассоциируется с плохим прогнозом, поскольку фермент стабилизирует мембраны опухолевых клеток, подавляет активность каспазы 9 и цитохрома с, предотвращая апоптотические процессы и способствуя опухолевому росту (X.L. Qian et al., 2012). При малигнизации может происходить и сильное подавление креатин/КК системы, как это показано в опухолевых клетках при АКЭ, саркоме и саркоме 180, при том, что в них обнаружена повышенная экспрессия и активность ферментов синтеза креатина, активность которых практически не меняется в печени и почках больных животных (S. Vega et al., 2008). Авторы отмечают возрастание экспрессии и активности А2 и ассоциированное повышение образование орнитина при саркоме, и более высокие уровни гуанидиноацетата и креатинина. Несмотря на изначально низкий уровень креатина в клетках АКЭ и саркомы 180, они могут поглощать и высвобождать значительные количества креатина, что подтверждается повышенным уровнем мРНК транспортера креатина, причем креатин мобилизуется из тканей хозяина в клетки АКЭ против более высокого градиента концентрации, а подавление мобилизации креатина из тканей хозяина в опухолевую ткань аналогом креатина бета-гуанидинопропионовой кислотой (пищевая добавка) снижает рост АКЭ и продлевает жизнь мышей-опухоленосителей (Y. Ohira,

1991). Показано, что снижение содержания креатина в плазме крови подавляет опухолевый рост и снижает почти вдвое объем асцитной жидкости. Одновременно во всех исследуемых типах опухоли высок уровень транскриптов A2 и орнитин декарбоксилазы. Тем не менее, низкая активность КК в этих злокачественных клетках не достаточна для поддержания пула креатина/КФ, и активирование в них биосинтеза креатина, по всей видимости, необходимо для метаболизма в направлении синтеза полиаминов в пролиферирующих раковых клетках. Интересно, что TNF- $\alpha$  индуцированный апоптоз ингибируется в печени, экспрессирующих КК трансгенных мышей, получавших креатин с пищей (E. Natano et al., 2004).

В то же время есть работы, свидетельствующие об антиканцерогенном влиянии креатина. Противоопухолевое действие метилглиоксаля значительно увеличивается в присутствии креатина, а в комплексе с аскорбиновой кислотой они полностью нивелируют опухолевый рост, причем пониженный уровень креатина и КК в опухоли возрастает коррелируя с ее регрессией (S. Patra et al., 2012). Эксперименты с нитрозоглутатионом показали, что система NOS/NO (включая NO<sup>+</sup>, NO и NO<sup>-</sup>) инактивирует *in vitro* креатинкиназу через нитрозилирование ее сульфгидрильных групп (H. Wolosker et al., 1996). NO ингибирует цитозольную креатинкиназу в мозжечке крыс (D. Delwing et al., 2007).

### **1.3. Микробы в онкотерапии: иммунобиохимические механизмы влияния**

Почти половина больных раком не поддается терапии общепринятыми методами, и это диктует необходимость альтернативных подходов в онкотерапии. Согласно современным представлениям, иммунодефицитное состояние может сопутствовать целому ряду заболеваний, незаразной природы, онкологических том числе. Снижение противоопухолевого иммунитета приводит к ускользанию опухоли от иммунологического надзора и создает благоприятные условия для малигнизации тканей, что является одной из проблем современной онкоиммунологии. Высокий процент развития новообразований (лимфом, лейкоз, раков кожи и губ и др.) отмечается у больных с иммунодефицитом; выявляется тесная связь между действием факторов, подавляющих иммунитет (тимэктомия, облучение, интоксикация), и увеличением скорости опухолевого роста и

метастазирования у экспериментальных животных (С.А. Куценко, 2003). В этом случае применение иммуностимулирующей терапии в целях повышения естественной резистентности организма в комплексном лечении будет способствовать повышению его эффективности (Д.К. Новиков, 2003). Особенный интерес представляют неспецифические иммуностимуляторы микробиального и грибкового происхождения: Элементы, составляющие микробную клетку (липополисахариды, пептидогликаны, мурамилдипептид, теиховые кислоты и др.) обладают значительным воздействием на факторы неспецифической резистентности, активируя клеточный и гуморальный иммунитет (Т- и В лимфоциты, фагоцитоз, синтез интерферона и т. д.) (Н.В.Медуницын, 2004). Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности адсорбируются на клеточных мембранах, ассоциируются с белками макроорганизма и изменяют их антигенные свойства. Структурная модификация клеток сопровождается высвобождением скрытых, “забарьерных” антигенов, не контактировавших ранее с иммунокомпетентными клетками, которые реагируют на конформационные изменения аутологичных структур (И.Д. Понякина, К.А. Лебедев, 2003). Согласно современным представлениям, ЛПС кишечной микробиоты участвует в регуляции иммунного гомеостаза, его избыток приводит к эндотоксиновой агрессии, которая является одним из звеньев патогенеза заболеваний человека, а его недостаточность ассоциируется с развитием иммунодефицитных состояний (М.Ю.Яковлев, 2003). Не только ЛПС, но и другие бактериальные патогены и токсины выступают в роли триггера клеток иммунного реагирования, активирование которых в первой фазе иммунной реакции запускает продукцию провоспалительных цитокинов, участвующих в механизмах воспалительного ответа - в следующей фазе выброс противовоспалительных медиаторов направлен на ограничение воспаления.

Биотерапия – новый метод, который предлагает использование в онкологической практике целого ряда модификаторов биологических реакций, таких как факторы роста, антитела, цитокины, вирусы и бактерии (Р.И. Якубовская, 2002). Основы иммунотерапии рака с использованием микробов были заложены более ста лет назад, когда независимо друг от друга немецкими врачами, W. Busch, F. и Fehleisen, и американцем W. Coley были осуществлены первые наблюдения о регрессии опухолей у раковых больных, у которых

одновременно диагностировалось рожистое воспаление, вызванное инфекцией *Streptococcus pyogenes* (W. Busch, 1867; W.B. Coley, 1893, цитировано по C.S.A. Hoption et al., 2003). Позднее У. Коли разработал эффективную вакцину, состоящую из убитых *S. pyogenes* и *Serratia marcescens*, которая широко использовалась для успешного лечения саркомы, карциномы, лимфомы, меланомы и миеломы, при этом во многих случаях наблюдалась полная, длительная регрессия запущенного рака (C.S.A. Hoption et al., 2003). В тридцатых годах прошлого века известной энигмой биологии рака был «геморрагический некроз» опухоли, вызываемый эндотоксином и грам-отрицательными бактериями, у которых он входит в состав клеточной стенки, позже было показано, что при обработке мышей эндотоксином и/или грам-отрицательными бактериями, включая *E. coli* и др., происходит выброс фактора некроза опухоли активированными макрофагами, который вызывает селективный лизис опухолевых клеток (Е.А. Carswell et al., 1975; N. Fiore et al., 1975). Авторами было продемонстрировано, что живые бактерии эффективнее подавляют канцерогенез, чем ослабленные или убитые, и существуют различия во влиянии эндотоксина из разных микробов. В настоящее время BCG используется в целях основной терапии уротелиальной карциномы *in situ* мочевого пузыря, вытеснив цистэктомию, как метод выбора, поскольку повышает выживаемость пациентов до 63% в течение 15 лет, и является единственным средством, одобренным в США FDA агентством по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (Food and Drug Administration, USA) (N. Ikeda et al., 2005; G.D. Steinberg, B.F. Schwartz, 2012).

Существуют различия в действии эндотоксинов различного происхождения. ЛПС из *Actinobacillus actinomycetemcomitans* штамма Y4, индуцирующего *in vitro* резорбцию костей черепа мышей, менее эффективно стимулирует аргиназную активность в RAW264.7 клетках, чем *E. coli* (W. Sosroseno et al., 2006). Недавно выяснилось, что при асцитной карциноме Эрлиха обработка мышей-опухоленосителей фаго-, и термолизатами *E. coli* в сочетании с химиотерапией (комбинированный препарат доксорубицина, циклофосфида и фторурацила) позволяет добиться 80-90% регрессии опухоли, а у 13% животных – полного выздоровления (на 65-69 день лечения) (К. Gambashidze et al., 2012). Включение *E. coli* в комбинированную терапию наряду с известными антиканцерогенами

достоверно продлевало срок выживания животных, способствовало повышению антиканцерогенного действия лекарственных препаратов при отсутствии побочных эффектов - все вышеперечисленное свидетельствует в пользу использования бактерии в дополнение к основному лечению злокачественных опухолей.

Бактерии могут подавлять канцерогенез, индуцируя специфический и неспецифический противоопухолевый иммунный ответ, выделяя токсины, некоторые виды бактерий преференциально реплицируются и накапливаются в опухоли, к тому же они обладают такими преимуществами, как подвижность, способность одновременно экспрессировать и транспортировать многие белки в терапевтических целях, и наконец возможность уничтожения бактерий антибиотиками, вкуче открывают перспективы использования бактерий в лечении рака (S. Patyar et al., 2010).

Экспонирование макрофагов к разным субстимуляторным концентрациям бактериальных ЛПС меняет то есть репрограммирует нативный паттерн продуцируемых цитокинов на про- или противовоспалительный фенотипы цитокинового ответа, который выявляется при последующей стимуляции этих макрофагов микробными продуктами, ЛПС в том числе (X. Zhang, D.C. Morrison, 1993). Формирование провоспалительного фенотипа вызывает 6-часовая обработка первичной культуры макрофагов 0,5 нг/мл ЛПС, повышение дозы последнего на порядок способствует развитию противовоспалительного фенотипа, для которого как и в нативных макрофагах, характерно проявление антиапоптотической роли внутриклеточного NO, в отличие от первого фенотипа, (Е.В. Малышева и др., 2007). ЛПС вызывает апоптоз в провоспалительном фенотипе (И.Ю. Малышев и др., 2004). На мышинной модели B16-F10-индуцированного метастазирующего рака легких выявлено, что низкие дозы ЛПС (0.1 мкг/мышь) стимулируют опухолевый рост, который опосредуется притоком МСК, плазмоцитоидных дендритных клеток, CD8(+) регуляторных Т-клеток; и наоборот, высокие дозы ЛПС (10 мкг/мышь) снижают опухолевый рост, что сопровождается повышенным притоком CD4(+) регуляторных Т-клеток и Th1и Th17 поляризации (A. Rega et al., 2013). Показано IFN- $\gamma$ -индуцированное повышение ЛПС-ответа, так называемого прайминга в моноцитах человека, проявляющегося манифестацией уровня TNF- $\alpha$ , причем мРНК последнего в



праймированных моноцитах много более стабильна, чем в непраймированных (6-8-кратное увеличение периода полужизни) (M.P. Hayes, 1995).

Двунаправленное взаимодействие мозг - желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) хорошо известный механизм регуляции функции кишечника у здоровых индивидов и при болезнях. Роль кишечной микробиоты и патогенных микроорганизмов- в этих взаимодействиях стали известны только в последние несколько лет. Мозг может влиять на комменсалы (кишечная микробиота) косвенно, через изменения в сокращениях, секреции и проницаемости ЖКТ, или напрямую, через сигнальные молекулы высвобождаемые в просвет кишечника из клеток lamina propria, или собственной пластинки (энтерохромаффинные клетки, нейроны, клетки иммунной системы). Взаимодействие кишечных микроорганизмов с хозяином может осуществляться через рецептор-опосредованную сигнализацию эпителиальных клеток, а при повышении кишечной проницаемости путем прямого воздействия на клетки lamina propria. Энтерохромаффинные клетки регулируют связь между ЖКТ и нервной системы. Блуждающий нерв, афферентная иннервация энтерохромаффинных клеток обеспечивает прямой путь для энтерохромаффинно-клеточной сигнализации нейрональных цепей, которые могут играть важную роль в боли и модуляции иммунных ответов, эмоций и других гомеостатических функций. Нарушение двунаправленного взаимодействия между кишечной микробиотой и нервной системой могут быть вовлечены в патофизиологию острых и хронических желудочно-кишечных заболеваний, включая функциональные и воспалительные заболевания кишечника (S.H. Rhee et al., 2009).

Белок А золотистого стафилококка, предпочтительно связывается с иммуноглобулинами, особенно IgG (через эти взаимодействия в сыворотке крови бактерия препятствует опсонизации, фагоцитозу) и проявляет антиопухолевую активность при АКЭ, стимулируя выработку оксида азота перитонеальными макрофагами мышей, который вызывает цитотоксическое повреждение опухолевых клеток, при этом индуцируется апоптоз, экспрессия протоонкогенных белков, p53 и Bax, изменяется соотношение Bcl-2/Bax (S. Chattopadhyay et al., 2002). Авторы показали, что введение N<sup>G</sup>-мометил-L-аргинина, конкурентного неселективного природного ингибитора NO

синтазы предотвращает антиканцерогенную активность белка А, что свидетельствует о вовлечении в эти механизмы системы NOS/NO. После введения ЛПС ингибирование аминоксидинами ферментативной продукции NO *in vivo* снижает бактериальную транслокацию (D.L. Sorrells et al., 1996). Изучение NO синтаз из бактерий и растений затруднено, так как в них не удается обнаружить фермент гомологичный NO синтазе млекопитающих, однако к настоящему времени они идентифицированы у  $\approx 20$  видов бактерий, и, хотя у *E. coli* она не найдена, ее успешно использовали в целях экспрессии бактериальных NO-синтаз (С.Ю.Филиппович, 2010). Аргиназная активность в *E. coli* также не найдена (P. Das et al., 2010). У мышей, инфицированных не патогенным DH5 $\alpha$  штаммом *E. coli*, не индуцируется А2 изоформа, не обнаружено индукции аргиназы вирулентными штаммами *E. coli* (А.Р. Gobert et al., 2002). В то же время, антиопухолевая активность аспарагиназы, продуцируемой *E. coli* и *Helicobacter pylori*, используется в терапевтических целях, и недавно для этого осуществлена модификация аспарагиназы *E. coli* (замена некоторых аминокислот) (P. Das et al., 2010).

Множество вариантов использования бактерий в онкотерапии обобщены в последних трудах: они используются не только для получения противоопухолевых вакцин или токсинов, но и как векторы для генной терапии и для доставки разных противораковых агентов, цитотоксических пептидов, терапевтических белков или ферментов, конвертирующих пролекарства (К. Alibek et al., 2012). Одновременно продолжается поиск новых штаммов микроорганизмов с антиканцерогенным действием, при этом в целях минимизирования нежелательных побочных эффектов намечается переход от целого ряда патогенных микробов, используемых в онкотерапии (*Salmonella choleraesuis*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* и так далее), к авирулентным микробам и прежде всего представителям облигатной микробиоты, в их числе и кишечные палочки (D. Bermudes et al., 2002).

## ГЛАВА ВТОРАЯ

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали L-аргинин·HCl, L-валин, дитиотреитол, фикоколл-400, верографин, трипановый синий, HEPES, EDTA, реактивы производства (“Sigma-Aldrich” Co. LLC), а также N<sup>G</sup>-монометил-L-аргинин (Calbiochem, La Jolla, CA), декстран (70000) (“Pharmacocosmos”, Дания), ДМЕМ (жидкая среда с Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, без глутамин) (“Serva”, Германия) и прочие реактивы производства “Reanal” (Венгрия) и “Реахим” (Россия).

Опыты осуществляли с соблюдением правил содержания и обращения с животными, изложенных в Директивах Европейского Сообщества (86/609/EC) 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: I контрольная - здоровые мыши; II - мыши, соответствующие по возрасту и полу контрольным животным, с трансплантированной асцитной карциномой Эрлиха (АКЭ), III - мыши с АКЭ, инфицированные непатогенным штаммом *E. coli* N177, полученном из фекальной микробиоты здорового человека (выделение и идентификация штамма осуществлялась в клиническом центре “Арменикум” и НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Алексаняна МЗ РА согласно методическим указаниям по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями) (см. Приложение, с. 129-130). Через 2 дня после перевивки клеток АКЭ, животных разделяли на две опытные группы, и в одной из них в асептических условиях (в боксе) осуществляли одноразовую обработку поверхности глаз и полости рта стерильным ватным шпателем, который пропитывали взвесью живых (неослабленных) клеток *E. coli* (1 x 10<sup>9</sup> клеток /мл) (микробиологами предоставлялась суточная культура исследуемого штамма кишечной палочки, необходимые концентрации которой получали с помощью эталонного

бактериального стандарта мутности). Параллельная опытная группа мышей с АКЭ служила “контролем” для оценки влияния бактерий. Через 11 дней после трансплантации АКЭ, всех опытных животных декапитировали.

**Формирование асцитной карциномы Эрлих у мышей** осуществляли перевиванием клеток АКЭ, отбираемых у мышей-опухоленосителей, у которых культура клеток АКЭ поддерживалась в асците брюшной полости (Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА). Трансплантацию клеток АКЭ осуществляли введением в брюшную полость мышей асцитной жидкости в объеме 0,2 мл ( $1,5 \times 10^7$  кл/мл).

**Влияние *E. coli*** оценивали по изменению объема асцитной жидкости и массы тела животных, а также среднему времени выживаемости (СВВ) и проценту продления СВВ (ПСВВ), которые контролировали в каждой опытной группе путем ежедневной регистрации смертности и рассчитывали согласно уравнениям (У.К. 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, извлекали головной мозг, осуществляли забор крови и асцитной жидкости из брюшной полости мышей-опухоленосителей по методической разработке Красноярского гос. ун-та (Е.В. Инжеваткин, 2004). Контрольных мышей после декапитации фиксировали на пенопластовом столике, в брюшную полость шприцем вводили порциями по 3-5 мл 20 мМ HEPES буфера pH 7,4, и с помощью шприца собирали суспензию клеток, которую центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM (жидкая среда (1x) с  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , без глутамина) и культивировали в термостате при 37°C в течение 24 ч, после чего иммунные клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин и дважды промывали 20 мМ HEPES буфером pH 7,4. Из брюшной полости опытных групп мышей с АКЭ шприцем вытягивали асцитную жидкость, из которой клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин и промывали 20 мМ HEPES буфером pH 7,4. Из суспензии клеток, полученных из брюшной полости

контрольных и опытных животных выделяли лейкоциты.

**Выделение плазмы крови.** Кровь стабилизировали антикоагулянтом, 5% цитратом натрия (в соотношении 5:1 по объему) и для седиментации эритроцитов смешивали с 6% декстраном (мол. вес=70000), приготовленном на 0,9 % NaCl, в соотношении 1:2 (по объему), после чего инкубировали 1 ч при 37°C (при наклоне под углом 45 градусов) и верхний слой плазмы, содержащей лейкоциты и тромбоциты декантировали (Г.Фрик и др., 1979). Взвесь клеток центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин при 4° С с осаждением лейкоцитов и тромбоцитов - в супернатанте получали плазму.

**Выделение лейкоцитов брюшной полости и крови** осуществляли центрифугированием в двуступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина (1,129 и 1,087 г/см<sup>3</sup>) при 3000 об/мин 20 мин (Г.Фрик и др., 1979). Для получения градиентных растворов с необходимой плотностью смешивали 6,1% фиколл с 76% верографинном в определенном соотношении и с помощью ареометра доводили плотность верографина 6,1% фиколлолом 400 до необходимой величины. Суспензии клеток, полученных из брюшной полости и крови, перед нанесением на градиентный раствор разводили 20 мМ НЕРЕС буфере рН 7,4, в соотношении 1:1 (по объему). Мононуклеары (лимфоциты и моноциты/макрофаги) и гранулоциты (полиморфноядерные лейкоциты) получали после центрифугирования из верхнего из нижнего интерфазных колец, соответственно, дважды промывали и объединяли в единую фракцию для дальнейшего исследования. Лейкоциты идентифицировали в зафиксированных мазках, окрашенных по методике Романовского–Гимза (О.В. Путинцева и др., 2008). Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием раствором метиленового синего (0.2%), или трипанового синего (0.4%) в течение 10 мин. Среди 100 клеток под световым микроскопом (об. 50 х, ок. 10 х) подсчитывали долю мертвых клеток (R. Stolarek et al., 1998).

**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 на центрифуге К-24 (Германия) (здесь и далее для выделения клеточных компартментов использовалась вышеуказанная центрифуга) при 1200 об/мин 10 мин при 4°C и осаждали ядра, а надосадочную жидкость центрифугировали при 11000 об/мин 20 мин при 4°C - в осадке получали митохондриальную фракцию и в супернатанте – цитоплазматическую (Г.П. Дуже и др., 2003; Е.Е. McKee et al., 2006).

**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, содержащем 0,25 М сахарозу, рН 7,4. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин при 4°C с осаждением ядерной фракции, и из полученной надосадочной жидкости последующим центрифугированием при 15000 об/мин 20 мин при 4°C в осадке получали митохондриальную фракцию и в супернатанте - цитоплазматическую (J. Bustamante et al., 2007).

**Определение содержания стабильных метаболитов NO.** Пробы депротенизировали 0,5 N NaOH и 10% ZnSO<sub>4</sub> (в пропорции 1:1:1 по объему) и центрифугировали при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре на настольной микроцентрифуге фирмы Eppendorf (США). В супернатантах определяли уровень стабильных метаболитов NO, или так называемых активных форм азота (АФА): гидроксилламин, ион нитрозония, нитрозотиолы, которые наряду с NO синтезируются в небольших количествах в реакции NOS, и окислы азота, образующиеся в реакционной смеси при взаимодействии NO с кислородом воздуха (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (W.R. Tracey et al., 1989). Содержание АФА определяли реакцией диазотирования с использованием реактива Грисса-Илосвая (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 (Н.Н.Н.В. Schmidt, M. Kelm, 1996). Содержание АФА выражали в нмоль (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) · мг<sup>-1</sup> белка. Концентрацию нитритов

рассчитывали по калибровочной кривой для  $\text{NaNO}_2$  (2 - 200 нМ).

**Активность NOS** определяли по аккумуляции стабильных метаболитов NO после долговременной инкубации проб (22 ч, 37°C) в 20 мМ HEPES буфере pH 7,4, содержащем 2 мМ дитиотреитол, 3 мМ  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  при добавлении субстрата, 5,3 мМ L-аргинина и кофакторов NOS: 0,2 мМ NADPH, 20 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидрибиоптерина, 6 мкМ FAD, 5,5 мкМ FMN и 1,7 мМ  $\text{CaCl}_2$  (D.S. Bredt, S.H. Snyder, 1990; C. Gagnon et al., 1998). В контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 5 мМ  $\text{N}^G$ -мометил-L-аргинина, природного конкурентного неселективного ингибитора NOS. Активность NOS выражали в нмоль ( $\text{NO}_2^-$ )  $\cdot$  мг<sup>-1</sup> белка  $\cdot$  22 ч<sup>-1</sup>.

**Активность аргиназы** определяли методом Iyamu и др. (E.W. Iyamu et al., 2008), в собственной модификации по аргинин-зависимому образованию орнитина в реакционной смеси. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 0,05 М NaOH-глициновом буфере pH 9,5 и/или 20 мМ HEPES буфере pH 7,4 с добавлением 0,05 М  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  и 0,1 М L-аргинина. В контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 60 мМ L-валина, неконкурентного ингибитора аргиназы. Реакцию останавливали 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и центрифугировали при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре на настольной микроцентрифуге фирмы Eppendorf (США). Активность аргиназы выражали в мкмоль L-орнитина  $\cdot$  мг<sup>-1</sup> белка  $\cdot$  ч<sup>-1</sup>.

**Определение содержания L-орнитина.** 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 в них L-орнитина определяли спектрофотометрически при длине волны 505 нм (E.W. Iyamu et al., 2008). Концентрацию L-орнитина рассчитывали по калибровочной кривой (0.01 – 1 мкМ).

**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 мМ HEPES буфере pH 7,4, содержащий 5,5 мМ креатинфосфата и 0,06% АДФ. Реакцию останавливали осаждением белка в пробах введением 0,5 N NaOH и 10%  $\text{ZnSO}_4$  (в пропорции 1:1 по объему), с последующим центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре на настольной микроцентрифуге фирмы

Erpendorf (США), 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  $\text{мкмоль креатина} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка} \cdot \text{ч}^{-1}$ .

**Определение содержания креатина.** К супернатантам депротеинизированных проб добавляли 1%  $\alpha$ -нафтол (приготовленный в растворе 16%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 6%  $\text{NaOH}$ ) и 1% диацетил (в соотношении 1:1:0,2 по объему) и выдерживали 20 мин в темноте при комнатной температуре, после чего содержание креатина определяли спектрофотометрически при длине волны 536 нм (И.И. Иванов и др., 1974). Концентрацию креатина рассчитывали по калибровочной кривой для креатина (0.02 – 2  $\mu\text{M}$ ).

**Определение содержания L-аргинина** осуществляли модифицированным методом Akamatsu и Watanabe (S. Akamatsu, T.J. Watanabe, 1961). К супернатантам депротеинизированных проб добавляли смесь растворов: 0,02% 8-оксихинолина в 96%-ном этиловом спирте 2,5% сульфосалицилата натрия в 0,01 М глицине и 2,5%  $\text{NaOH}$  (1:1:1 по объему), после чего вводили 1% гипобромит натрия (в соотношении 3:1:0.2 по объему), тщательно перемешивали и спустя 15 мин содержание L-аргинина определяли спектрофотометрически при длине волны 525 нм. Концентрацию L-аргинина рассчитывали по калибровочной кривой для L-аргинин·HCl (0.02 – 2  $\mu\text{M}$ ).

**Определение содержания L-цитруллина** осуществляли модифицированным методом Moore и Kauffman (R.B. Moore, N.J. Kauffman, 1970). Супернатанты депротеинизированных проб (осаждение белков осуществляли 10% ТХУ в соотношении 1:2 по объему) смешивали с рабочим раствором (смесь растворов в пропорции 1:1 по объему: 9,6%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и реактива (5мМ диацетилмоноксим, 0,9 мМ тиосемикарбазид и 0,025 мМ  $\text{FeCl}_3$ , в пропорции 1:1:1 по объему) нагревали 10 мин в кипящей водяной бане, и после охлаждения содержание в них L-цитруллина определяли спектрофотометрически при длине волны 490 нм. Концентрацию L-цитруллина рассчитывали по калибровочной кривой для L-цитруллина (0.01 – 1  $\mu\text{M}$ ).

**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 методу Владимиров и Арчакова (Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, 1972). К супернатантам добавляли 0,72% ТБК и 0,6N HCl (в пропорции 1:0,8:0,2) и смесь инкубировали 15 мин в кипящей водяной бане. После охлаждения в пробах определяли содержание ТБК-активных продуктов по концентрации основного конечного продукта ПОЛ, малонового диальдегида (МДА). МДА определяли 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 pH 7,4, 0,8 мМ аскорбиновой кислоте и 1,2 мкМ соли Мора ( $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (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).

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

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

## ГЛАВА ТРЕТЬЯ

### СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на животной (мышь) модели злокачественного новообразования, асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ), которая широко применяется в экспериментальной онкологии. АКЭ относят к недифференцированным карциномам, она представляет собой гипердиплоидный вариант со стволовой линией 46 хромосом, не содержит опухоль-специфических антигенов трансплантации, легко прививается, не регрессирует, быстро пролиферируя, проявляет 100% злокачественность, проявляет сходство с опухолями человека, наиболее чувствительными к химиотерапии, которые также недифференцированы и быстро растут, поэтому модель успешно используется в экспериментах по исследованию противоопухолевой активности фармакологических препаратов и немедикаментозных методов лечения (М. Ozaslan et al., 2011). Изначально исходной опухолью послужила спонтанная карцинома молочной железы мышей, повторяющиеся пассажи которой постепенно увеличивали агрессивность опухоли и скорость ее пролиферации, и, как следствие, исчезновение дифференциации клеток и превращение опухоли в асцитную форму (Р. Ehrlich, Н. Apolant, 1905). При внутрибрюшинной перевивке образуется богатый взвешенными опухолевыми клетками асцит, который не подвергается спонтанному рассасыванию. На ранних стадиях накопление жидкой части асцитной опухоли обусловлено повышением осмотического давления вследствие накопления в брюшной полости низкомолекулярных метаболитов (лактата и пр.), на поздних - воспалительными изменениями брюшины и механическим блокированием лимфооттока размножающимися клетками. Латентный период после перевивки длится 4-6 дней, а средняя продолжительность жизни животных- 10-16 дней (Л.Ф. Ларионов, 1962).

Для культивирования клеток АКЭ предпочтительно использовать беспородных мышей, поскольку кинетика роста опухоли у мышей различных линий характеризуется своими особенностями (Е.В. Инжеваткин, 2004). Исходя из этого культивирование и эксперименты проводили на беспородных животных.

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

У мышей с АКЭ развивается диффузная солидная гепатоцеллюлярная карцинома с наличием метастатических очагов и развитием асцита в брюшной полости, а в мозговой ткани наблюдается очаговая пролиферация нейроцитов и мелкие очаги межуточного отека (А.А. Агабабова и др., 2013). У взрослых животных на 9 сутки с момента инокуляции клеток АКЭ наблюдается их максимальное количество, на 11 сутки развития АКЭ переход экспоненциальной фазы роста в константную (плато) стабилизируется, число клеток в асците практически постоянное и объем асцитной жидкости может достигать более 12 мл, далее в терминальной фазе нарастает процент аномальных митозов и дегенерирующих клеток (Е.В. Инжеваткин, 2004; М. Ozaslan et al., 2011). Подобное развитие АКЭ наблюдается у двухмесячных беспородных белых мышей-самцов, однако терминальная стадия и гибель чаще наступает раньше, на 11-12 день после перевивки опухоли.

На вторые сутки после трансплантации АКЭ, мышей разделяли на две группы: в одной из них поверхность глаз и полости рта животных подвергали одноразовой обработке суспензией клеток непатогенного штамма *E. coli N177*, другую группу мышей с АКЭ не инфицировали. Использование живых бактерий обусловлено тем, что они эффективнее подавляют канцерогенез, чем ослабленные или убитые, и их введение мышам, как и ЛПС, вызывает выброс активированными макрофагами мышей-опухоленосителей TNF- $\alpha$ , который подавляет рост опухолевых клеток и способствует их селективному лизису (Е.А. Carswell et al., 1975; N. Fiore et al., 1975). На мышинной модели В16-F10-индуцированного метастазирующего рака легких показано, что низкие дозы ЛПС стимулируют опухолевый рост, а высокие (10 мкг/мышь) снижают его, вызывая повышенный приток CD4(+) регуляторных Т-клеток и высвобождение TNF- $\alpha$  (А. Rega et al., 2013).

Животных обрабатывали высокой концентрацией микробной взвеси кишечной палочки, после чего большие количества ее обнаруживаются в асцитной жидкости, как в среде наиболее благоприятной для ее роста, хотя ее наличие выявляется в печени, крови и мозге, при этом наблюдается деградация опухолевых клеток, а также снижение процессов

дифференциации клеток (А.А. Агабабова и др., 2013). Известно, что *E. coli* в условиях *in vivo* инициирует воспалительную реакцию, стимулирует фагоцитоз и ферментативное переваривание клеток АКЭ, которые могут также деградировать из-за нарушения баланса электролитов или осмотического давления, токсического воздействия тканевой деструкции), а изменения в асцитной жидкости в свою очередь приводят к агглютинации или преципитации опухолевых клеток (Е.А. Carswell et al., 1975).

Как видно из таблицы 1, одноразовая неинвазивная обработка живыми клетками непатогенного штамма кишечной палочки продлевает среднее время выживаемости (СВВ) приблизительно на 75% (см. *Материалы и Методы*). Для мышей с АКЭ, не обработанных *E. coli*, последний случай смерти зафиксирован на 13-й день после трансплантации опухоли, тогда как для животных, подвергнутых бактериальной обработке, - на 22-й день. В целях сокращения числа погибших мышей, на 11-й день после трансплантации АКЭ всех исследуемых животных одновременно декапитировали.

**Таблица 1.** Влияние *E. coli* на мышей-опухоленосителей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ)

Группы Параметры	Вес тела (г)	Среднее время выживания (СВВ) (дни)	Объем асцита (мл)	Продление СВВ (%)
Контроль	20.25 ± 0.08	□	□	□
АКЭ	28.14 ± 0.46**	8.83 ± 0.34	9.61 ± 0.78	□
АКЭ/ <i>E. coli</i> -обработка	21.45 ± 0.42**	15.67 ± 0.88***	3.22 ± 0.29***	75.34

Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Здесь и далее достоверность ( $p$ ) различий результатов, оцениваемых при АКЭ, определялась по сравнению с контрольными значениями, а результатов, полученных после введения *E. coli*, по сравнению с таковыми для неинфицированных мышей-опухоленосителей.

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

Введение *E. coli* вызывает на 11-й день трансплантации АКЭ снижение примерно втрое объема асцитной жидкости и соответственно веса мышей (табл.1). Полученные результаты согласуются с данными других авторов (К. Gambashidze et al., 2012), которые показали, что обработка мышей с АКЭ фаго-, и термолизатами *E. coli* в сочетании с

химиотерапией (комбинированный препарат доксорубицина, циклофосфида и фторурацила) приводит к 80-90% регрессии опухоли, а у 13% животных – полному ее исчезновению. Авторы не выявили побочных эффектов после введения кишечной палочки, что свидетельствует в пользу ее использования в дополнение к основному лечению злокачественных опухолей.

Выделение мононуклеаров (моноциты/макрофаги и лимфоциты) и гранулоцитов из брюшной полости (асцитной жидкости при АКЭ) и крови осуществляли центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-верографина (1,129 и 1,087 г/см<sup>3</sup>, соответственно). Опухолевые клетки в асците проявляются на границе плотности 1,07 г/см<sup>3</sup> (Ю.В. Шаталин и др., 2010). Появление опухолевых клеток в организме включает механизмы иммунного ответа, при этом в опухолевой ткани, крови и лимфоидных органах аккумулируются активированные полиморфноядерные лейкоциты (гранулоциты), моноциты/макрофаги, дендритные клетки, которые выполняют антигенпрезентирующую функцию, промотируют пролиферацию и дифференцировку антигенспецифических Т-лимфоцитов, иницируя и стимулируя иммунный ответ а также миелоидные супрессорные клетки (МСК), состоящие из миелоидных предшественников незрелых иммунных клеток (С.М. Diaz-Montero et al., 2009). Незрелые гранулоциты, составляют большую долю МСК, число которых при малигнизации возрастает более чем на порядок, и они могут выявляться как на границе плотности 1,129 так и 1,087 г/см<sup>3</sup> (P. Raber et al., 2012). Большая доля гранулоцитов крови раковых больных, а также N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин-активированных гранулоцитов здорового человека выделяются в градиенте плотности вместе с фракцией мононуклеаров, в отличие от контрольных гранулоцитов, оседающих на дно (J. Schmielau, O.J. Finn, 2001). Исходя из вышесказанного, в экспериментах исследовалась вся совокупность иммунных клеток, выделенных на границе плотности 1,129 и 1,087 г/см<sup>3</sup>, представленных как зрелыми, так и незрелыми гранулоцитами, моноцитами/макрофагами и лимфоцитами.

Опухолевая агрессия вызывает увеличение интенсивности процессов свободнорадикального окисления (СРО) и подавление антиоксидантной системы (АОС) организма, сопровождающиеся развитием иммунодефицитного состояния (В.В. Лебедев,

2004). Одним из важнейших факторов, способствующих супрессорной активности МСК является повышенная продукция ими активных форм кислорода (АФК), которая наблюдается как в экспериментальных опухолях мышей, так и у онкобольных (А. Szuster-Ciesielska et al., 2004; G. Waris, H. Ahsan, 2006). Свободнорадикальная атака полиненасыщенных жирных кислот инициирует в биологических системах процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Первичные продукты ПОЛ, гидропероксиды изменяют текучесть клеточных мембран, нарушают нормальное функционирование мембранных белков, влияя на клеточную проницаемость; к вторичным продуктам ПОЛ относят альдегиды (малоновый диальдегид (МДА) составляет их основную долю), которые в отличие от образующихся в процессах СРО свободных радикалов, имеют достаточно продолжительное время жизни (от нескольких минут до нескольких часов), чтобы диффундировать внутри клетки и в близлежащие клетки, вступая при этом в реакции с различными биомолекулами (В.Х. Хавинсон и др., 2003). МДА образует шиффовы основания с аминогруппами белков, как «сшивающий» агент, образуя нерастворимые липид-белковые комплексы, так называемые пигменты изнашивания (W.V. Gerritsen et al., 2006).

Изучение при АКЭ процессов оксидативного стресса показало, что уровень ТБК (тиобарбитуровая кислота)-активных продуктов, представленных в основном МДА, значительно возрастает в перитонеальных лейкоцитах (табл. 2). Содержание МДА повышается в 7.8, 41.1 и 11.3 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно. Образование *in vitro* МДА в модельной системе неферментативного аскорбатзависимого ПОЛ также повышается в 40.7, 25.8 и 15.5 раз в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно по сравнению с контролем. В цитоплазме интенсивность ПОЛ доминирует по сравнению с митохондриями, в которых ПОЛ также возрастает более, чем на порядок. Отметим, что уровень МДА отражает выраженность оксидативного стресса, который зависит от таких АКЭ-индуцированных процессов как стимулирование СРО, с одной стороны, и подавление функционирования АОС – с другой. Продукция АФК опухолевыми клетками и выброс их во внеклеточное пространство вносят свой вклад в активирование ПОЛ в перитонеальных лейкоцитах при АКЭ.

**Таблица 2.** 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  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) уровень МДА: перитонеальные лейкоциты, гомогенат -  $F=13.8$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=59.3$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=16.1$ ,  $p<0.001$ ; клетки АКЭ -  $t = -0.74$ ,  $p=0.46$ ; б) продукция МДА *in vitro* в модельной системе неферментативного ПОЛ: перитонеальные лейкоциты, гомогенат -  $F=29.2$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=48.0$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=20.3$ ,  $p<0.001$ ; клетки АКЭ -  $t = -2.95$ ,  $p=0.006$ .

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

В логарифмической фазе роста клеток АКЭ высока активность ксантинооксидазы, катализирующей окисление пуринов с образованием супероксидного радикала, который с органическими пероксидами и другими активированными кислородными метаболитами участвуют в регуляции клеточной пролиферации, а также синтезе эйкозаноидов, метаболизме ксенобиотиков (R.H.Burdon, 1995; M.Gamberini, L.C.Leite, 1997). В этой же фазе в клетках АКЭ наблюдается низкая активность ферментов утилизации АФК и липидных пероксидов, однако в стационарной фазе развития опухоли их активность повышается, в частности происходит всплеск активности СОД, вероятно, связанный с необходимостью убрать радикал кислорода, как один из пролиферативных стимулов (Л.П. Смирнова, И.В. Кондакова, 2004). СОД при нормальном функционировании АОС конвертирует супероксид-анион ( $O_2^{\cdot-}$ ) в  $H_2O_2$ , которая под воздействием каталазы

превращается в  $H_2O$  и  $O_2$  (N. Azad et al., 2008). Поскольку на исследуемой стадии развития АКЭ опухолевые клетки характеризуются высокой активностью АОС, уровень МДА и его аскорбатзависимого образования *in vitro* в гомогенатах перитонеальных лейкоцитов превышает таковой в клетках АКЭ в 2 и 12.9 раза соответственно. Высокая активность антиоксидантных ферментов в опухолевых клетках является одной из причин их устойчивости к оксидативному стрессу и может служить фактором развития резистентности опухолей к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит свободнорадикальный механизм (Y. Miura et al., 1995; T. Oberley et al., 1995).

На моделях АКЭ и асцитной гепатомы Зайделя показано, что в процессе роста асцитных опухолей в циркулирующей крови увеличивается число лейкоцитов и удельная активность гранулоцитов и активированных фагоцитов, и люминолзависимой хемилюминесценцией выявлено два пула полиморфноядерных лейкоцитов: «праймированных», циркулирующих в крови, и «активированных», которые накапливаются в зоне опухоли и продуцируют АФК с целью оказания цитотоксического воздействия на опухолевые клетки (М.М. Поцелуева и др., 1999). При этом одной из причин гибели организма-опухоленосителя может быть самоповреждение лейкоцитов в силу ослабленного функционирования в них АОС, а также деструкция других нормальных клеток организма, что было продемонстрировано *in vivo* в отношении эритроцитов. базальной мембраны сосудов при движении лейкоцитов в зону роста опухоли и пр., а также *in vitro* при совместном культивировании лейкоцитов и эритроцитов (М.М. Поцелуева и др., 2005). В условиях *in vitro* и *in vivo* показано, что гиперпродукция опухолевыми клетками ряда цитокинов и факторов роста стимулирует в миелоидных клетках образование АФК, которые тормозят их дифференциацию в зрелые гранулоциты, моноциты/макрофаги, дендритные клетки (S. Kusmartsev, D.I. Gabrilovich, 2003). Рост опухоли сопровождается накоплением МСК, которые играют важную роль в опухоли-ассоциированной иммуносупрессии (S. Kusmartsev et al., 2005; A.J. Montero et al., 2012). Таким образом, повышенный уровень СРО в лейкоцитах, по сравнению с клетками АКЭ, обусловлен как возрастанием внутриклеточной продукции АФК, так и подавлением активности АОС, обусловленном конформационными перестройками антиоксидантных



ферментов, индуцированными АФК и/или продуктами липопероксидации, сопровождающимися уменьшением сродства ферментов к субстрату и кофактору.

Согласно современным представлениям ЛПС кишечной микробиоты участвует в регуляции иммунного гомеостаза, а его недостаточность ассоциируется с развитием иммунодефицита, характерного для злокачественных новообразований, и затрагивает системные механизмы функционирования организма (М.Ю. Яковлев, 2003). Обработка мышей суспензией живых грамотрицательных бактерий кишечной палочки будет стимулировать неспецифические механизмы иммунного ответа, активируя АОС и препятствуя развитию иммунодефицитного состояния. Как видно из табл. 2, введение *E. coli* сопровождается снижением содержания МДА в 1.9, 3.2 и 1.8 раза и синтеза *in vitro* МДА в 4.7, 2.4 и 1.2 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно по сравнению с мышами-опухоленосителями. Процессы ПОЛ в меньшей степени подавляются в митохондриях, что опосредованно указывает на превалирование в них продукции АФК, которые в них являются важнейшим сигналом для усиления продукции провоспалительных цитокинов в моноцитах/макрофагах (K. Nakahira et al., 2007).

Драматическое активирование ПОЛ, детектируемое в субклеточных фракциях перитонеальных лейкоцитов, включается в патогенез АКЭ. Обработка кишечной палочкой, активируя АОС и подавляя СРО, препятствует иммуносупрессии и ПОЛ-индуцированным разрушительным процессам, характерным для канцерогенеза. Благодаря положительному влиянию бактериальной обработки функциональная активность лейкоцитов повышается. Это проявляется и в возрастании процессов ПОЛ в клетках АКЭ, в которых вдвое повышается образование *in vitro* МДА. Процессы ПОЛ способствуют образованию липидных рафтов (микродоменов) как в искусственных бислойных липидных мембранах, так и в нативных клеточных мембранах (A.G. Ayuyan, F.S. Cohen, 2006).

Следует отметить, что при стимулировании гранулоцитов наблюдается ассоциированное возрастание в плазме продуктов ПОЛ (8-изопростана, маркера оксидативного стресса) и выброс нейтрофилами  $H_2O_2$ , что индуцирует супрессию Т-клеток, подавляя продукцию ими цитокинов (M. Valko et al., 2006). На модели трансплантированной асцитной гепатомы Зайделя выявлено, что в плазме крови и зоне

роста опухоли складываются различные окислительно-восстановительные условия: в плазме гиперактивность гранулоцитов вызывает оксидативный стресс, в результате которого могут повреждаться сами фагоциты, а в очаге опухоли к середине второй фазы ее развития, падение числа гранулоцитов, и соответственно концентрации АФК и кислорода, способствуют росту опухоли, при этом возрастает число тучных клеток и их дегрануляция приводит к повышению содержания гистамина, который стимулирует рост капилляров и увеличивает их проницаемость, способствуя резкому увеличению объема асцита (Ю.В. Шаталин и др., 2010).

Интенсификация процессов ПОЛ в крови при развитии опухолевого процесса в брюшной полости подавлялась при введении животным *E. coli* (табл. 3). В гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови возрастают показатели уровня МДА в 5.8, 7.2 и 5.1 раза так же, как и образования *in vitro* МДА, которые повышаются в 13.2, 17 и 40 раз соответственно по сравнению с контролем.

**Таблица 3.** 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  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) уровень МДА; лейкоциты, гомогенат -  $F=26.9$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=30.2$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=40.9$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=24.4$ ,  $p<0.001$ ; б) продукция МДА *in vitro* в модельной системе неферментативного ПОЛ: лейкоциты крови, гомогенат -  $F=42.1$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=23.4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=30.9$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=6.53$ ,  $p=0.003$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

В плазме крови содержание МДА и его образование *in vitro* также возрастают - в 4.6 и 2.9 раза соответственно. Примечательно, что в лейкоцитах крови активирование процессов ПОЛ менее выражено, по сравнению с перитонеальными лейкоцитами, которые локализованы в асцитной жидкости и непосредственно контактируют с клетками АКЭ. Введение *E. coli* сопровождается снижением уровня МДА в субклеточных фракциях лейкоцитов крови и плазме. Еще больше подавление процессов ПОЛ проявляется в отношении образования *in vitro* МДА, которое снижается в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови в 2.2, 2.3 и 11 раз соответственно и в плазме в 6.6 раза, по сравнению с больными животными. В митохондриях лейкоцитов после инфицирования кишечной палочкой процессы ПОЛ нормализуются. В плазме образование *in vitro* МДА падает вдвое ниже контрольных значений.

Как видно из табл. 4, при АКЭ в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях клеток головного мозга возрастает содержание МДА в 2.2, 2.6 и 3.7 раза, и образование *in vitro* МДА - в 5.4, 9.1 и 4.8 раза, соответственно, по сравнению с контрольными значениями.

**Таблица 4.** Влияние *E. coli* на перекисное окисление липидов в головном мозге 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  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) уровень МДА; ткани головного мозга, гомогенат -  $F=6.3$ ,  $p=0.004$ ; цитоплазма -  $F=17.6$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=16.3$ ,  $p<0.001$ ; б) продукция МДА *in vitro* в модельной системе неферментативного ПОЛ: ткани головного мозга, гомогенат -  $F=17.9$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=33.8$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=23.0$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

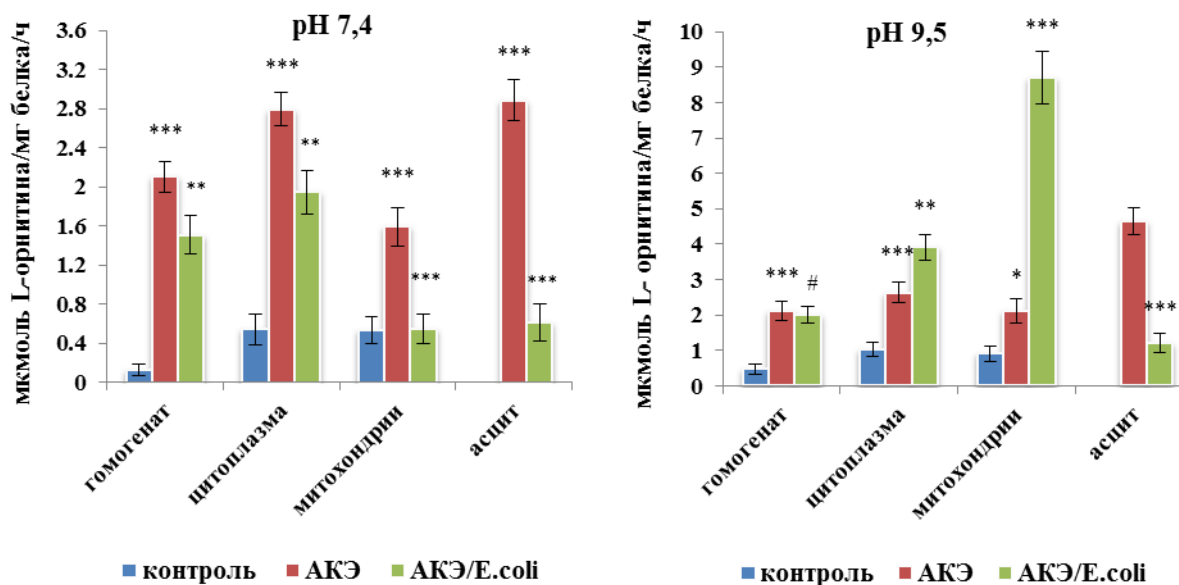
Введение *E. coli* вызывает снижение уровня МДА в 1.95 и 1.45 раза и его образование *in vitro* - в 1.37 и 1.32 раза в цитоплазме и митохондриях клеток мозга, соответственно, по сравнению с неинфицированными мышами-опухоленосителями. В условиях окислительного стресса накопление продуктов ПОЛ в мембранах нервных клеток приводит к нарушению ионного гомеостаза с последующим развитием эксайтотоксичности и их гибели (J. Emerit et al., 2004). При АКЭ возрастание окислительных реакций в головном мозге менее выражено по сравнению с лейкоцитами крови и брюшной полости, и *E. coli* оказывает меньшее антиоксидантное действие, не проявляясь в гомогенатах. Возможно, эти изменения носят протекторный характер, так как АФК могут участвовать в редокс-регуляции ионного гомеостаза нейронов, вовлекая в эти процессы продукты ПОЛ, влияют на высвобождение медиаторов и экспрессию генов (Т.Н. Питлик и др., 2009; С. Lu et al., 2002). В нервных тканях липидные рафты участвуют в процессах клеточной адгезии и сигнальной трансдукции, а в нейронах – в росте аксонов и дендритов, везикулярном транспорте и синаптической передаче (Н. Hering et al., 2003). Кишечная палочка умеренно снижает окислительные реакции в головном мозге, и как это отражается на ПОЛ-индуцированных адаптационно-защитных механизмах, включающихся при АКЭ, еще предстоит выяснить.

### **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**

Регулирование метаболизма L-аргинина является новой перспективной стратегией в лечении рака (М. Munder, 2009). Аргиназа расщепляет аргинин на орнитин и мочевину и, лимитируя содержание аргинина, снижает противоопухолевый иммунитет, способствуя малигнизации тканей (V. Bronte, P. Zanovello, 2005; E.C. Hsueh et al., 2012). В органах и тканях млекопитающих аргиназа представлена двумя изоформами, цитоплазматической (A1) и митохондриальной (A2) (S.M.Jr. Morris, 2012). Впервые на фоне противоопухолевого влияния *E. coli* исследовались внутриклеточные сдвиги в метаболизме L-аргинина, а именно: активности изоформ аргиназы в лейкоцитах брюшной полости и крови, представленных объединенной фракцией мононуклеаров и гранулоцитов

(см. *Материалы и Методы*), а также в головном мозге.

Аргиназная активность определялась в условиях *in vitro* по аккумуляции орнитина в соответствующей реакционной смеси после часовой инкубации. Как видно из рис. 1, аргиназная активность зависит от рН инкубационной среды во всех исследуемых фракциях перитонеальных лейкоцитов здоровых мышей, и обе изоформы аргиназы активны при рН 7,4, соответствующем нормальным физиологическим значениям во внутриклеточных и тканевых жидкостях и плазме крови позвоночных и человека, что согласуется с данными других авторов (D.N. Wheatley et al., 2003). При рН 9,5, оптимальном для аргиназы, ее активность возрастает в 3.9, 1.9, и 1.7 раза в гомогенатах (общая аргиназная активность), цитоплазме (представленной изоформой А1) и митохондриях (представленной изоформой А2) перитонеальных лейкоцитов, соответственно, по сравнению с активностью, определяемой при рН 7,4.



**Рис. 1.** Влияние *E. coli* на аргиназную активность в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) рН 7,4; лейкоциты, гомогенат -  $F=45.0$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=37.7$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=13.5$ ,  $p<0.001$ ; асцит -  $t=8.025$ ,  $p\leq 0.001$ ; б) рН 9,5; лейкоциты, гомогенат -  $F=16.4$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=25.0$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=74.6$ ,  $p<0.001$ ; асцит -  $t = 7.247$ ,  $p\leq 0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

На 11-й день роста АКЭ, у мышей-опухоленосителей аргиназная активность при рН 7,4, возрастает в гомогенатах перитонеальных лейкоцитов примерно в 17.4 раза, а изоформ А1 и А2 в 5.2 и 3 раза, соответственно по сравнению с контролем. При этом в условиях малигнизации клеток в исследуемых фракциях лейкоцитов подавляется стимулирующее влияние основной среды (рН 9,5) на аргиназную активность, и сдвиги при рН 9.5 менее выражены: она возрастает в 4.5 раза в гомогенатах, а активности изоформ А1 и А2 повышаются в 2.6 и 2.3 раза соответственно по сравнению с контролем.

Известно, что в опухолевых клетках происходит нарушение кислородного обмена и нормальное дыхание замещается аэробным гликолизом с образованием молочной кислоты и снижением физиологических значений рН среды в очагах развития злокачественных опухолей, что необходимо учитывать при экспериментальных исследованиях. АКЭ-индуцированные изменения в микроокружении вне и внутри клетки могут влиять на проявление активности изоформ аргиназы, в частности изменяя их физико-химические характеристики.

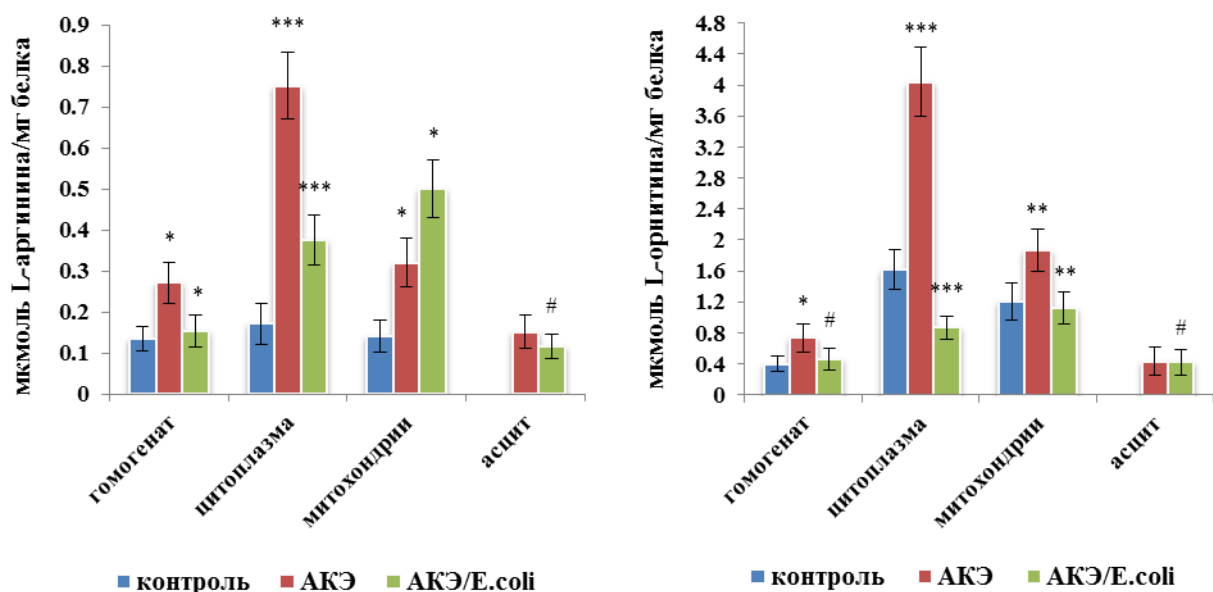
Инкубация асцитной жидкости, представленной в основном смесью лейкоцитов и клеток АКЭ, выявила при рН 7,4 аргиназную активность, которая превышала таковую в лейкоцитах. Вероятно, это проявление активности аргиназы в клетках АКЭ, в которых она участвует в механизмах пролиферации ( S.M.Jr. Morris, 2012). В пользу данного предположения косвенно свидетельствует тот факт, что повышение основности среды инкубации до рН 9,5 не стимулирует аргиназу лейкоцитов, тогда как в асцитной жидкости ее активность повышается в 1.6 раза. Интересно, что при рН 7,4 в клетках АКЭ аргиназная активность примерно втрое ниже таковой, детектируемой в гомогенатах лейкоцитов, тогда как при рН 9,5 она возрастает более чем втрое и превышает лейкоцитарную в 1.2 раза.

У контрольных мышей активности А1 и А2 примерно равны, и возрастание основности реакционной смеси не влияет на соотношение активностей изоформ, тогда как при АКЭ баланс смещается в сторону А1, активность которой в 1.76 раза превышает таковую А2 (при рН 7,4), что прежде всего будет отражаться на регуляции внутриклеточных процессов, сопряженных с аргиназой и ее метаболитами. Следует подчеркнуть, что при рН 9,5 сдвиги в соотношении активностей изоформ аргиназы менее

выражены, и, скорее всего не отражают метаболические изменения, вызванные развитием канцерогенных процессов, поскольку при этом *in vivo* наблюдается тенденция к закислению среды, а не ее защелачивание.

После введения кишечной палочки аргиназная активность лейкоцитов нормализуется в митохондриях и снижается примерно в равной степени, 1.4 раза в гомогенатах и цитоплазме (при рН 7,4) по сравнению с необработанными мышами-опухоленосителями, хотя и превышает соответствующие значения контрольных животных. При этом восстанавливается активирующее влияние основной среды на обе изоформы аргиназы, что также свидетельствует о влиянии кишечной палочки на микроокружение и физико-химические свойства изоформ фермента. Изучение влияния *E. coli* на внутриклеточную активность аргиназы лейкоцитов при рН 9,5 показало, что они не совпадают со сдвигами активности фермента, детектируемыми при рН 7,4, и искажают картину эндогенных превращений в этом метаболическом звене. Обработка *E. coli* вызывает снижение аргиназной активности в асцитной жидкости в 4.7 раза при рН 7,4 и 3.9 раза при рН 9,5. В гомогенатах изолированных лейкоцитов активность аргиназы выше, чем в асцитной жидкости в 2.5 раза при рН 7,4 и в 1.7 раза при рН 9,5, что свидетельствует о полном подавлении активности аргиназы в клетках АКЭ и прочих составляющих асцитной жидкости, которые вдобавок оказывают ингибирующее влияние на фермент лейкоцитов при контакте с последними. Полученные результаты согласуются с данными других авторов о том, что прогрессирование малигнизации коррелирует с повышением экспрессии той или иной изоформы аргиназы (в зависимости от типа опухоли), активность которых значительно возрастает на ранних стадиях развития опухоли внутри нее и в крови, а подавление опухолевого роста сопровождается снижением активности и уровня аргиназ (J. deBoniface et al., 2012; D.J.Jr. Tate et al., 2012).

Сдвиги аргиназной активности в перитонеальных лейкоцитах при АКЭ и после инфицирования *E. coli* подтверждаются внутриклеточными изменениями в них содержания L-орнитина (рис. 2). У мышей-опухоленосителей уровень орнитина в гомогенате, цитоплазме и митохондриях перитонеальных лейкоцитов возрастает в 1.85, 2.5 и 1.55 раза соответственно по сравнению с интактными животными.



**Рис. 2.** Влияние *E. coli* на содержание L-аргинина и L-орнитина в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (AKЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) L-аргинин: лейкоциты, гомогенат –  $F=3.7$ ,  $p=0.033$ ; цитоплазма –  $F=22.4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии –  $F=9.6$ ,  $p<0.001$ ; асцит –  $t = 0.068$ ,  $p=0.95$ ); б) L-орнитин: лейкоциты, гомогенат –  $F=1.6$ ,  $p=0.22$ ; цитоплазма –  $F=28.6$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии –  $F=2.9$ ,  $p=0.066$ ; асцит –  $t = 0.0684$ ,  $p=0.5$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p <0.001$ .

Изменения содержания орнитина в исследуемых клеточных компартментах, в частности обусловлены активированием аргиназы, что подтверждается исследованиями других авторов, которые выявили повышение образования орнитина, ассоциированное с возрастанием экспрессии и активности митохондриальной аргиназы при АКЭ, саркоме и саркоме 180 (S. Vega et al., 2008). Следует отметить, что *in vivo* орнитин ингибирует фермент по принципу обратной связи, однако вызванное АКЭ возрастание содержания орнитина в гомогенатах и субклеточных фракциях исследуемых клеток, по крайней мере, не нивелировало сдвиги аргиназной активности. Ранее было показано, что повышение концентрации L-орнитина в культурах клеток не подавляет в них аргиназную активность (D.N. Wheatley et al., 2005).

Одновременно, в исследуемых фракциях было изучено содержание общего



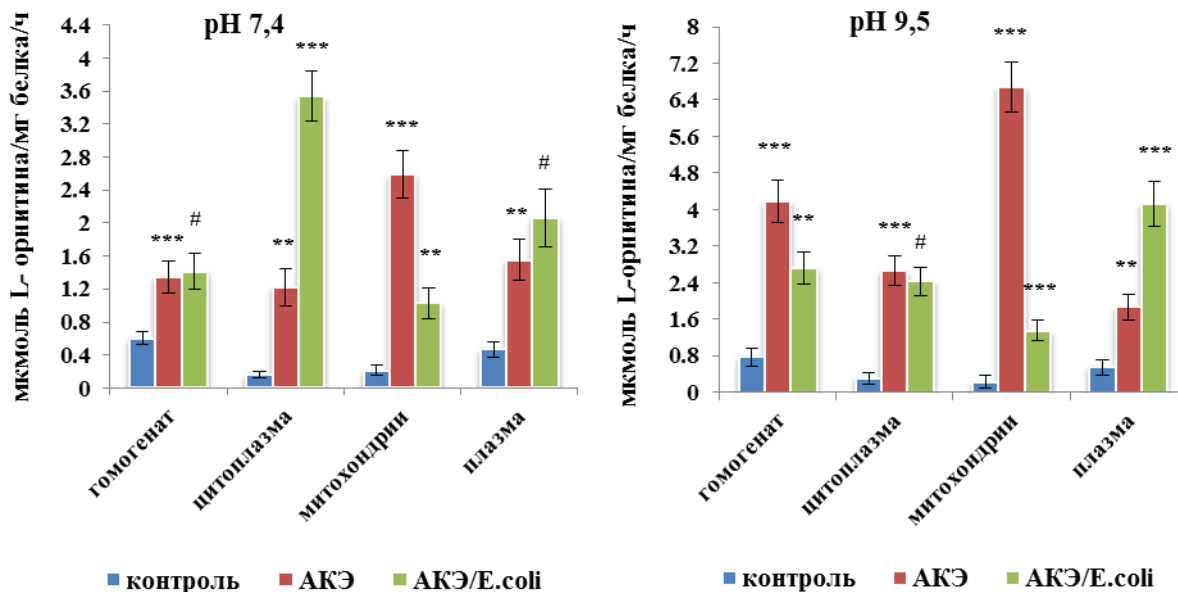
субстрата аргиназы и NO синтазы. Как видно из рис. 2, при АКЭ уровень L-аргинина в перитонеальных лейкоцитах возрастает в 2, 4.4 и 2.3 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях, соответственно по сравнению с контролем. При этом в асците не обнаруживается аргинина и орнитина, которые, по-видимому, полностью утилизируются опухолевыми клетками, что опосредованно указывает на функционирование в них биосинтеза полиаминов через обменные пути аргинин-орнитин-путресцин-полиамины.

Увеличение содержания аргинина может быть обусловлено рядом причин. Известно, что у взрослого человека диета и внутриклеточная деградация белков обеспечивает большую часть требуемых физиологических концентраций аргинина (B.S. Choi et al., 2009). При АКЭ в условиях оксидативного стресса и высокой интенсивности процессов ПОЛ, которые наблюдаются в гомогенатах и основных клеточных компартментах лейкоцитов, происходит усиление распада белков, которое будет сопровождаться повышением содержания аргинина. Кроме того, при АКЭ в условиях изменившейся микробиоты изменяются пути обмена аргинина, влияющие на его уровень (P. Das et al., 2010). Не исключается, стимулирование эндогенного синтеза аргинина, обусловленного АКЭ-индуцированным активированием орнитинкарбамоилтрансферазы (ОКТ), аргининсукцинатсинтетазы (АСС) и аргининосукцинатлиазы (АСЛ) (S.M.Jr. Morris, 2007). Отметим, что некоторые типы опухолей такие, как рак яичников человека, проявляют высокую зависимость от повышенной экспрессии АСС (P.W. Szolsarek et al., 2007). Повышение внутриклеточного содержания аргинина в перитонеальных лейкоцитах может быть одной из причин активирования обеих изоформ аргиназы и ассоциированного увеличения продукции орнитина, выявленных в терминальной стадии развития АКЭ.

Индукцированное канцерогенезом активирование процессов ПОЛ в свою очередь может выступать в роли триггера для обеих изоформ аргиназы. Выброс супероксид-аниона и  $H_2O_2$  вызывает в альвеолярных макрофагах повышение мРНК А1 и ее активности, тогда как ингибирование NADPH оксидазы и снижении продукции АФК подавляет стимулирование активности изоформы А1 (S. Matthiesen et al., 2008). В мышинных макрофагах окисленные и ацетилированные липопroteины индуцируют изоформу А1 (A. Gallardo-Soler et al., 2008).

После введения *E. coli* уровень орнитина в основном нормализуется во всех исследуемых фракциях перитонеальных лейкоцитов мышей с АКЭ, снижается содержание аргинина в гомогенатах и цитоплазме, и лишь в митохондриях он несколько повышается, что, вероятно, обусловлено проникновением его из цитоплазмы. Наблюдается положительная корреляция между аргиназной активностью и содержанием L-орнитина в гомогенатах ( $r=0.84$ ,  $p=0.0002$ ), цитоплазме ( $r=0.63$ ,  $p=0.0053$ ) и митохондриях ( $r=0.99$ ,  $p<0.0001$ ). Уменьшение концентрации орнитина при бактериальной обработке, по всей вероятности, обусловлено подавлением активностей A1 и A2, а снижение уровня аргинина в гомогенатах и цитоплазме лейкоцитов, прежде всего тем, что *E. coli* подавляет развитие оксидативного стресса, и процессы деградации внутриклеточных белков, сопряженные с канцерогенезом. Не исключается и активирование ферментов, катаболизирующих аргинин, и/или стимулирование выброса аминокислоты в интрацеллюлярное пространство. Интересно, что несмотря на то, что после введения *E. coli* аргиназная активность резко падает в асцитной жидкости, в последней не наблюдается статистически значимых сдвигов в уровне аргинина и орнитина, что косвенно свидетельствует о функционировании в опухолевых клетках метаболических путей, утилизирующих эти аминокислоты.

На рис. 3. показаны результаты исследования метаболического профиля L-аргинина в лейкоцитах крови, представленных объединенной фракцией мононуклеаров и гранулоцитов так же, как и перитонеальные лейкоциты, (см. *Материал и Методы исследования*). У здоровых мышей активность A1 в цитоплазме лейкоцитов крови возрастает в основной среде (рН 9,5) в 1.9 раза по сравнению с таковой при рН 7,4, тогда как не обнаружено статистически значимых колебаний аргиназной активности их гомогенатов и митохондрий, а также в плазме в зависимости от рН, поддерживаемого в реакционной смеси. При АКЭ инкубирование фракций лейкоцитов крови при рН 9,5 повышает аргиназную активность по сравнению с рН 7,4 в 3, 2.2 и 2.6 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях, соответственно, то есть в отличие от изоформ аргиназы перитонеальных лейкоцитов их способность активироваться в основной среде сохраняется.



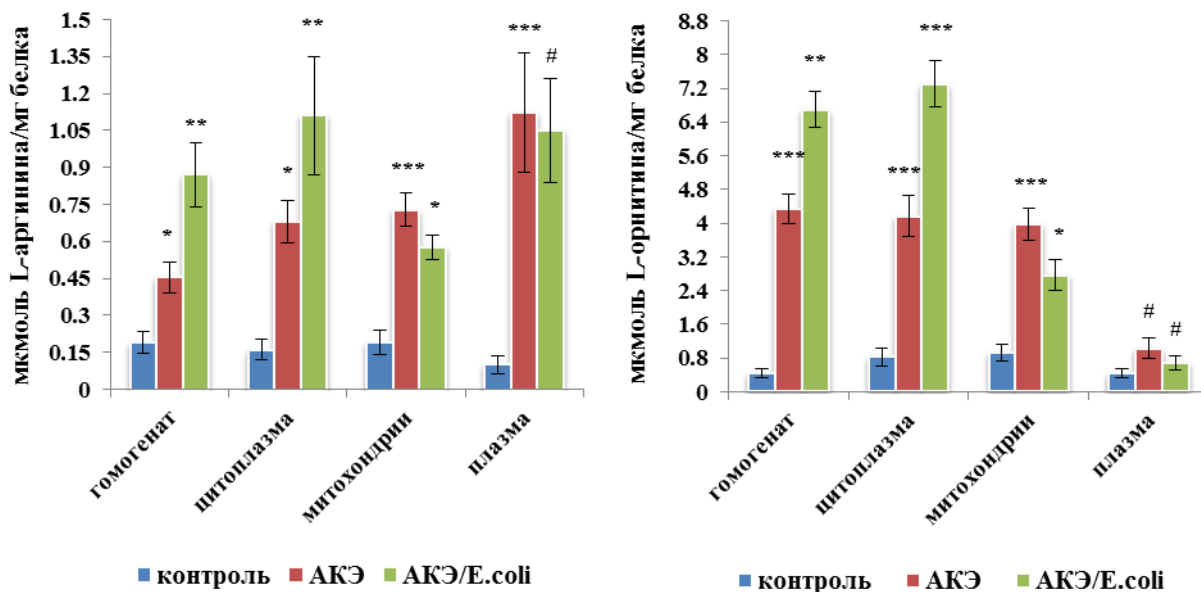
**Рис. 3.** Влияние *E.coli* на аргиназную активность в лейкоцитах и плазме крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) рН 7,4: лейкоциты, гомогенат -  $F=6.4$ ,  $p=0.003$ ; цитоплазма -  $F=59.6$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=35.4$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=7.1$ ,  $p=0.002$ ; б) рН 9,5: лейкоциты, гомогенат -  $F=23.7$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=23.5$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=98.0$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=28.5$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

В плазме мышей-опухоленосителей активность аргиназы повышается примерно втрое по сравнению с контролем, но стимулирующего влияния основной среды не наблюдается. В то же время при АКЭ в гомогенатах лейкоцитов крови аргиназная активность возрастает примерно вдвое, активности изоформ А1 и А2 также повышаются в 7.7 и 12.3 раза соответственно при рН 7,4, по сравнению с контролем. Не исключено, что при АКЭ изменения в активированных лейкоцитах вызывают высвобождение аргиназы в плазму. Возрастание активности А1 в плазме здоровых людей ассоциируется с оксидативным стрессом и статистически достоверно коррелирует с ним, усиливаясь с возрастом (К. Ogino et al., 2011). Отметим, что нейтрофилы крови человека преимущественно экспрессируют А1 и выделяют ее экстрацеллюлярно в микроокружение, тогда как у здоровых мышей она функционирует внутриклеточно (L.C. Jacobsen et al., 2007; M. Munder et al., 2005). Интересно, что мышинные миелоидные макрофаги экспрессируют исключительно А2, которая оказывает провоспалительный эффект,

стимулируя продукцию АФК в митохондриях (X-F. Ming et al., 2012).

*E. coli* оказывает разнонаправленное воздействие на изоформы аргиназы лейкоцитов крови: активность А1 возрастает почти втрое, а таковая А2 снижается в 2.5 раза по сравнению с больными мышами. В то же время активность изоформ превышает контрольные значения: А1 - приблизительно в 22 раза и А2 - 5 раз. Влияние кишечной палочки на АКЭ-индуцированные сдвиги активности аргиназы в плазме и гомогенатах лейкоцитов не выявлялось при рН 7.4, а при рН 9.5 детектируются ее снижение в гомогенатах, и возрастание в плазме, хотя, как уже отмечалось выше, в эндогенных условиях при канцерогенезе защелачивание среды маловероятно.

При АКЭ происходят заметные сдвиги в содержании L-аргинина и L-орнитина в клеточных компартментах лейкоцитов и плазме крови, на которые также влияет обработка кишечной палочкой (рис. 4). На 11-й день после прививки АКЭ, уровень орнитина лейкоцитов крови возрастает в 10, 5.1 и 4.3 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях, соответственно и в 2.4 раза в плазме. *E. coli*-обработка еще больше повышает содержание орнитина в 1,5 и 1,8 раза в гомогенатах и цитоплазме лейкоцитов крови, соответственно по сравнению с мышами-опухоленосителями, но снижает его в 1,4 раза в митохондриях, и 1.5 раза в плазме. Высокая положительная корреляция между аргиназной активностью и содержанием орнитина наблюдается во всех фракциях лейкоцитов крови: гомогенатах ( $r=0.95$ ,  $p<0.0001$ ), цитоплазме ( $r=0.97$ ,  $p<0.0001$ ) и митохондриях ( $r=0.96$ ,  $p<0.0001$ ), а в плазме она менее выраженная ( $r=0.55$ ,  $p=0.02$ ). Примечательно, что при АКЭ в лейкоцитах крови так же, как и в перитонеальных лейкоцитах, 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. Это свидетельствует о системном характере изменений в оси ЖКТ-кровь, вызванных малигнизацией. После инфицирования кишечной палочкой уровень аргинина в гомогенатах и цитоплазме лейкоцитов крови повышается в 1.9 и 1.6 раза, соответственно и лишь небольшое снижение - в 1,3 раза наблюдается в митохондриях по сравнению с неинфицированными мышами-опухоленосителями, не изменяясь в плазме.



**Рис. 4.** Влияние *E. coli* на содержание L-аргинина и L-орнитина в крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) L-аргинин: лейкоциты, гомогенат -  $F=15.4$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=21.6$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=21.5$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=32.2$ ,  $p<0.001$ ; б) L-орнитин: лейкоциты, гомогенат -  $F=65.1$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=42.6$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=24.3$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=2.7$ ,  $p=0.078$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

На сегодняшний день обе изоформы аргиназы обнаружены во многих органах и тканях, включая центральную нервную систему и ЖКТ (S.M.Jr. Morris, 2007). Блуждающий нерв, афферентная иннервация энтерохромаффинных клеток обеспечивает прямую связь между нервной системой и просветом кишечника для энтерохромаффинно-клеточной сигнализации нейрональных цепей, которые играют важную роль в модуляции иммунного ответа, трансмиссии боли и других гомеостатических функций (S.H. Rhee et al., 2009). Взаимовлияние вышеуказанных систем проявлялось в исследуемой метаболической картине при АКЭ и после инфицирования. Как видно из рис. 5, в условиях *in vitro* у контрольных мышей при повышении pH реакционной смеси от 7.4 до 9.5 активность аргиназы возрастает в 1.9 раз в гомогенатах клеток головного мозга и в 1.6 и 1.5 раза в цитоплазме и митохондриях соответственно. По-видимому, и в мозге, аргиназная активность, определяемая при нейтральных pH, точнее отражает картину *in*

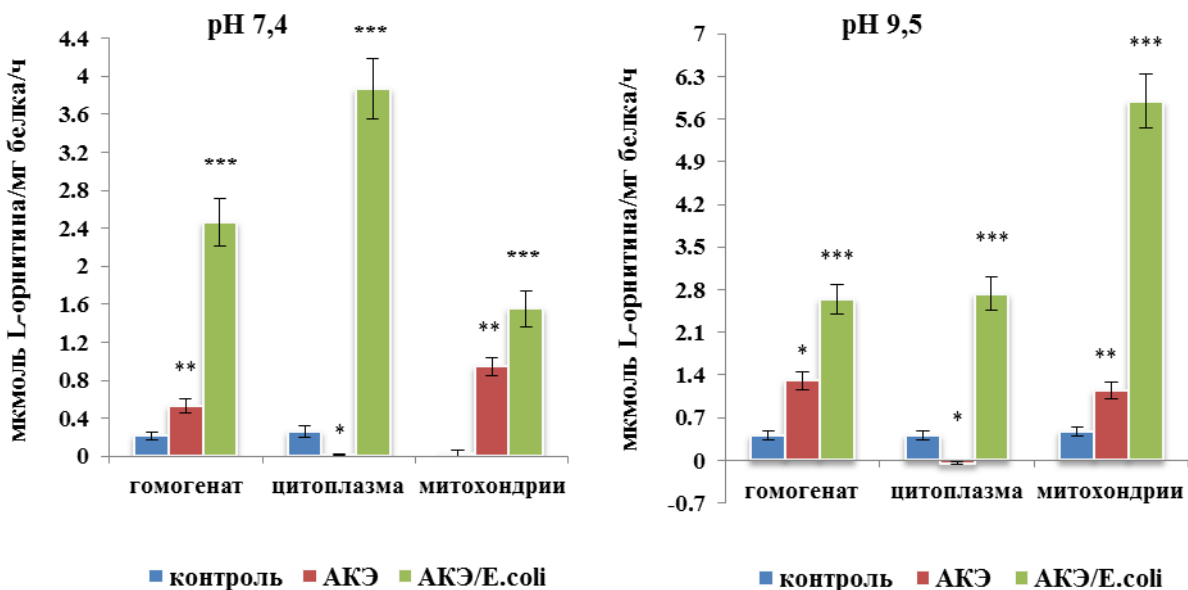
*vivo* в нормальных физиологических условиях, хотя возможны локальные внутриклеточные колебания кислотности среды. В контрольной группе при pH 7.4 активность A1 в цитоплазме сходна с общей, определяемой в гомогенате, и примерно в 8.5 раз выше активности A2 в митохондриях клеток мозга, тогда как при pH 9.5 в гомогенате, цитоплазме и митохондриях детектируются примерно сходные значения аргиназной активности, то есть отмеченные различия нивелируются. Надо полагать, что в тканях головного мозга определение аргиназной активности при оптимальных основных pH может искажать истинную картину проявления активности изоформ аргиназы, подобно тому, как это наблюдается в отношении лейкоцитов брюшной полости и крови.

При АКЭ, в гомогенатах тканей головного мозга общая активность аргиназы увеличивается в 2,5 раза, и происходит перераспределение внутриклеточной аргиназной активности: активность A2 повышается в 3 раза, а активность A1 падает в 17,4 раза, по сравнению с контролем (pH 7.4). При этом стимулирующее влияние основной среды на активность аргиназы проявляется лишь в гомогенатах, и не выявляется в отношении обеих изоформ аргиназы. По-видимому, АКЭ-индуцированные изменения микроусловий в клеточных компартментах тканей мозга, влияют на свойства изоформ аргиназы и проявление их активности.

Таким образом, при АКЭ в мозге происходит полное подавление изоформы A1, которая в норме доминирует внутри клетки. В то же время как активность A2 повышается в митохондриях, в результате чего при АКЭ соотношение активностей аргиназы в исследуемых клеточных компартментах меняется на противоположное. При этом изоформа A2 может конкурировать с NO синтазой в митохондриях клеток мозга и влиять на ее активность, препятствуя продукции оксида азота (D.J.Jr. Tate et al., 2008).

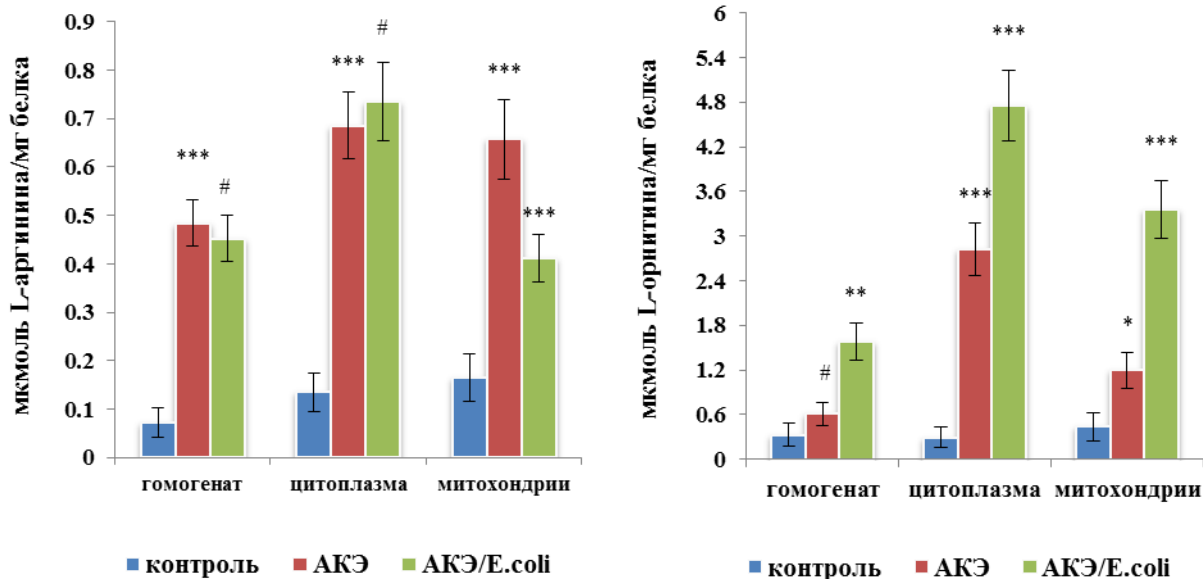
При введении *E. coli* существенно стимулируется подавленная при АКЭ активность A1, которая превышает контрольный уровень почти в 15 раз при pH 7.4, и в 6.6 раза - при pH 9.5. Одновременно активность A2 возрастает в 5 раз при pH 7,4 и 12.6 раза при pH 9,5 по сравнению с неинфицированными мышами-опухоленосителями. В гомогенатах также наблюдается возрастание общей активности фермента в 11.5 раз при pH 7.4, и 6.5 раз - при pH 9.5. Стимулирующее влияние кишечной палочки на обе изоформы аргиназы в нервных

клетках будет отражаться при АКЭ на сопряженных обменных путях в соответствующих клеточных компартаментах и требует дальнейших исследований.



**Рис. 5.** Влияние *E. coli* на аргиназную активность в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ , постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) рН 7,4: гомогенат -  $F=30.5$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=73.5$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=11.0$ ,  $p<0.001$ ; б) рН 9,5: гомогенат -  $F=14.6$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=35.1$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=83.7$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

Одновременно при АКЭ происходят сдвиги в содержании L-аргинаина и L-орнитина в головном мозге, которые определяются и на уровне клеточных компарментов (рис. 6). Уровень орнитина повышается в 1.9, 9.5 и 2.7 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях клеток мозга, соответственно. Концентрация орнитина в наибольшей степени возрастает в цитоплазме, что может подавлять А1 изоформу аргиназы по принципу отрицательной обратной связи, то есть ингибирование фермента конечным продуктом. Повышение уровня орнитина не предотвращает повышение активности А2, что, частично связано со спецификой и дозозависимостью его влияния на эту изоформу и требует дальнейшего изучения.



**Рис. 6.** Влияние *E. coli* на содержание L-аргинина и L-орнитина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) L-аргинин: гомогенат -  $F=29.1$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=25.7$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=15.5$ ,  $p<0.001$ ; б) L-орнитин: гомогенат -  $F=11.4$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=41.3$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=27.9$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

Кишечная палочка вызывает еще большее возрастание уровня орнитина – в 2.6, 1.7 и 2.8 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях клеток мозга, соответственно, по сравнению с неинфицированными мышами-опухоленосителями. При этом более высокие концентрации орнитина не ингибируют активность А1, которая возрастает, превышая норму в 14.7 раза и совпадает со значениями активности А1 лейкоцитов крови. Возможно проникновение их через ГЭБ, вследствие повышения его проницаемости под воздействием *E. coli*. Положительная корреляция между аргиназной активностью и содержанием орнитина подтверждает их метаболическую связь в клетках головного мозга: гомогенатах ( $r=0.99$ ,  $p<0.0001$ ), цитоплазме ( $r=0.79$ ,  $p=0.0001$ ) и митохондриях ( $r=0.93$ ,  $p<0.0001$ ). Как видно из рис. 6, при АКЭ уровень аргинина возрастает в 6.7, 5.1 и 4 раза в гомогенате, цитоплазме и митохондриях клеток мозга, соответственно. АКЭ-индуцированное повышение концентрации аргинина, возможно, вносит свой вклад в активирование аргининметаболизирующих ферментов и прежде всего аргиназы, которую



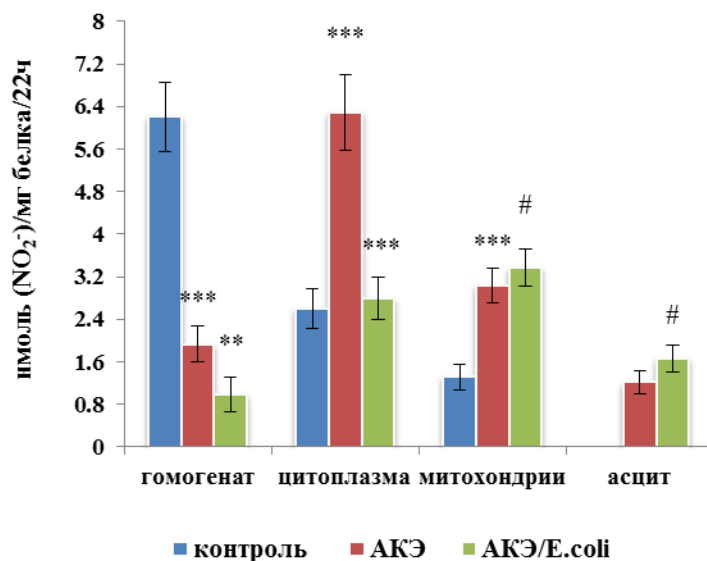
стимулирует и возрастание СРО в мозге, детектируемое при АКЭ. При обработке кишечной палочкой содержание аргинина снижается в 1.6 раза в митохондриях, а в гомогенатах и цитоплазме остается на том же уровне, что у мышей-опухоленосителей.

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

Изменения активности изоформ аргиназ при АКЭ приобретают особое значение, в связи с обратной тонко регулируемой связью между аргиназой и синтазой оксида азота (NOS) (D.E. Berkowitz et al., 2003). 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 циркулирующих нейтрофилах, лимфоцитах, нестимулированных моноцитах, а также в клетках головного мозга (S.S. Greenberg et al., 1998; T. Wallerath et al., 1997).

Как видно из рис. 7, на 11-й день трансплантации АКЭ происходит примерно равное повышение активности NOS в цитоплазме и митохондриях перитонеальных лейкоцитов - 2.4 и 2.3 раза соответственно. В то же время в гомогенатах лейкоцитов детектируется падение активности фермента втрое. Одним из возможных объяснений может быть то, что при 22 часовой инкубации гомогенатов для определения *in vitro* активности NOS, несмотря на возрастание последней происходит более выраженная убыль биоактивного NO, поскольку липофильность и малые размеры позволяют NO свободно диффундировать через клеточные мембраны и компоненты межклеточного вещества, которые в гораздо большем количестве представлены в гомогенатах, где происходит активное взаимодействие NO с широким спектром молекулярных мишеней таких, как активные формы кислорода, низкомолекулярные тиолы, сульфгидрильные группы белков, металлы, гемопротеиды и т.д. (M. Inoue et al., 2000). Все эти процессы могут маскировать изменения

в интенсивности продукции NO в гомогенатах, а также быть причиной снижения активности NOS лейкоцитов почти вдвое (по сравнению с изолированными лейкоцитами) при их инкубации в асцитной жидкости в контакте с опухолевыми клетками.



**Рис. 7.** Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: гомогенат -  $F=36,88$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=16,4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=12,6$ ,  $p<0.001$ ; асцит -  $t = -1,33$ ,  $p = 0,193$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0,05$ , \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ .

После инфицирования *E. coli* в перитонеальных лейкоцитах снижается в 2.2 раза активность NOS в гомогенатах, в цитоплазме она нормализуется, но изменений в отношении митохондриальной активности NOS не было выявлено. Показано, что ингибитор NO-синтазы, нитроаргинин вызывает монотонное увеличение АФК-генерирующей активности гранулоцитов и мононуклеаров асцитной жидкости крыс, выделенных в разные периоды роста асцитной гепатомы Зайделя, создавая благоприятные условия для торможения роста опухолевых клеток *in vivo* (А.А. Наумов, М.М. Поцелуева, 2005). По-видимому, подавление активности NOS лейкоцитов при введении кишечной палочки может подобным образом стимулировать противоопухолевую активность

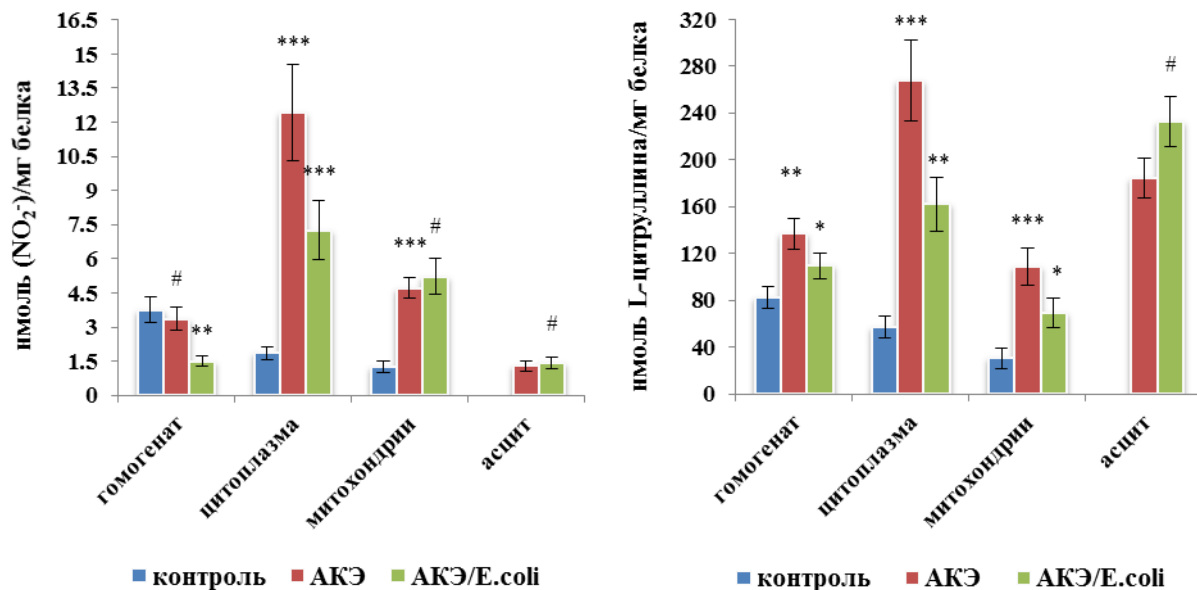
лейкоцитов в участках развития опухоли при АКЭ.

В перитонеальных лейкоцитах контрольных животных активность NOS в цитоплазме приблизительно вдвое выше таковой в митохондриях, и это соотношение не меняется у мышей с АКЭ, так как в этих клеточных компартментах активности NOS возрастают примерно в равной степени. Введение *E. coli* нивелирует эти различия, выравнивая активности, поскольку нормализуя активность фермента в цитоплазме, не влияет на нее в митохондриях. Субклеточные сдвиги активности NOS будут отражаться на внутри- и внеклеточной продукции NO, по-разному влияющей на стресс-ответ и апоптоз, что ранее было продемонстрировано на макрофагах, подвергнутых воздействию биологических или физических факторов (Е.В. Малышева и др., 2007).

При АКЭ в перитонеальных лейкоцитах происходят внутриклеточные изменения в содержании конечных продуктов реакции NOS, L-цитруллина и оксида азота, представленного стабильными продуктами его окисления (нитритами) (рис. 8). В гомогенатах, сдвиги в содержании нитритов не проявляются но их уровень повышается в 6.7 и 3.8 раза в цитоплазме и митохондриях соответственно, по сравнению с контрольными значениями. Одновременно уровень L-цитруллина возрастает в 1.7, 4.7 и 3.6 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях перитонеальных лейкоцитов, соответственно по сравнению с контролем. После введения бактерии во всех исследуемых фракциях лейкоцитов брюшной полости мышей-опухоленосителей снижается содержание стабильных метаболитов NO в 2.2 и 1.7 раза в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов, по сравнению с мышами-опухоленосителями, тогда как в митохондриях значимых изменений не выявляется, а содержание L-цитруллина снижается в 1.3, 1.7 и 1.6 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно по сравнению с неинфицированными животными и может служить индикатором подавления нитригического ответа.

Метаболическая связь между активностью NOS и содержанием нитритов в перитонеальных лейкоцитах подтверждается корреляцией их величин в гомогенатах ( $r=0.76$ ,  $p=0.0004$ ), цитоплазме ( $r=0.88$ ,  $p<0.0001$ ) и митохондриях ( $r=0.99$ ,  $p<0.0001$ ). Положительная корреляция выявляется также между активностью NOS и уровнем L-

цитруллина: в гомогенатах ( $r=0.77$ ,  $p=0.0003$ ), цитоплазме ( $r=0.89$ ,  $p<0.0001$ ) и митохондриях ( $r=0.78$ ,  $p=0.0002$ ).



**Рис. 8.** Влияние *E. coli* на содержание стабильных метаболитов NO и L-цитруллина в брюшной полости мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) нитриты: перитонеальные лейкоциты, гомогенат -  $F=6.8$ ,  $p=0.002$ ; цитоплазма -  $F=13.6$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=15.3$ ,  $p<0.001$ ; асцит -  $t = -0.372$ ,  $p = 0.712$ ; б) L-цитруллин: перитонеальные лейкоциты, гомогенат -  $F=5.7$ ,  $p=0.006$ ; цитоплазма -  $F=18.2$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=9.1$ ,  $p<0.001$ ; асцит -  $t = -1.809$ ,  $p = 0.079$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

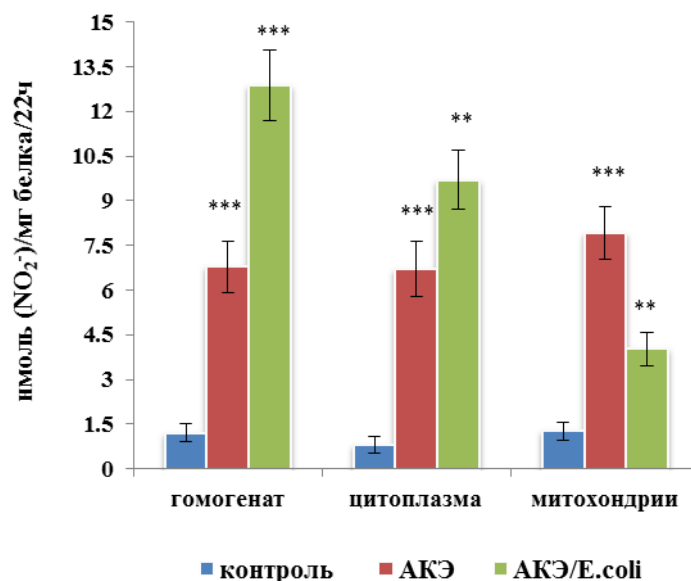
Таким образом, развитие АКЭ сопровождается изменениями в ферментативной аргинин-зависимой продукции NO в клеточных компартментах перитонеальных лейкоцитов. В то же время клетках АКЭ не детектируется активность NOS. Причем в асцитной жидкости содержание АФА ниже, чем в гомогенатах изолированных лейкоцитов брюшной полости, что, возможно, обусловлено активным взаимодействием внеклеточного лейкоцитарного NO с АФК и прочими метаболитами, продуцируемыми опухолевыми клетками. Уровень цитруллина в клетках АКЭ также в 2.9 раза ниже, чем в перитонеальных лейкоцитах. Отчасти, это связано с рециклизацией цитруллина в аргинин ферментами АСС и АСЛ, которые обеспечивают в клетках автономное снабжение

аргинином и представлены практически во всех органах и тканях (G.Wu, S.M.Morris, 1998). Аргинин может утилизироваться опухолевыми клетками, как уже отмечалось выше.

Инфицирование кишечной палочкой сопровождается проявлением активности NOS в клетках АКЭ, которая тем не менее в 1.64 раза ниже таковой в гомогенатах лейкоцитов брюшной полости. Однако, после *E. coli*-обработки в клетках АКЭ не наблюдается статистически достоверных изменений в уровне нитритов, вероятно, вследствие активного взаимодействия NO с АФК с образованием ПН, что может индуцировать в них нитрозирующий стресс, оказывая повреждающее действие. ПН вызывает необратимое ингибирование аконитазы (фермента цикла трикарбоновых кислот), железосерных центров I-III комплексов дыхательной цепи, нитрозирование мембранных тиолов и цитохрома С, нарушая перенос электронов в дыхательной цепи, одновременно происходит выход цитохрома С (в том числе и нитрованного) в цитоплазму, что может иметь и сигнальное значение; ПН нитрозирует гуанин, вызывая разрыв цепочек ДНК и мутации, запускает процессы апоптоза с открытием гигантской митохондриальной поры (И.Ф. Беленичев и др., 2009; J.P. Bolaños, S.J.R. Heales, 2010).

Сравнительное изучение особенностей нитрегергического ответа лейкоцитов крови показало, что при АКЭ происходит повышение общей активности NO-синтазы в 5.6, 8.5 и 6.3 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях, а инфицирование вызывает еще большее ее возрастание - в 1.9 и 1.5 раза в гомогенатах и цитоплазме, тогда как в митохондриях снижается примерно вдвое по сравнению с нелечеными мышами-опухоленосителями (рис. 9). У контрольных животных и мышей с АКЭ соотношение активностей NOS в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови примерно равны, тогда как после бактериальной обработки общая активность NOS в цитоплазме в 2.4 раза выше таковой в митохондриях. Одной из возможных причин может быть перераспределение активностей индуцибельной и конститутивных изоформ NOS в этих компартментах. ЛПС кишечной палочки вызывает активирование iNOS и перепродукцию NO, избыток которого может включаться в образование железонитрозильных комплексов ( $Fe^{2+}$ -NO), подавляя

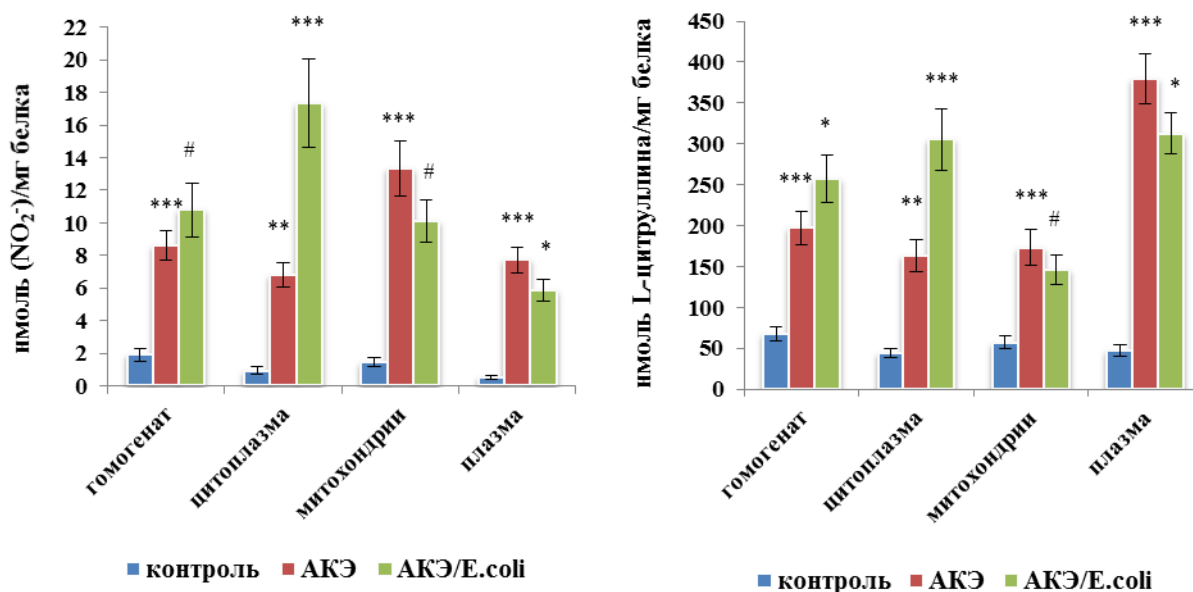
активность сNOS по механизму отрицательной обратной связи, который действует для всех известных форм NOS, и, по-видимому, лежит в основе их саморегуляции и предупреждения отрицательных последствий повышения уровня NO (W.K. Alderton et al., 2001). Однако, при этом iNOS ингибируется слабо, так как в ней восстановленный комплекс Fe<sup>2+</sup>-NO легко переходит в конечный продукт реакции Fe<sup>3+</sup>-NO, а nNOS остается в прочной Fe<sup>2+</sup>-NO форме ингибиторного комплекса (H.M. Abu-Soud et al., 1995; Q.A. Albasri, D.J. Stuehr, 1996). Подавление активности сNOS связывается также с ингибирующим нитрозилированием фермента пероксинитритом (B.M. Gaston et al., 2003).



**Рис. 9.** Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота в лейкоцитах крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: гомогенат -  $F=46.0$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=32.5$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=28.3$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

При АКЭ изменяется базальный уровень конечных продуктов NO-синтазной реакции (рис. 10). Содержание стабильных метаболитов NO возрастает в лейкоцитах крови в 4.5, 7.3 и 9.3 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно, и в 14 раз в плазме. Уровень L-цитруллина также повышается в 2.9, 3.7 и 3 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов, соответственно и в плазме - 8.1 раза. Повышение

концентрации нитритов и цитруллина в плазме, по-видимому, связан с выбросом их из лейкоцитов крови. Введение *E. coli* сопровождается повышением уровня стабильных метаболитов NO в 1.3 и 2.6 раза и L-цитруллина 1.3 и 1.9 раза в гомогенатах и цитоплазме, соответственно, тогда как в митохондриях не выявлено статистически значимых сдвигов, в плазме их снижение также незначительно - примерно в 1.2-1.3 раза по сравнению с таковыми у неинфицированных мышей с АКЭ.



**Рис. 10.** Влияние *E. coli* на содержание стабильных метаболитов NO и L-цитруллина в лейкоцитах и плазме крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) нитриты: лейкоциты, гомогенат -  $F=17.6$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=26.4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=24.5$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=37.4$ ,  $p<0.001$ ; б) L-цитруллин: лейкоциты, гомогенат -  $F=21.8$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=27.8$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=12.7$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=58.8$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

Изменения в системе NOS/NO в лейкоцитах крови подтверждается и на уровне сдвигов в них содержания конечных продуктов NO синтазной реакции: 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 ( $r=0.78$ ,  $p=0.0002$ ).

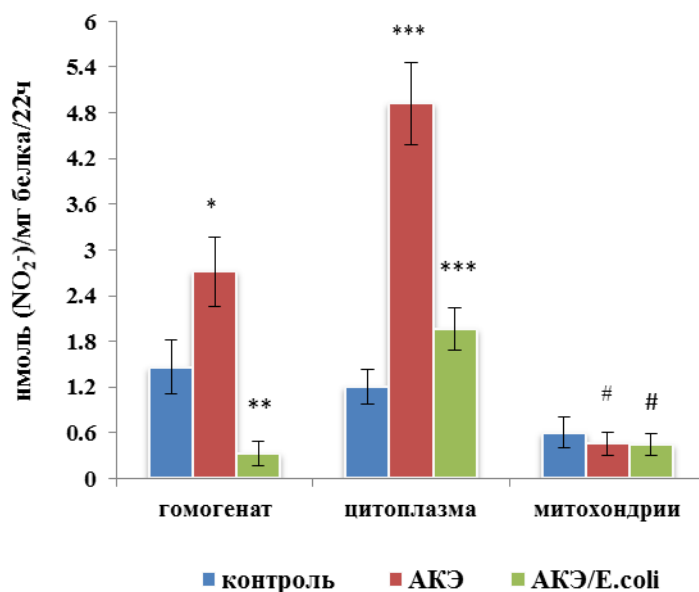
При АКЭ стимуляция активности NOS лейкоцитов, по всей видимости, происходит за счет iNOS, которая является единственной изоформой NOS, способной продуцировать NO в течение длительного времени, стойко повышая его уровень в иммунных клетках, запуская таким образом механизмы иммуносупрессии (С.Л. Lowenstein, Е. Padalko, 2004). Будучи высокопроизводительной формой, iNOS зависит от концентрации аргинина, который является лимитирующим фактором для синтеза NO, и в активировании iNOS при АКЭ, вероятно играет роль возрастание уровня аргинина, которое наблюдается в гомогенатах и исследуемых клеточных компартаментах лейкоцитов брюшной полости и крови. L-аргинин способствует самосборке мономеров NOS в активные димеры с последующей стабилизацией их структуры (W.K. Alderton et al., 2001). Показано, что диетические добавки L аргинина повышают концентрацию кофактора NOS, тетрагидробиоптерина, стимулирующего синтез NO в клетках эндотелия, улучшая его функции (R.Kohli et al., 2004). Тетрагидробиоптерин в еще большей мере, чем L-аргинин способствует сборке активных димеров изоформ NOS и стабилизации их структуры (R.H. Foxton et al., 2007).

Транспорт циркулирующего аргинина через клеточную мембрану осуществляется в большинстве типов клеток млекопитающих в том числе и опухолевых  $\text{Na}^+$ -независимой системой транспорта катионных аминокислот (J.C. Cendan et al., 1995). Недавно было показано, что транспортер аргинина и NOS колокализуются в плазматической мембране, что позволяет осуществлять избирательное снабжение фермента аминокислотой (F. Verrey et al., 2004). На активность транспортера аргинина влияют цитокины (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) под воздействием которых он коиндуцируется с NOS, поставляя таким образом субстрат для фермента (J.C. Cendan et al., 1996). Возможно, возрастание внутриклеточного уровня аргинина в лейкоцитах хозяина обусловлено АКЭ-индуцированным синтезом транспортера аминокислоты, или снижением концентрации свободного асимметричного диметиларгинина, который в условиях *in vivo* конкурирует с аргинином на уровне транспортера Y(+) и/или NO синтаз (S.M. Bode-Boger et al., 2007). В доступной нам



литературе подобных работ нет, и это еще предстоит выяснить.

Нарушение двунаправленного взаимодействия между кишечником ее микрофлорой и нервной системой могут быть вовлечены в патофизиологию заболеваний ЖКТ (S.M. O'Mahony et al., 2011). Впервые выявлено, что при АКЭ происходят сдвиги, касающиеся процессов аргинин-зависимой ферментативной продукции NO в головном мозге мышей на 11-й день развития АКЭ (рис. 11). В гомогенатах и цитоплазме клеток мозга активность NO синтазы возрастает в 1,85 и 4,1 раза, соответственно, по сравнению с контрольными животными, тогда как в митохондриях достоверных изменений не обнаружено.



**Рис. 11.** Влияние *E. coli* на активность синтазы оксида азота в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: гомогенат -  $F=11.8$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=27.5$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=0.85$ ,  $p>0.05$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

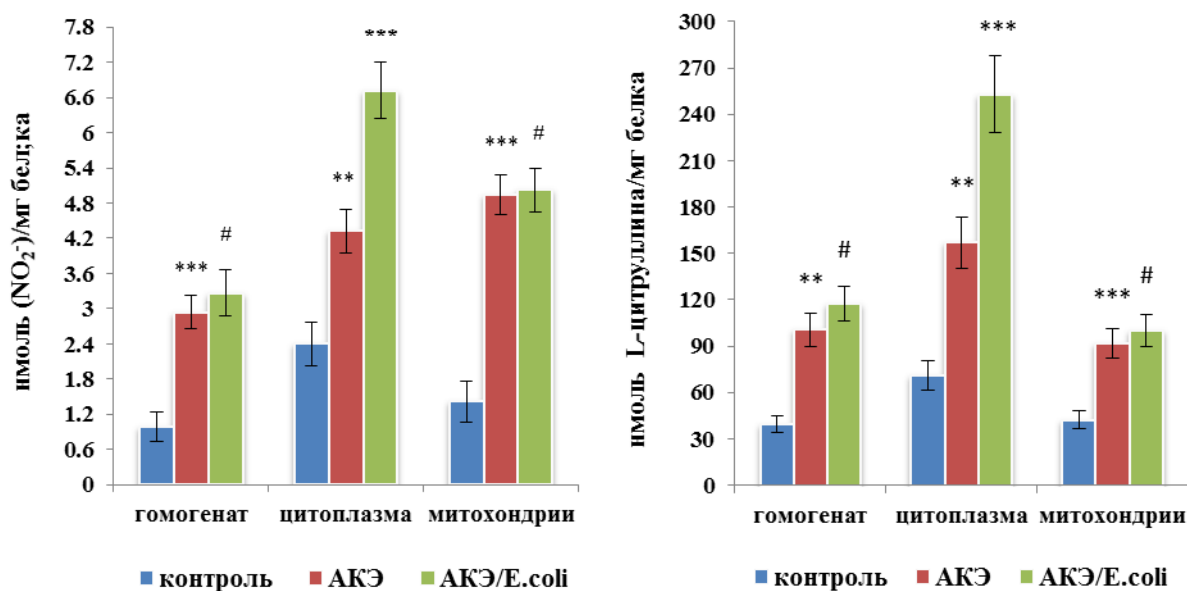
Как указывалось выше (см. Раздел 3.2.) при АКЭ в гомогенатах и клеточных компартментах клеток головного мозга наблюдается повышение содержания L-аргинина, что вносит свой вклад в стимулирование активности NOS, и в первую очередь iNOS. Экспрессия iNOS в мозге усиливается при иммунном и воспалительном ответе, вследствие активирования Toll-подобных рецепторов и продукции астроцитами цитокинов, IL-6 и TNF- $\alpha$  (P.A. Carpentier et al., 2005). На фоне АКЭ-индуцированного оксидативного стресса

возрастание синтеза ПН, более агрессивного метаболита NO, может повышать проницаемость гематоэнцефалического барьера (N.J. Abbott, 2002). ПН увеличивает проницаемость микрососудов, авзаимодействие ПН с CO<sub>2</sub>, с образованием более активного продукта (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), который в 2-4 раза стимулирует реакции нитрирования, включает другие механизмы воздействия на ГЭБ (M.P. Murphy, 1999).

После инфицирования *E. coli* активность NOS снижается в 8.1 и 2.5 раза в гомогенатах и цитоплазме клеток головного мозга, соответственно, а продукция NO в митохондриях не изменяется. Поскольку при введении кишечной палочки происходит подавление процессов ПОЛ в клетках головного мозга, это косвенно свидетельствует о снижении интенсивности оксидативного стресса, что будет ограничивать синтез ПН и его разрушительные эффекты. Модулирующее воздействие бактерии на генерацию NO будет способствовать нормализации процессов, контролируемых оксидом азота в мозге. Интересно, что соотношение активностей NOS в цитоплазме и митохондриях клеток головного мозга контрольных животных и перитонеальных лейкоцитах равнялось 2:1, но после трансплантации АКЭ вследствие возрастания активности NOS в цитоплазме при неизменной митохондриальной, это соотношение становится 11:1. При введении *E. coli* снижается цитоплазматическая активность NOS, а в митохондриях она не меняется, и соотношение активностей фермента в цитоплазме и митохондриях снижается (4.4:1, соответственно) в сторону нормального баланса.

АКЭ-индуцированные сдвиги в метаболическом звене L-аргинин NO в тканях мозга мышей и влияние на них *E. coli* подтверждается и изменениями содержания конечных продуктов NO синтазной реакции (рис. 12). Содержание стабильных метаболитов NO возрастает в 2.96, 1.8 и 3.48 раза, а L-цитруллина - в 2.6, 2.2 и 2.2 раза в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях соответственно, по сравнению с контролем. При инфицировании *E. coli* не выявляется изменений в уровне нитритов и весьма незначительные сдвиги в содержании цитруллина в гомогенате и митохондриях клеток мозга, тогда как в цитоплазме происходит еще большее повышение содержания нитритов и цитруллина - в 1.55 и 1.6 раза соответственно по сравнению с неинфицированными животными с АКЭ. Введение кишечной палочки не отражалось на содержании аргинина в

исследуемых фракциях, в которых его повышенный уровень сохраняется, косвенно свидетельствуя о том, что транспорт аминокислоты не нарушается и сдвиги в активности ферментов, метаболизирующих ее, скорее всего обусловлены другими причинами. Положительная корреляция между содержанием стабильных метаболитов NO и L-цитруллина в гомогенатах ( $r=0.98$ ,  $p<0.0001$ ), цитоплазме ( $r=0.87$ ,  $p<0.0001$ ) и митохондриях ( $r=0.86$ ,  $p<0.0001$ ) тканей головного мозга указывает на их метаболическую связь.



**Рис. 12.** Влияние *E. coli* на содержание стабильных метаболитов NO и L-цитруллина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (AKЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) нитриты: гомогенат -  $F=15.2$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=27.4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=33.2$ ,  $p<0.001$ ; б) L-цитруллин: гомогенат -  $F=19.1$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=25.4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=12.9$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

NO является важным антеро- и ретроградным мессенджером, участвующим в синаптической передаче: он опосредует действие глутаматных рецепторов, влияет на секрецию важнейших нейромедиаторов (дофамина, серотонина, норадреналина, ацетилхолина) и аминокислот (глутамат, аспаргат) (А.А.Сосунов, 2000). Интересно, что стресс-гормоны способствуют росту непатогенных штаммов *E. coli*, через

взаимодействие с такими катехоламинами хозяина, как адреналин и норадреналин (P.P. Freestone et al., 2002). Будут ли изменения активности NOS в головном мозге, воздействуя на секрецию нейротрансмиттеров оказывать влияние на рост *E. coli* еще предстоит выяснить.

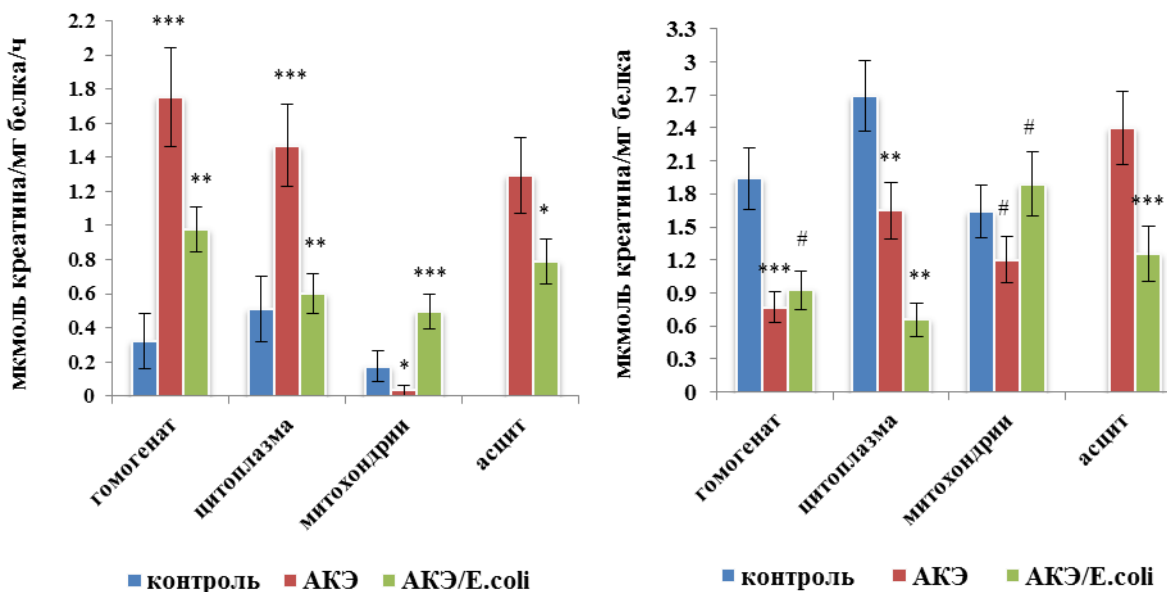
Снижение процессов ПОЛ, вызванное при введении *E. coli* косвенно свидетельствует о снижении продукции АФК, что может способствовать увеличению уровня биодоступного NO и таким образом влиять на активность iNOS. Так, в цитокин-стимулированных гепатоцитах крыс 18-кратное повышение экспрессии iNOS подавляется донорами NO (S-нитрозо-N-ацетил-D, L-пенициламин и V-PYRRO/NO) и восстанавливается его скавенджерами (эритроциты) (K. Chang et al., 2004). Подобным влиянием, может быть обусловлено снижение общей активности NOS в цитоплазме клеток мозга, которое имеет защитное значение, поскольку длительная генерация NO/iNOS, сопровождается гиперпродукцией АФА и, поскольку одновременно в мозге активируется образование АФК, синтезируется ПН, оказывающий повреждающее действие в клетках и тканях (M. Gutowski, S. Kowalczyk, 2013). Примечательно, что ПН может вызывать выброс аргинина из астроцитов и одновременно стимулировать в глии Cat1, систему транспорта аргинина в нейроны (V. Vega-Agapito et al., 2002).

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

Пул креатина и креатинфосфата (КФ) играет важную роль для органов и тканей с высоким потреблением энергии, и большая часть аргинина, синтезируемого в организме, расходуется при взаимодействии его с глицином на синтез креатина (M.M.Jr.Sidney, 2004). Взаимопревращение КФ-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, тогда как в митохондриях она падает примерно в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 13). Интересно, что в линии раковых клеток человека HeLa обнаружен высокий уровень экспрессии цКК и низкий - мКК, в то время как в нормальных клетках (кератиноцитах) наблюдается противоположная картина (H.Lenzetal., 2007). Инкубация в асцитной жидкости перитонеальных лейкоцитов в смеси с опухолевыми клетками снижает примерно в 1,4 раза активность КК по сравнению с гомогенатами изолированных лейкоцитов ( $1.3 \pm 0.21$  vs.  $1.8 \pm 0.2$  мкмоль/мг белка/ч), что указывает на ингибирование общей активности КК лейкоцитов под влиянием микроокружения, создаваемого опухолевыми клетками в асцитной жидкости, а также свидетельствует об отсутствии активности КК в клетках АКЭ или весьма низкой, не детектируемой используемым методом.



**Рис. 13.** Влияние *E. coli* на активность креатинкиназы и содержание креатина в перитонеальных лейкоцитах и асците мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) креатинкиназа: перитонеальные лейкоциты, гомогенат -  $F=12.2$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=7.8$ ,  $p=0.001$ ; митохондрии -  $F=8.9$ ,  $p<0.001$ ; асцит -  $t = 2.254$ ,  $p=0.031$ ; б) креатин: перитонеальные лейкоциты, гомогенат -  $F=9.6$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=16.2$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=1.96$ ,  $p=0.15$ ; асцит -  $t = 7.09$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

Низкая активность КК в асците отмечается и в других работах, предполагается, что при АКЭ она не достаточна для поддержания пула креатин/КФ, и скорее всего фермент необходим в пролиферирующих раковых клетках для метаболизма в направлении синтеза полиаминов (S. Vera et al., 2008). В то же время авторы указывают, что в клетках АКЭ при сравнительно низком уровне креатина возрастает уровень мРНК транспортера креатина, благодаря чему опухолевые клетки могут поглощать и высвобождать его значительные количества.

Как видно из рис. 13, в клетках АКЭ содержание креатина вдвое превышает таковой в лейкоцитах, в то время как в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов его содержание снижается в 2,5 и 1.6 раза, соответственно по сравнению с контролем (в митохондриях наблюдается снижение уровня креатина, но оно недостоверно). Это опосредованно свидетельствует в пользу АКЭ-индуцированного транспорта креатина и его активного оттока в опухолевые клетки. Креатин может мобилизоваться из тканей хозяина в клетки АКЭ даже против более высокого градиента концентрации, а подавление мобилизации креатина его аналогом, бета-гуанидинопропиновой кислотой вызывает торможение опухолевого роста и продлевает жизнь мышей-опухоленосителей (Y. Ohira et al., 1991).

Известно, что мКК существует в виде взаимопревращаемых, существующих в состоянии динамического равновесия форм – димера и октамера (68 % и 32 %, соответственно), тогда как цКК представлена только димерной формой (T. Schnyder et al., 1994). Именно октамерная форма мКК способствует образованию и укреплению контактных сайтов внутренней и внешней мембран митохондрий, укрепляя их структуру и повышая резистентность, обеспечивая тем самым эффективность энергообразования (O. Speer et al., 2005). Заметное снижение активности мКК перитонеальных лейкоцитов при АКЭ, вероятно, связано с ингибированием образования октамера, сопровождающегося дестабилизацией мембранных структур, процессов энергообмена и их функциональной эффективности.

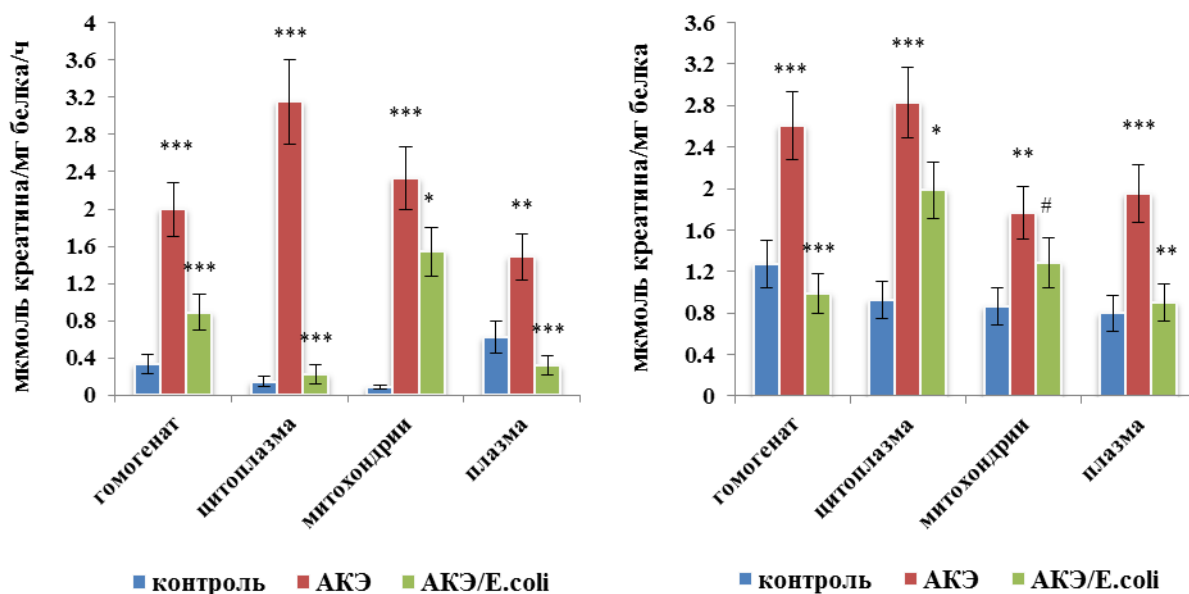
После инфицирования кишечной палочкой активность цКК перитонеальных

лейкоцитов снижается до контрольных значений, и одновременно происходит стимуляция мКК с возрастанием ее активности в 2,9 раза выше нормы. Изменение баланса активностей цКК и мКК в перитонеальных лейкоцитах при введении *E. coli*, по-видимому, является одной из причин, препятствующих мобилизации креатина из них и значительного снижения его уровня в опухолевых клетках, в которых он падает в 4.96 раз, что будет нарушать в них процессы энергообеспечения и роста. В гомогенатах лейкоцитов содержание креатина в 2.8 раза превышает таковое в клетках АКЭ, что также указывает на возможное подавление синтеза транспортера креатина или его ингибирование, нарушающие выкачивание креатина из клеток хозяина в опухолевую ткань.

Картина изменений активности КК и содержания креатина в праймированных лейкоцитах крови при АКЭ несколько отличается от их сдвигов в клеточных компартментах активированных лейкоцитов в брюшной полости мышей (рис. 14). При АКЭ активность КК резко возрастает не только в цитоплазме, но и в митохондриях лейкоцитов крови в 21.3 и 27.6 раза, соответственно по сравнению с контролем, в гомогенатах определяется примерно 6-кратное повышение активности КК, которая возрастает и в плазме крови в 2.5 раза по сравнению со здоровыми животными. Не исключено, что это обусловлено высвобождением КК из лейкоцитов и поступлением ее в кровь, которое происходит при повреждении клеток. Примечательно, что в норме активности цКК и мКК перитонеальных лейкоцитов выше в 3.5 и 2.1 раза таковых в лейкоцитах крови соответственно. При АКЭ наблюдается противоположная картина - активность цКК лейкоцитов крови в 2.2 раза выше цКК перитонеальных лейкоцитов, вследствие АКЭ-индуцированного преимущественного возрастания активности цКК лейкоцитов крови. Еще большие отличия наблюдаются в отношении митохондрий: если в перитонеальных лейкоцитах происходит падение активности мКК, то в лейкоцитах крови она повышается и намного превышает активность мКК лейкоцитов, выделенных из асцитной жидкости.

При АКЭ содержание креатина в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови возрастает в 2,1, 3.1 и 2 раза, а в плазме - 2.5 раза по сравнению с нормой (рис. 14). У контрольных животных уровень креатина в цитоплазме и

митохондриях лейкоцитов крови в 2.9 и 1.9 раза ниже, чем в соответствующих компартментах лейкоцитов брюшной полости. У мышей с АКЭ уровень креатина в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови в 3.4, 1,7 и 1.5 раза выше, чем в соответствующих фракциях лейкоцитов брюшной полости. Креатин может оказывать сильное антиоксидантное действие за счет значительного снижения внутримитохондриальной выработки АФК, а также повышения мембранного потенциала митохондрий и его поддержания (L.E. Meyer et al. 2006). Получение дополнительного креатина с пищей ингибирует TNF- $\alpha$  индуцированный апоптоз в печени трансгенных мышей, экспрессирующих креатинкиназу (E. Natano et al., 2004).



**Рис. 14.** Влияние *E. coli* на активность креатинкиназы и содержание креатина в лейкоцитах и плазме крови мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) креатинкиназа: лейкоциты, гомогенат -  $F=16.5$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=39.3$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=21.2$ ,  $p<0.001$ ; плазма -  $F=10.9$ ,  $p<0.001$ ; б) креатин: лейкоциты, гомогенат -  $F=11.3$ ,  $p<0.001$ ; цитоплазма -  $F=12.5$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=4.0$ ,  $p=0.024$ ; плазма -  $F=8.8$ ,  $p<0.001$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

После инфицирования *E. coli* активность КК снижается в 2.3 раза в гомогенатах лейкоцитов крови, цКК нормализуется, а мКК снижается в 1,5 раза, хотя и значительно

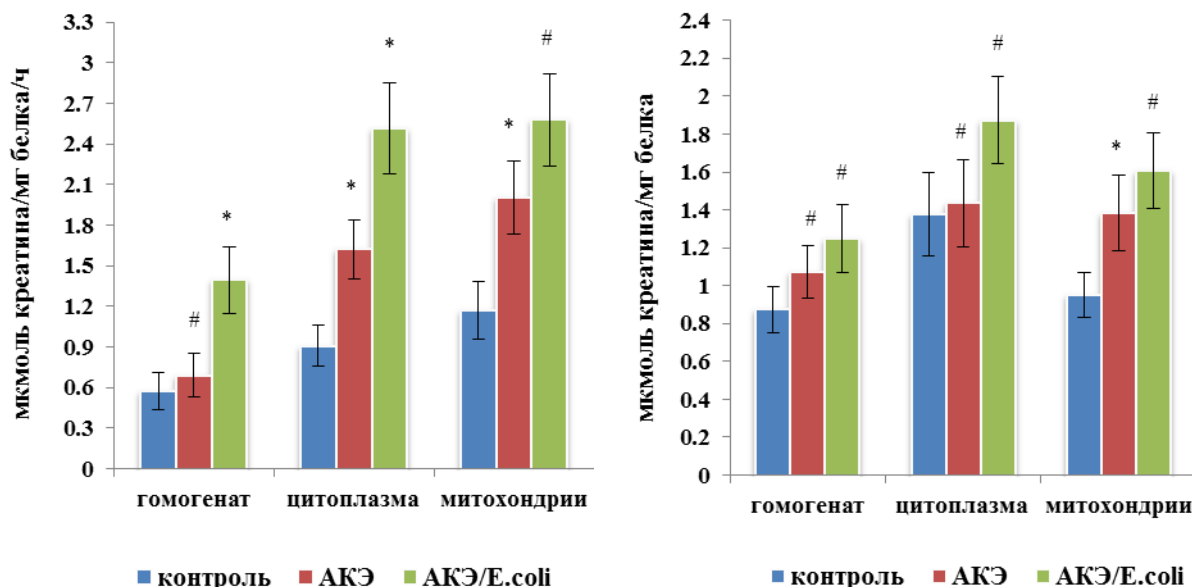


превышает контрольный уровень. Снижается и содержание креатина: в гомогенатах – до контрольных значений, в цитоплазме в 1.4 раза, в митохондриях – изменения недостоверны. В то же время в плазме крови активность КК падает вдвое ниже нормы, и содержание креатина снижается в 2,2 раза по сравнению с нелечеными мышами с АКЭ. Показано, что снижение уровня креатина в плазме крови подавляет опухолевый рост и снижает почти вдвое объем асцитной жидкости (Y. Ohira et al., 1991). Оказывая при АКЭ модулирующее влияние на креатин/КК систему лейкоцитов крови, *E. coli*, препятствует повышению уровня креатина в плазме, стимулирующего прогрессирование опухоли.

Креатин играет особую роль для органов и тканей с высоким потреблением энергии, и прежде всего мозга, который, составляя около 2% от веса тела, потребляет до 20% всей энергии (E. Beard, O. Braissant, 2010). Развитие опухолевого процесса в ЖКТ сопровождается повышением уровня аргинина не только в лейкоцитах брюшной полости и крови, но и в головном мозге, где он может включаться в процессы синтеза креатина (O. Braissant et al., 2010). В ЦНС мышей и крыс креатин *in vivo* поглощается из крови против градиента концентрации, но несмотря на то, что в эндотелии микрокапилляров гематоэнцефалического барьера синтезируется специфический транспортер креатина, SLC6A8, последний отсутствует в астроцитах и их отростках, выстилающих эндотелий, что затрудняет транспорт периферического креатина, синтезируемого в печени и почках (S. Ohtsuki, 2004). В то же время в ЦНС экспрессируются оба фермента биосинтеза креатина, которые, в основном пополняют пул креатина в мозге (O. Braissant, H. Henry, 2008).

На рис. 15 представлены результаты изучения внутриклеточного содержания креатина и активности КК в тканях головного мозга мышей при АКЭ и введении *E. coli*. Не выявлено статистически достоверных изменений в содержании креатина в гомогенатах и цитоплазме клеток мозга мышей-опухоленосителей при сравнении с показателями контрольных животных, и лишь в митохондриях его уровень повышается в 1.5 раза. В то же время, при АКЭ в клетках головного мозга примерно в одинаковой степени - в 1.8 и 1.7 раза возрастают активности цКК и мКК соответственно. При инфицировании кишечной палочкой наблюдается стимулирование активности изоформ КК, с повышением ее в

цитоплазме и митохондриях в 1.6 и 1.3 раза, соответственно по сравнению с мышами-опухоленосителями. *E. coli* не влияет на уровень креатина в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях клеток мозга.



**Рис. 15.** Влияние *E. coli* на активность креатинкиназы и содержание креатина в головном мозге мышей при асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). Результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n=18$ . Постдисперсионный анализ Холм-Сидака при сравнении всех групп: а) креатинкиназа: гомогенат -  $F=5.5$ ,  $p=0.007$ ; цитоплазма -  $F=10.4$ ,  $p<0.001$ ; митохондрии -  $F=6.5$ ,  $p=0.003$ ; б) креатин: гомогенат -  $F=1.58$ ,  $p=0.22$ ; цитоплазма -  $F=1.42$ ,  $p=0.25$ ; митохондрии -  $F=3.57$ ,  $p=0.035$ . Достоверность представлена обозначениями: #  $p>0.05$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

Повышение активности изоформ КК в головном мозге может быть проявлением адаптационных изменений при АКЭ. Еще большее активирование кишечной палочкой системы креатин/КК в головном мозге будет способствовать резистентности клеток при АКЭ, ибо наряду с хорошо изученным эргогенным действием креатина и КФ, они взаимодействуют с фосфолипидами клеточных мембран и протектируют их, препятствуя апоптозу и лизису клеток (M. Tokarska-Schlattner et al., 2012).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Метаболизм L-аргинина и креатина, а также процессы ПОЛ в лейкоцитах брюшной полости и крови, и головном мозге мышей изучали на экспериментальной модели асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), которая широко используется для оценки различных методов лечения онкологических болезней (M. Ozaslan et al., 2011; S. Patyar et al., 2010). В целях иммуностимулирующего воздействия использовался непатогенный штамм *E. coli*, выделенный из фекальной микробиоты здорового человека. Инфицирование мышей *E. coli* вызывает выброс активированными макрофагами фактора некроза опухоли с последующим селективным лизисом опухолевых клеток (N. Fiore et al., 1975). При этом опухоль является наиболее благоприятной средой для *E. coli*, что подтверждается электроно-микроскопическими данными, свидетельствующими о восстановлении ее структуры в очагах опухолевого роста, тогда как в кишечнике с микробом происходят порою необратимые изменения вплоть до образования бесструктурных протопластов (А.А. Агабабова, Л.А. Авакян, 2008). Диапазон действия *E. coli* широк: будучи факультативным анаэробом она действует и в анаэробной некротической зоне опухоли, и за ее пределами (Carswell E.A. et al., 1975). Кишечные палочки являются основными конкурентами условно-патогенной микробиоты в отношении заселения ими кишечника, кроме того они забирают из просвета кишечника кислород, который вреден для полезных бифидо- и лактобактерий (последние - строгие анаэробы), поддерживая таким образом жизнедеятельность индигенной микробиоты, вдобавок *E. coli* вырабатывает ряд необходимых для человека витаминов К, группы В, оказывает влияние на обмен холестерина, билирубина, холина, желчных и жирных кислот, всасывание железа и кальция в ЖКТ млекопитающих (S. Hudault et al., 2001). Ранняя колонизация кишечника непатогенными штаммами *E. coli* стимулирует иммунную систему слизистой оболочки - выработку специфических антител и неспецифических секреторных иммуноглобулинов (R. Lodinová-Zádníková et al., 2003).

Сверхэкспрессия iNOS и гиперпродукция NO макрофагами оказывает эффективное antimикробное действие при инфекциях и наблюдается при АКЭ (С.Я. Проскуряков и др., 2000; M. Nishikawa et al., 2004). В то же время показано, что iNOS/NO вызывает

элиминацию кишечной палочки (D. Chakravorty, M. Hensel, 2003). В наших экспериментах при АКЭ в перитонеальных лейкоцитах также отмечается значительное повышение активности NOS и повышение уровня NO, что должно оказывать влияние на состав микробиоты и *E. coli*, в том числе. Введение же бактерии, возможно поможет в известной степени восстановлению микробиоты, обеспечивающей механизмы иммунной защиты и гомеостаза, и сохранение целостности слизистой кишечника, которые нарушаются при канцерогенезе. Это является областью дополнительного исследования. Отметим, что кишечная палочка влияет на пути превращения аргинина ферментами организма хозяина без участия собственных аргиназы и NO-синтазы, так как она не экспрессирует эти ферменты (С.Ю. Филиппович, 2010; P. Das et al., 2010).

Через 2 дня после трансплантации АКЭ асептическая одноразовая обработка поверхности глазного яблока и полости рта мышей взвесью клеток *E. coli*, приводит к тому, что на 11-й день прививки опухоли бактерия в основном сосредотачивается в асцитной жидкости, хотя появляется также в крови и мозге. Инфицирование кишечной палочкой продлевает среднее время выживаемости животных на 75 %, и на 11-й день после прививки АКЭ снижает примерно втрое объем асцитной жидкости, с уменьшением веса животных. Результаты других авторов (K. Gambashidze et al., 2012) показали, что при использовании комбинированного препарата доксорубицина, циклофосфида и фторурацила в сочетании с фаго-, и термолизатами *E. coli* повышается эффективность химиотерапии, а именно: продлевается время жизни мышей с АКЭ с достижением 80-90% регрессии опухоли, а у 13% животных – на 65-69 день лечения наблюдается полное ее исчезновение при отсутствии побочных эффектов.

Развитие опухоли определяется не только свойствами злокачественных клеток, но и фенотипом инфильтрующих опухоль и взаимодействующих с нею лейкоцитов, которые могут привести как к разрушению опухоли, так и стимулированию ее роста, инвазии тканей и метастазам (С.М. Diaz-Montero et al., 2009; С.Е. Lewis, J.W. Pollard, 2006). Растворимые факторы, производимые опухолевыми клетками, привлекают моноциты, которые контактируя с ними развиваются в особый тип опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ), сходных с макрофагами второго типа активации, обладающими

противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами (S. Gordon, P.R. Taylor, 2005; A. Mantovani et al., 2002). Различные комбинации факторов и последовательность их воздействия приводят к разнообразию макрофагальных фенотипов: макрофаги, обработанные IFN- $\gamma$  за несколько часов до стимуляции липополисахаридом, способны производить большие количества TNF- $\alpha$  и изменять ответ на IL-10 (M.P. Hayes et al., 1995; C. Herrero et al., 2003). Макрофаги, участвующие в стимуляции воспалительной реакции, способны ответить на противовоспалительные сигналы и понизить свой воспалительный потенциал (A.N. Gratchev et al., 2006). Гетерогенность и функциональная пластичность макрофагов и прочих иммунных клеток, а также разная степень их зрелости осложняет их дифференцированное изучение, и поэтому в асцитной жидкости и крови исследовалась вся совокупность мононуклеаров и гранулоцитов.

Опухолевая агрессия вызывает увеличение интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) и подавление антиоксидантной системы (АОС) организма, сопровождающиеся развитием иммунодефицитного состояния (В.В. Лебедев, 2004). На 11-й день после трансплантации клеток АКЭ, развитие оксидативного стресса проявляется на уровне активирования процессов ПОЛ в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, и клеток головного мозга. Во всех исследуемых фракциях возрастает содержание основного вторичного продукта ПОЛ, малонового диальдегида (МДА), и его продукция *in vitro* в модельной системе неферментативного аскорбат-зависимого ПОЛ, индуцируемого двухвалентным железом. Активирование в крови и мозге процессов ПОЛ при АКЭ свидетельствует о включении сигнальных механизмов и системном характере изменений при канцерогенезе, которые, как выяснилось, проявляются на субклеточном уровне. При этом в ЦНС сигналы могут поступать как через кровь, так и блуждающий нерв, обеспечивающий двунаправленную связь между кишечником и мозгом (S.H. Rhee et al., 2009). В то же время при АКЭ процессы ПОЛ в тканях головного мозга менее выражены, по сравнению с кровью и брюшной полостью.

В процессе роста асцитных опухолей в циркулирующей крови животных увеличивается число лейкоцитов, которые также усиленно продуцируют АФК, и, мигрируя

в очаг опухоли, выделяют медиаторы воспаления, вызывающие оксидативный стресс в близлежащих клетках (A. Szuster-Ciesielska et al., 2006). На различных линиях опухолевых клеток продемонстрирована их способность генерировать АФК (А.В. Пескин, 1977). При АКЭ вышеуказанные процессы стимулируют процессы ПОЛ в субклеточных фракциях перитонеальных лейкоцитов, подавляя их функциональную активность. Отметим, что ПОЛ вызывает образование липидных рафтов (микродоменов) в нативных клеточных мембранах, что отражается на их функционировании (A.G. Yuzyan, F.S. Cohen, 2006). Наряду с этим МДА образует шиффовы основания с аминокруппами белков, образуя нерастворимые липид-белковые комплексы, или пигменты изнашивания (W.B. Gerritsen et al., 2006). Возрастание продуктов липопероксидации подавляет активность АОС, в частности, воздействуя на конформацию антиоксидантных ферментов с уменьшением их сродства к субстратам и/или кофакторам.

Примечательно, что на 11-й день трансплантации АКЭ, в опухолевых клетках содержание МДА и его образование *in vitro* были примерно в 2 и 13 раз ниже, соответственно по сравнению с гомогенатами перитонеальных лейкоцитов. Возможно, это обусловлено высокой активностью АОС опухолевых клеток на этой стадии развития асцитной опухоли, в то время как в субпопуляциях лейкоцитов брюшной полости она подавлена (Л.П. Смирнова, И.В. Кондакова, 2004). Предполагается, что именно высокая активность антиоксидантных ферментов в опухолевых клетках является одной из причин их устойчивости к оксидативному стрессу и резистентности к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит свободнорадикальный механизм (T. Oberley et al., 1995).

Впервые выяснилось, что введение кишечной палочки сопровождается снижением содержания МДА, подавляется и аскорбат-зависимый прирост МДА *in vitro* в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов крови и брюшной полости при АКЭ. Интересно, что в головном мозге бактерия в меньшей степени подавляет процессы ПОЛ что, вероятно, обусловлено более высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в мембранах нервных клеток, увеличивающих вероятность индукции ПОЛ в присутствии АФК (J. Emerit et al., 2004). Однако, не исключено, что в ЦНС включаются ПОЛ-зависимые

адаптационные и защитные механизмы, активируемые в ответ на опухолевый процесс в ЖКТ, и какое влияние на них оказывает *E. coli*, еще предстоит выяснить.

Таким образом, введение *E. coli* снижает процессы ПОЛ в лейкоцитах, что свидетельствует об ослаблении в них процессов оксидативного стресса, и иммуносупрессии, вызванных малигнизацией тканей. Кроме того, при инфицировании кишечной палочкой в клетках АКЭ наблюдается повышается образование МДА *in vitro*. Кластеризация опухолевых клеток липидными рафтами снижает их резистентность к гибели от лиганд-индуцированного апоптоза, и представляется возможной альтернативой для менее повреждающей и более эффективной стратегии уничтожения опухолевых клеток (B. Rajak et al., 2008).

Одним из механизмов подавления ПОЛ и других АКЭ-индуцированных процессов СРО при введении бактерии может быть антиоксидантная активность полиаминов самой *E. coli*, которая, как уже отмечалось, складывается из перехвата радикалов и активирования ими транскрипции защитных белков (А.Г. Ткаченко, М.В. Федотова, 2007). Кроме того, *E. coli* содержит локализованные в цитозоле конститутивную и индуцибельную изоформы аргининдекарбоксилазы, которая продуцирует агматин, проявляющий антиоксидантные свойства (М.А. Arndt et al., 2009; S. Regunathan, D.J. Reis, 2000). Отметим, что у мышей и пациентов с раком ингибирование продукции АФК иммунными клетками аннулирует их супрессорное действие (S. Kusmartsev et al., 2004; A.J. Montero et al., 2012).

Впервые при АКЭ выявлено возрастание содержания аргинина в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, и клеток головного мозга. Одной из причин повышения содержания аргинина может быть усиление распада белков в условиях оксидативного стресса при АКЭ, о чем свидетельствует заметное активирование процессов ПОЛ в гомогенатах и основных клеточных компартментах лейкоцитов. Возрастание уровня аргинина влияет на состояние ионного баланса, оказывая гиперкалемический эффект, характерный для синдрома распада опухоли, и может стимулировать посттрансляционное аргинилирование белков, ускоряя процесс их убиквитинизации и последующего протеолиза (K. Takada et al., 1994; M. Yu et al., 1994).

Однако, не исключается и иной путь повышения содержания аргинина, если при АКЭ происходит стимулирование его эндогенного синтеза вследствие активирования таких энзимов цикла мочевины, как орнитинкарбамоилтрансферазы (ОКТ), аргининсукцинатсинтетазы (АСС) и аргининосукцинатлиазы (АСЛ) (S.M.Jr. Morris, 2007). Показано, что некоторые типы опухолей такие, как рак яичников человека, проявляют высокую зависимость от повышенной экспрессии АСС (P.W. Szolsarek et al., 2007).

Повышение содержания аргинина на 11-й день трансплантации АКЭ, по-видимому, является одной из причин активирования ферментов, метаболизирующих его: изоформ аргиназы (за исключением А1, которая подавляется в мозге), локализованных в цитоплазме (А1) и митохондриях (А2), и синтазы оксида азота (NOS), представленной в этих клеточных компартментах конститутивными изоформами NOS и индуцибельной (iNOS), которая функционирует в рамках врожденной иммунной системы (W.K. Alderton et al., 2001). Все изоформы NOS представлены в циркулирующих нейтрофилах лимфоцитах, нестимулированных моноцитах, а также в клетках головного мозга (W.K. Alderton et al., 2001; S.S. Greenberg et al., 1998; T. Wallerath et al., 1997). Исходя из вышесказанного, продукция NO в цитоплазме или митохондриях исследуемых клеток зависит от проявления совокупной активности вышеперечисленных форм NOS, которая исследовалась при АКЭ. Субклеточная активность исследуемых ферментов коррелировала с уровнем их продуктов: орнитина (аргиназная реакция), АФА и цитруллина (NO синтазная реакция), что косвенно подтверждает стимулирование вышеуказанных обменных путей.

Активирование процессов ПОЛ при АКЭ также может выступать в роли триггера для аргиназы. Недавно выяснилось, что изоформа А1 индуцируется в мышечных макрофагах окисленными липопротеинами (A. Gallardo-Soler et al., 2008). Оксидативный стресс также стимулирует синтез изоформы А1 изоформы (S. Matthiesen et al., 2008). Нами получены данные, что на фоне возрастания ПОЛ в терминальной стадии АКЭ в перитонеальных лейкоцитах наблюдается возрастание активности обеих изоформ аргиназы, еще больше они активируются в лейкоцитах крови. Примерно равное распределение аргиназной активности в цитоплазме и митохондриях всех исследуемых



клеток контрольных животных изменяется при АКЭ, а именно: в лейкоцитах брюшной полости активность A1 почти в вдвое выше A2, тогда как в лейкоцитах крови - противоположная картина, в них активность A2 превышает A1 в 2 раза; в клетках мозга A2 возрастает втрое, по сравнению с контролем, при одновременном резком снижении до незначительного уровня активности A1. Таким образом, в изоферментном спектре аргиназы сдвиг в сторону доминирования A1 наблюдается лишь в отношении лейкоцитов брюшной полости, вероятно отчасти, в силу особенностей их микроокружения, представленного асцитной жидкостью, со взвешенными в ней опухолевыми клетками. В случае лейкоцитов крови и клеток мозга сигнальные механизмы включают прямо противоположное смещение – активирование A2, которое в митохондриях будет способствовать снижению концентрации аргинина и ингибированию активности NOS, влияя на прочие связанные метаболические превращения. Введение кишечной палочки снижает активность A1 и нормализует таковую A2 в перитонеальных лейкоцитах, в то время как в лейкоцитах крови она вызывает снижение активности A2, активируя A1 изоформу так же, как и в клетках мозга, в которых последняя возрастает и более, чем на порядок превышает норму. Таким образом, при инфицировании происходят изменения в сторону восстановления внутриклеточного баланса активности аргиназ, и необходимы дальнейшие исследования для выяснения его роли в функционировании лейкоцитов, в частности влияния на фенотипические сдвиги.

Повышение содержания аргинина при АКЭ может способствовать активированию прежде всего iNOS, которая в большей степени зависит от концентрации аргинина, поскольку продуцирует NO в течение длительного времени, стойко повышая его уровень в иммунных клетках и запуская механизмы иммуносупрессии (C.J. Lowenstein, E. Padalko, 2004). Диетические добавки L аргинина повышают концентрацию кофактора NOS, тетрагидробиоптерина, с последующим стимулированием синтеза NO в клетках эндотелия, улучшая сосудистую функцию (R. Kohli et al., 2004). Известно, что L-аргинин и в еще большей степени тетрагидробиоптерин способствует сборке активных димеров изоформ NOS и стабилизации их структуры (R.H. Foxton et al., 2007). Сборка димеров является лимитирующим фактором для iNOS: на RAW 264.7 линии макрофагов мышей

показано, что лишь 25% синтезированных субъединиц фермента собираются в активный димер, и этот процесс зависит от L-аргинина, тетрагидробиоптерина, и включения гема в молекулу фермента, которое ингибируется iNOS/NO (Q.A. Albasri, D.J. Stuehr, 1996). Вдобавок, аргинин и IL-13 обеспечивают нормальное протекание трансляции iNOS в воспалительных макрофагах (S. El-Gayar et al., 2003).

В перитонеальных лейкоцитах контрольных животных общая активность NOS в цитоплазме приблизительно вдвое выше таковой в митохондриях, и при АКЭ это соотношение не меняется, так как активности NOS возрастают примерно в равной степени этих клеточных компартментах. Введение *E. coli* полностью нивелирует эти различия, так как если в цитоплазме происходит нормализация активности фермента, то в митохондриях она не влияет на NOS, возможно это связано с селективным ингибированием цитоплазматической iNOS, что необходимо выяснить. При этом меняется баланс внутриклеточной продукции NO, что будет отражаться на связанных процессах, в митохондриях в частности это касается возможного NOS-опосредуемого ингибирования формы A2, которое наблюдалось в экспериментах.

В лейкоцитах крови контрольных животных соотношение активностей NOS в цитоплазме и митохондриях примерно равны так же, как и у мышей с АКЭ, поскольку в них, имеет место сходное повышение NOS. С введением бактерии общая активность NOS в цитоплазме повышается еще больше и в 2.4 раза выше таковой в митохондриях, в которых она напротив - вдвое снижается, вероятно за счет устойчивого ингибирования конститутивных изоформ NOS, продуцируемым NO, что будет смягчать NO-опосредуемые негативные процессы, связанные с ингибированием респираторной цепи, ферментов цикла трикарбоновых кислот и таким образом препятствовать дисфункции митохондрий. Отметим, что АКЭ-индуцированное активирование iNOS сопровождается перепродукцией NO, избыток которого образует железонитрозильные комплексы ( $Fe^{2+}$ -NO), подавляя активность всех известных форм NOS по механизму отрицательной обратной связи, который обеспечивает их саморегуляцию и предупреждает отрицательные последствия перепродукции NO (W.K. Alderton et al., 2001). Однако, при этом iNOS ингибируется слабо, так как в ней восстановленный комплекс  $Fe^{2+}$ -NO легко переходит в конечный

продукт реакции  $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ , а nNOS образуется в прочной  $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$  форме ингибиторного комплекса (H.M. Abu-Soud et al., 1995; Q.A. Albacri, D.J. Stuehr, 1996). Подавление активности cNOS связывается также с ингибирующим нитрозилированием фермента пероксинитритом (B.M. Gaston et al., 2003).

Интересно, что соотношение активностей NOS в цитоплазме и митохондриях клеток головного мозга контрольных животных, как и в перитонеальных лейкоцитах равнялось 2:1, но после трансплантации АКЭ вследствие драматического возрастания активности NOS в цитоплазме при неизменной митохондриальной, соотношение повышается примерно до 11:1. *E. coli*-обработка снижает цитоплазматическую активность NOS, не влияя на таковую в митохондриях, благодаря чему соотношение активностей NOS в цитоплазме и митохондриях снижается до 4.4:1, возможно, связанное с изменением в этих компартментах распределения активностей индуцибельной и конститутивных изоформ NOS. Субклеточные сдвиги активности NOS будут отражаться на внутри- и внеклеточной продукции NO, по-разному влияющей на стресс-ответ и апоптоз, что ранее было продемонстрировано на макрофагах, подвергнутых воздействию биологических или физических факторов (Е.В. Малышева и др., 2007).

Вышеуказанные сдвиги будут отражаться на протекании и взаиморегуляции внутриклеточных процессов, сопряженных с аргиназой и NOS и их метаболитами. Первый интермедиат синтеза NO,  $\text{N}^G$ -гидрокси-L-аргинин является мощным эндогенным ингибитором аргиназ, и его накопление в iNOS-экспрессирующих клетках вызывает подавление их активности (J.L. Boucher et al., 1999). В свою очередь, A1 может подавлять активность iNOS не только через истощение внутриклеточного пула аргинина (M. Mori, 2007; S.M.Jr. Morris, 2012), а через образование мочевины, которая ингибирует самосборку мономеров iNOS в активный димер, снижая ее активность со стимулированием пролиферации макрофагов (T. Moeslinger et al., 1999). Вероятнее всего в терминальной стадии АКЭ действует этот механизм, а не через снижение уровня аргинина, который, как выяснилось, возрастает в клеточных компартментах.

При АКЭ раннее активирование системы NOS (iNOS), индуцирует включение аргиназы, которая должна противостоять гиперпродукции NO и повреждающему

действию АФА (*vide infra*). Впервые при АКЭ в перитонеальных лейкоцитах выявлено модулирующее влияние кишечной палочки на субклеточное метаболизирование аргинина изоформами аргиназы и NOS. Возможно это связано с тем, что спермин *E. coli* может ингибировать трансляцию iNOS в тканях хозяина (F.I. Bussiere et al., 2005). Аргининдекарбоксилаза *E. coli*, продуцируя агматин может ингибировать нейрональную NOS и подавлять активность iNOS (A. Halaris, J. Plietz, 2003). Впервые выявлено, что кишечная палочка наряду с ингибированием активности NOS вызывает снижение уровня продуктов ее реакции, АФА и цитруллина в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов, что будет препятствовать разрушительным процессам оксидативного стресса и способствовать восстановлению их функциональной активности. Снижение продукции оксида азота с одной стороны снижает проницаемость перитонеальных сосудов, что будет способствовать замедлению скорости накопления асцитной жидкости в полости брюшины, а с другой – тормозит неоваскуляризацию и ангиогенез, необходимые для роста и метастазирования опухоли.

Выброс агматина, продуцируемого *E. coli*, в асцитную жидкость и его проникновение в клетки АКЭ может оказывать антипролиферативное действие, в частности, подавляя в них синтез полиаминов (L.D. Gamble et al., 2012). Антинеопластическая роль агматина основана на ингибировании орнитиндекарбоксилазы через подавление ее трансляции и стимулирование экспрессии антизима орнитиндекарбоксилазы, постратрансляционно ингибирующего фермент (M. Isome et al., 2007; C. Wolf et al., 2007). При этом агматин оказывает цитостатическое действие в пролиферирующих раковых клетках, так как избирательно поглощается ими, и не вызывает апоптоз в нетрансформированных непролиферирующих клетках (G. Gardini et al., 2003; M. Isome et al., 2007).

Введение *E. coli* сопровождается полным подавлением аргиназной активности в клетках АКЭ. Отметим, что ингибиторы аргиназы существенно подавляют рост клеток в клеточных линиях с высокой активностью А2 (D.J.Jr. Tate et al., 2012). Экспрессия аргиназы в первичных очагах развития рака человека, мышей, а также клеточных линий опухолевых клеток связана с ее участием в синтезе полиаминов, которые стимулируют

рост опухоли, а также с подавлением ею NO-опосредуемой цитотоксичности в отношении опухоли (D.J. Jr. Tate et al., 2008; D.J. Jr. Tate et al., 2012). Дефицитные по аргиназе мыши характеризуются падением уровня орнитина, полиаминов и гуанидиновых соединений (J.L. Deignan et al., 2007).

Введение *E.coli* при АКЭ в определенной степени модулирует субклеточную аргиназную активность и ферментативную продукцию NO в лейкоцитах брюшной полости, и это предпочтительнее, чем прямое ингибирование аргиназы, которое может сопровождаться подавлением цикла мочевины в печени и ассоциированной с ним гипераммонемии. В качестве иного подхода, используется и нитроаспирин (NCX 4016), который, высвобождая NO, ингибирует iNOS по принципу обратной связи и опосредованно подавляет аргиназу, воздействуя на активирующие ее пути, и корректирует связанную с ними иммунную дисфункцию Т-клеток, благодаря чему вызывает регрессию карциномы толстой кишки мышей (C. DeSanto et al., 2005).

Таким образом, при инфицировании кишечной палочкой ее преимущественное концентрирование в брюшной полости обеспечивает непосредственный контакт бактерии с перитонеальными лейкоцитами и клетками АКЭ (А.А. Агабабова и др., 2013). Это обуславливает специфику влияния бактерии, которую мы обсудили выше. Эффекты введения *E. coli*, наблюдаемые в крови и мозге, скорее всего опосредованны, и могут проявляться через ЛПС-индуцируемые сигнальные механизмы, что подтверждается полученными нами данными об активировании изоформы A1 и цитоплазматической NOS при инфицировании. В норме ЛПС стимулирует экспрессию и активность iNOS и изоформ аргиназы в перитонеальных макрофагах мышей и крыс (A. Hrabák et al., 2006). При введении ЛПС мышам вначале индуцируются A2 и iNOS, а также транспортер катионных аминокислот, CAT-2 и возрастает мРНК ACC и орнитиндекарбоксилазы в легких и селезенке, и только позже A1 в перитонеальных макрофагах и легких (I.M. Corraliza et al., 1995; Salimuddin et al., 1999). Макрофаги мышей конститутивно экспрессируют CAT-1, а CAT-2 индуцируется при их классическом (IFN- $\gamma$ ) или альтернативном (IL-4, IL-10) активировании, причем усиление катаболизма аргинина при индукции iNOS и аргиназы происходит за счет координированного повышения поглощения аминокислоты этими

клетками (P.C. Rodriguez et al., 2008; A. Yeramian et al., 2006). В условиях *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что главная роль CAT2 - оптимизировать продукцию NO в классически активированных макрофагах мышей, и лимитировать аргиназную активность в их альтернативном типе, включаясь в регуляцию иммунитета, тогда как конститутивный транспортер аргинина CAT1 обеспечивает поддержание активности аргиназы (R.W. Thompson et al., 2008). Вносит ли свой вклад активирование при АКЭ транспортеров аргинина в устойчивое повышение содержания аминокислоты в крови и мозге, на которое не оказывает влияние кишечная палочка также предстоит выяснить.

Митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) опосредует ЛПС-индуцированную экспрессию iNOS, а МАРК фосфатаза-1 переключает метаболизм аргинина с продукции NO на образование орнитина после введения ЛПС RAW264.7 макрофагам, хотя и сверхэкспрессия МАРК фосфатазы-1, равно как ее дефицит не оказывает существенного влияния на экспрессию изоформ аргиназы, но влияет на экспрессию iNOS (L.D. Nelin et al., 2007). Возможно и увеличение числа CD11b+IL-4  $\alpha$ 1 рецепторных МСК, которые производят Th1 и Th2 цитокины (IFN- $\gamma$  и ИЛ-13), индуцирующие аргиназу и NOS (G. Gallina et al., 2006). По-видимому, при АКЭ подобные эффекты ЛПС/*E. coli* проявляются в лейкоцитах крови, вызывая еще большее возрастание цитоплазматической активности NOS и A1, в которое может вносить свой вклад iNOS. Посттрансляционная модификация изоформы A1 через iNOS-опосредованное S-нитрозилирование фермента по 303 цистеиновому остатку стабилизирует тример аргиназы и в 6 раз снижает  $K_m$  в отношении аргинина – у изоформы A2 подобного эффекта не наблюдается, так как в ней отсутствует цистеин, соответствующий 303 цистеиновому остатку A1 (L. Santhanam et al., 2007). Еще одна причина, по которой наблюдаются различия в проявлении активности разных изоформ аргиназы.

В то же время инфицирование кишечной палочкой вызывает мощное стимулирование A1 в клетках головного мозга, которое сопровождается ингибированием тотальной активности NOS в цитоплазме, в отличие от лейкоцитов крови, в которых *E. coli* вызывает наряду с активированием A1 почти втрое, одновременное возрастание в цитоплазме тотальной активности NOS, по сравнению с неинфицированными

животными, что подтверждается ассоциированным повышением уровней АФА и цитруллина. Разновременная экспрессия разных изоформ аргиназы и NOS так же, как и разное проявление их взаиморегуляции в зависимости от типа клеток и тканей, влияет на внутриклеточный баланс их активностей, отражаясь на функционировании.

Нарушение двунаправленного взаимодействия между кишечной микрофлорой и нервной системой могут быть вовлечены в патофизиологию острых и хронических желудочно-кишечных заболеваний (S.M. O'Mahony et al., 2011). Показано, что стресс-гормоны способствуют росту непатогенных штаммов *E. coli* через взаимодействие с такими катехоламинами хозяина, как адреналин и норадреналин (P.P. Freestone et al., 2002). Ежедневные внутрибрюшинные инъекции мышам дофамина в течение двух недель снижает суммарное количество клеток в 10 и 30 раз и уменьшает их диаметр в асцитной карциноме Эрлиха на 27% и на 59% соответственно по сравнению с контролем (Д.А. Мошков и др., 2012). Система NOS/NO активируется в головном мозге при АКЭ может влиять на рост *E. coli* в брюшной полости, поскольку регулирует механизмы выброса и обратного захвата нейротрансмиттеров норадреналина и дофамина в нейронах, а далее может быть задействована прямая связь между ЖКТ и мозгом через блуждающий нерв (А.А. Сосунов, 2000; S. Grenham, 2011).

При АКЭ в цитоплазме клеток головного мозга наблюдается возрастание активности NOS в 4 раза, которое сопровождается падением A1, а в митохондриях при отсутствии изменений в активности NOS втрое повышается A2. Введение *E. coli* практически не влияет на субклеточное содержание аргинина, которое остается повышенным, однако стимулирует в гомогенатах и цитоплазме аргиназную активность, которая заметно возрастает в 11.5 и 14.7 раза соответственно по сравнению с нормой, при одновременном снижении в них в 8.1 и 2.5 раза активности NOS, в то время как в митохондриях небольшое повышение активности A2 не влияет на NOS. Различия в проявлении активности A1 и A2 изоформ зависят от субклеточных сдвигов ферментативной продукции NO, и наоборот изменения в аргиназной активности будут отражаться на функциях изоформ NOS в клетках головного мозга.

Высокая степень достоверной положительной корреляции между содержанием продуктов NO синтазной реакции, стабильных метаболитов NO и L-цитруллина в гомогенатах, цитоплазме и митохондриях клеток головного мозга, подтверждает активирование системы NOS/NO. Увеличение уровня биодоступного NO, вызванное снижением продукции АФК при обработке *E. coli*, может опосредованно участвовать в механизмах подавления iNOS. Так, в цитокин-стимулированных гепатоцитах крыс 18-кратное повышение экспрессии iNOS подавляется донорами NO (S-нитрозо-N-ацетил-D,L-пенициламин и V-PYRRO/NO) и восстанавливается его скавенджерами (эритроциты) (K. Chang et al., 2004). Подобный эффект, проявляется в наших экспериментах в виде снижения общей активности NOS в цитоплазме клеток мозга и имеет защитное значение, поскольку на фоне активирования СРО при АКЭ длительная генерация NO в результате функционирования iNOS, сопровождается синтезом ПН, оказывающего повреждающее действие в клетках и тканях (M. Gutowski, S. Kowalczyk, 2013). Примечательно, что ПН может вызывать выброс аргинина из астроцитов и одновременно стимулировать в глии Cat1 систему транспорта аргинина в нейроны (V. Vega-Agapito et al., 2002). Не исключено, что ПН вносит свой вклад в устойчивое повышение аргинина, обнаруженное нами в клеточных компартментах тканей головного мозга при АКЭ и дальнейшие исследования покажут каким образом они скажутся на механизмах сигнальной трансдукции. В то же время повышенная активность NOS в цитоплазме лейкоцитов крови и клеток головного мозга будет способствовать уничтожению бактерии в крови и мозге, предупреждая ее негативное влияние.

Большая часть эндогенного аргинина расходуется на синтез креатина, который является субстратом креатинкиназной ферментативной системы, ответственной за депонирование и транспорт энергии в виде креатинфосфата (КФ) от источников ее образования к местам использования (M.M.Jr. Sidney, 2004). Взаимопревращение КФ - креатин 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). Системное повышение концентрации аргинина выявленное при АКЭ, в частности более



чем 10 кратное увеличении его уровня в плазме крови по сравнению с контролем отражается на картине метаболизма креатина, который в основном активируется в исследуемых клетках. В тоже время если в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов активность КК возрастает приблизительно в 6 и 3 раза, соответственно, то в митохондриях она снижается в 5 раз по сравнению с контролем. Не исключено, что обнаруженное повышение уровня цитоплазматического аргинина в перитонеальных лейкоцитах может оказывать ингибирующее воздействие на механизмы активного поглощения креатина митохондриями, как это продемонстрировано в печени крыс (M. Dolder et al., 2003). Вдобавок, при АКЭ повышается продукция NO, избыток которого нитрозилирует сульфгидрильные групп креатинкиназы и подавляет ее активность (M.P. Murphy, 1999). Так, экзогенный аргинин NOS/NO-зависимо ингибирует цКК в мозжечке крыс (D. Delwing et al., 2007). Исходя из этого, влияние кишечной палочки на креатин/КК систему, может быть опосредовано ее воздействием на ферменты метаболизма аргинин.

Подавление мКК перитонеальных лейкоцитов при АКЭ может иметь негативные последствия, так как мКК взаимодействуя с фосфолипидами мембран митохондрий, стабилизирует контактные участки между внутренней и внешней мембранами и поддерживает локальные метаболитные каналы, предотвращая открытие митохондриальной поры, активирование каспаз и гибель клетки (H. Lenz et al., 2007). Отметим, что мКК существует в виде двух взаимопревращаемых олигомерных форм – димера и октамера (68 и 32 % соответственно), находящихся в состоянии динамического равновесия, тогда как цКК представлены только димерной формой (T. Schnyder et al., 1994). Показано, что именно октамер мКК способствует образованию и укреплению контактных сайтов внутренней и внешней мембран, укрепляя их структуру и повышая резистентность, обеспечивая таким образом нормальное протекание процессов энергообразования в митохондриях (O. Speer et al., 2005). Активирование СРО при ишемии головного мозга изменяет соотношение димер/октамер: кратковременная (30 мин) ишемия смещает соотношение в сторону образования димера, тогда как долговременная (18 ч) приводит к росту доли октамера (Е.И. Ерлыкина, Т.Ф. Сергеева, 2010). Кроме того, мКК во внешнем компартменте митохондрий тесно связана с экспортом АТФ посредством

транспортера или носителя адениннуклеотида и, влияет на синтез АТФ, поддерживая активный АТФ/АДФ обмен, благодаря связи мКК с  $F_0F_1$ -АТФ-азами, регулирующими активность дыхательной цепи и предотвращающими излишний поток электронов (АДФ, продуцируемый именно мКК), благодаря чему снижается образование АФК в митохондриях (U. Schlattner et al., 2011). Вдобавок, ресинтез АТФ в креатинкиназной реакции удаляет АДФ и  $H^+$ , продукты гидролиза АТФ, с одной стороны препятствуя закислению внутриклеточной среды, а с другой, обеспечивая высвобождение  $P_i$ , конечного продукта АТФазы, который является метаболическим сигналом (T. Wallimann et al., 2011). В клетках АКЭ активность КК не детектировалась, что совпадает с данными других исследователей о том, что при АКЭ (а также саркоме и саркоме 180) в опухолевых клетках происходит сильное подавление креатин/КК системы и повышается экспрессия и активность ферментов синтеза креатина (S. Vera et al., 2008). Согласно данным авторов при саркоме происходит возрастание экспрессии и активности А2, сопровождающееся повышением образования орнитина, а также повышением базального уровня гуанидиноацетата и креатинина. На терминальной стадии развития в гомогенатах клеток АКЭ нами выявлялась стимулируемая основными рН аргиназная активность, но ее вклад в эти процессы требует дополнительного изучения.

Одновременно, падает содержание креатина в гомогенатах и клеточных компартментах перитонеальных лейкоцитов, при этом в клетках АКЭ уровень креатина вдвое превосходит таковой в гомогенатах лейкоцитов, что опосредованно свидетельствует в пользу АКЭ-индуцированного транспорта креатина и его активного оттока в опухолевые клетки. Ранее было показано, что несмотря на изначально низкий уровень креатина в клетках АКЭ и саркомы 180, они могут поглощать и высвобождать значительные количества креатина, благодаря возрастанию уровня транспортера креатина, обеспечивающего мобилизацию креатина из тканей хозяина в клетки АКЭ против более высокого градиента концентрации (Y. Ohira et al., 1991).

При АКЭ в лейкоцитах крови активность КК резко возрастает не только в цитоплазме, но и в митохондриях, а в гомогенатах определяется примерно 6-кратное повышение общей активности КК, по сравнению с контролем, и одновременно

повышается активность КК в плазме крови. Не исключено, что это обусловлено высвобождением КК из лейкоцитов и поступлением в кровь, которое происходит при повреждении клеток. Подобное повышение активности мКК в сыворотке крови наблюдается у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой преимущественно с рецидивами (Y. Soroida et al., 2012). Отметим, что при трансплантации клеток АКЭ у мышей также развивается гепатоцеллюлярная карцинома (А.А. Агабабова и др., 2013). Показано, что креатин опосредованно оказывает сильное антиоксидантное действие за счет значительного снижения внутримитохондриальной выработки АФК, а также повышения и поддержания мембранного потенциала митохондрий (L.E. Meyer et al., 2006). Введение *E. coli* стимулирует активность мКК перитонеальных лейкоцитов, и препятствует оттоку креатина из клеточных компартментов в клетки АКЭ. Обработка кишечной палочкой стабилизирует и креатинкиназную систему в крови и мозге, оказывая антиапоптотическое действие, и снижает уровень креатина в плазме крови, подавляя рост АКЭ и снижая объем асцитной жидкости (Ohira Y., 1991). Транспорт периферического креатина в клетки ЦНС затруднен, поскольку специфический транспортер креатина, SLC6A8 хотя и синтезируется эндотелием микрокапилляров ГЭБ, но отсутствует в астроцитах и их отростках, выстилающих эндотелий (M. Tachikawa et al., 2004). По-видимому, пул креатина в мозге в основном пополняется за счет биосинтеза креатина в нем самом (наличие ферментов биосинтеза креатина подтверждено у человека и мыши) (O. Braissant et al., 2010). При АКЭ в клетках головного мозга примерно в одинаковой степени возрастают активности цКК и мКК, и обработка кишечной палочкой стимулирует изоформы КК в цитоплазме и митохондриях, в которых достоверно повышается содержание креатина. Показано, что в ЦНС креатин *in vivo* поглощается из крови мышей и крыс против градиента концентрации (S. Ohtsuki et al., 2004). Повышение активности изоформ КК в головном мозге может быть проявлением адаптационных изменений в ответ на малигнизацию в ЖКТ, и еще большее активирование системы креатин/КК при инфицировании кишечной палочкой будет оказывать антиапоптотическое действие, повышая резистентность клеток при АКЭ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На вторые сутки после трансплантации двухмесячным самцам белых мышей клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) одноразовая неинвазивная обработка поверхности глаз и полости рта животных непатогенным штаммом *E. coli* 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 уровня L-аргинина в цитоплазме и митохондриях лейкоцитов брюшной полости и крови, и тканях 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 содержание последнего вдвое выше, чем в лейкоцитах.

Впервые в системе ЖКТ-кровь-мозг показано, что инфицирование *E. coli* при АКЭ сопровождается изменениями во внутриклеточном метаболизме аргинина и креатина. Сосредотачиваясь в брюшной полости *E. coli* влияет на микроокружение опухолевых и иммунных клеток, локализованных в асцитной жидкости: в гомогенатах и цитоплазме перитонеальных лейкоцитов снижаются 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 влияние *E. coli* с вовлечением ЛПС, что подтверждается данными о стимулировании A1 и NOS в цитоплазме лейкоцитов крови, а также обеих изоформ аргиназы и цитоплазматической NOS в клетках мозга. Высокая активность NOS будет ограничивать распространение 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 лейкоцитах крови и мозге, 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 тканей 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 снижает содержание креатина в 5 раз, подавляет активность аргиназы, активирует NOS.
- В лейкоцитах крови повышает активности A1 и NOS в цитоплазме, снижает активность A2, нормализует активность цитоплазматической креатинкиназы и уровень креатина в плазме.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агабабова А.А., Авакян Л.А. Значение бактериальной транслокации и ее роль в формировании симбиотических отношений с макроорганизмом. Доклады НАН РА, 2008, т. 108 (3), с. 262-230.
2. 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.
3. Васильева С.В., Малашенко А.М., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф., Сереженков В.А. Сниженный уровень индуцированного синтеза оксида азота в иммунокомпетентных органах – одна из характеристик наследственного дефекта в иммунной системе мышей. ДАН РФ, 2002, т. 386 (5), с. 690–692.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
5. ВОЗ|Всемирная организация здравоохранения. Рак. Информационный бюллетень № 297. Февраль 2012 г.
6. Гильяно Н.Я., Коневега Л.В., Носкин Л.А. Динамика изменения внутриклеточного уровня супероксида и NO в эндотелиоцитах и клетках карциномы человека после их обработки ингибиторами NO-синтазы. Бюл. Эксп. Биол. Мед., 2010, т. 149 (1), с. 85–88.
7. Диде Г.П., Ещенко Н.Д., Диде А.А., Красовская И.Е. Введение в технику биохимического эксперимента. Спб., 2003, 86 с.
8. Ерлыкина Е.И., Сергеева Т.Ф. Ферментативная характеристика креатинкиназной системы при нарушении гемодинамики мозга. Бюл. Эксп. Биол. Мед., 2010, т. 149 (1), с. 18–21.
9. Иванов И.И., Корвкин Б.Ф., Маркелов И.М. Введение в клиническую энзимологию. Ленинград. “Медицина”, 1974, 277 с.
10. Куценко С.А. Иммуносупрессия и канцерогенез. Биомед. Ж., 2003, т. 4, с.119-124.
11. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечнососудистой системы. /В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. М.: РКНПК МЗ



РФ, 2001. 78с.

12. Лупинская З.А. Эндотелий сосудов основной регулятор местного кровотока. [krsu.edu.kg/ vestnik/2003/html](http://krsu.edu.kg/vestnik/2003/html).
13. Малышева Е.В., Круглов С.В., Назаров В.А., Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Внутриклеточный и внеклеточный NO дифференциально модулирует стресс-ответ и апоптоз в макрофагах, подвергнутых воздействию биологических или физических факторов. Бюл. Эксп. Биол. Мед., 2007, т. 143, с. 614–618.
14. Мошков Д.А., Романченко С.П., Парнышкова Е.Ю., Безгина Е.Н., Заичкина С.И., Павлик Л.Л. Эффект дофамина на клетки асцитной карциномы Эрлиха. Бюл. Эксп. Биол. Мед., 2012, т. 154, с. 646–651.
15. Новиков Д.К. Патология системы иммунитета /Д.К. Новиков. М.: «Национальная академия микологии», 2003, 368 с.
16. Окрут И.Е., Шакерова Д.А., Веселова Т.А. Изменение концентрации оксида азота и активности свободнорадикального окисления в крови больных раком молочной железы. Вестн. Нижегород. Ун-та им. Н.И. Лобачевского, 2011, No 5 (1), с. 118–121.
17. Пескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК. Биохимия, 1977, т. 62, с. 1571–1578.
18. Питлик Т.Н., Булай П.М., Денисов А.А., Афанасенков Д.С., Черенкевич С.Н. Редокс-регуляция ионного гомеостаза в нейронах. Биохимия, 2009, т. 26 (2), с. 104–110.
19. Поцелуева М.М., Пустовидко А.В., Ковалева Е.В., Шаталин Ю.В., Евдотьенко Ю.В. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки при развитии асцитной опухоли *in vitro* и *in vivo*. Цитология, 2005, т. 47 (1), с. 57–63.
20. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха. Метод. Разработка /Краснояр. Гос. Ун-т;. Сост. Е.В. Инжеваткин.- Красноярск, 2004, 10 с.
21. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций. Иммунология, 2000, N 4, с. 9–20.
22. Путинцева О.В., Артюхов В.Г., Колтаков И.А. Иммунология. Практикум. Часть II. Воронеж, 2008, 45 с.

23. Смирнова Л.П., Кондакова И.В. Зависимость активности антиоксидантных от выраженности процессов пролиферации и типа тканевой организации карциномы Эрлиха. Биомед. Хим., 2004 (6), с. 566–575.
24. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник. Сорос. Образ. Журн., 2000. N 10, с. 105–110.
25. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов. Биохимия. 2007. Т. 72. С. 109–116.
26. Ткаченко А.Г. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от токсического эффекта паракват, индуцирующего супероксидный стресс. Биохимия. 2004. Т. 69. С. 234–242.
27. Филиппович С.Ю. NO–синтазы бактерий. Биохимия, 2010, т. 75 (10), с. 1367–1376.
28. Фрик Г., Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю. В кн.: Иммунологические методы. (под ред. Х.Фримеля), 1979, М: Мир, 372 с.
29. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб.: Наука, 2003, 327 с.
30. Поцелуева М.М., Наумов А.А. Изменение числа клеточных популяций и уровня активных форм кислорода в крови и асцитной жидкости опухоленосителей. Цитология, 2010, т. 52 (2), с. 131–135.
31. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека. Физиол. Человека, 2003, т. 29 (4), с. 98–109.
32. Якубовская Р.И. Современные подходы к биотерапии рака. Рус. Биотерапевт. ж., 2002, т. 1 (3), с. 5–14.
33. Abbott N.J. Astrocyte–endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. J. Anat., 2002, v. 200, p. 629–638.
34. Akamatsu S., Watanabe T.J. Assay for L-arginine in biological liquids. J. Biochem., 1961, v. 77 (3), p. 484–487.
35. Al Abdan M. Alfa-lipoic acid controls tumor growth and modulates hepatic redox state in Ehrlich- ascites-carcinoma-bearing mice. Sci. World J., 2012, v. 2012, p. 1–6.

36. Albakri Q.A., Stuehr D.J. Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability. *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271 (10), p. 5414–5421.
37. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 2001, v. 357, p. 593–615.
38. Alfieri R. R., Bonelli M. A., Cavazzoni A. et al. Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress. *J. Physiol.* 2006, v. 576, p. 391–401.
39. Alibek K., Bekmurzayeva A., Mussabekova A., Sultankulov B. Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. *Infect. Agents Cancer.*, 2012, 7 (1), p. 33–37.
40. Andres R.H., Ducray A.D., Schlattner U., Wallimann T., Widmer H.R. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*, 2008, v. 76, p. 329–343.
41. Arnaldez F.I., Helman L.J. Targeting the insulin growth factor receptor 1. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 2012, v. 26 (3), p. 527–542.
42. Arndt M.A., Battaglia V., Parisi E., Lortie M.J., Isome M., Baskerville C., Pizzo D.P. The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2009, v. 296 (6), C1411-1419.
43. Ayuyan A.G., Cohen F.S. Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys. J.*, 2006, v. 91 (6), p. 2172–2183.
44. Azad N., Rojanasakul Y., Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, 2008, v. 11, p. 1–13.
45. Bansal V., Ochoa J.B. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2003, v. 6, p. 223–228.
46. Barksdale A.R., Bernard A.C., Maley M.E., Gellin G.L., Kearney P.A., Boulanger B.R., Tsuei B.J., Ochoa J.B. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. *Surgery*, 2004, v. 135 (5), p. 527–535.
47. Beard E., Braissant O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J. Neurochem.*, 2010, v. 115, p. 297–313.
48. Beckman, J.S., Koppenol W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the

bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996, v. 271, C1424–C1429.

49. Bera S., Williman T., Ray S., Ray M. Enzymes of creatine biosynthesis, arginine and methionine metabolism in normal and malignant cells. *FEBS J.*, 2008, v. 275 (23), p. 5899–5909.

50. Blazejewski S., Georges A., Forest K., Corcuff J.B., Abouelfath A., Girodet .PO., Kamagate M., Jacquet A., Pillet O., Bordenave L., Moore N. The chronic oral administration of arginine aspartate decreases secretion of IGF-1 and IGFBP-3 in healthy volunteers. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2009, v. 23 (3), p. 339–344.

51. Bobak Y.P., Vynnytska B.O., Kurlishchuk Y.V., Sibirny A.A., Stasyk O.V. Cancer cell sensitivity to arginine deprivation in vitro is not determined by endogenous levels of arginine metabolic enzymes. *Cell Biol. Int.*, 2010, v. 34, p. 1085–1089.

52. Bode-Boger S.M., Scalera F., Ignarro L.J. The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.*, 2007, 114 (3), p. 295–306.

53. Bolaños J.P., Heales S.J.R. Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications. *Front Neuroenergetics*, 2010, v. 2, p. 1–9.

54. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol. Life Sci.*, 1999, v. 55, N (8-9), p. 1015–1028.

55. Braissant O., Beárd E., Torrent C., Henry H. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: Relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol. Dis.*, 2010, v. 37, 423–433.

56. Bredt D.S., Snyder S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990, 87(2), 682–685.

57. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, v. 5, p. 641–654.

58. Brosnan J.T., Brosnan M.E. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu. Rev. Nutr.*, 2007, v. 27, p. 241–261.

59. Brune B. Reactive oxygen and nitrogen species. *Antioxid Redox Signal.*, 2005, v. 7, p. 497–503.

60. Brune B., von Knethen A., Sandau K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, v. 351 (3), p. 261–272.

61. Buga G.M., Wei L.H., Bauer P.M., Fukuto J.M., Ignarro L.J. N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 1998, v. 275, R1256-R1264.
62. Burdon R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad. Biol. Med.*, 1995. Vol. 18. P.775–795.
63. Burke A.J., Sullivan F.J., Giles F.J., Glynn S.A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*, 2013, v. 34 (3), p. 503–512.
64. Bussiere F.I., Chaturvedi R., Cheng Y., Gobert A.P., Asin M. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric oxide synthase translation. *J. Biol. Chem.*, 2005, v. 280, p. 2409–2412.
65. Bustamante J., Czerniczyniec A., Lores-Arnaiz S. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. *Front. Biosci.*, 2007, v. 12, p. 1034–1040.
66. Carpentier P.A.A., Begolka W.S., Olson J.K., Elhofy A., Karpus W.J., Miller S.D. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, 2005, v. 49, p. 360–374.
67. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, v. 72, p. 3666–3670.
68. Casero R.A, Pegg A.E. Polyamine catabolism and disease. *Biochem J.*, 2009, v. 421, p. 323–338.
69. Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P., Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.*, 2004, v. 81 (Suppl 1), p. S38– S 44.
70. Cendan J.C., Souba W.W., Copeland E.M., Lind D.S. Characterization and growth factor stimulation of L-arginine transport in a human colon cancer cell line. *Ann. Surg. Oncol.*, 1995, v. 2, p. 257–265.
71. Cendan J.C., Topping D.L., Pruitt J., Snowdy S., Copeland E.M., Lind, D. S. Inflammatory mediators stimulates arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer cell line. *J. Surg. Res.*, 1996, v. 60, p. 284–288.
72. Chakravortty D., Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular

bacterial pathogens. *Microb. Infect.*, 2003, v. 5, p. 621–627.

73. Chatterjee S., Premachandran S., Bagewadikar R.S., Bhattacharya S., Chattopadhyay S., Poduval T.B. Arginine metabolic pathways determine its therapeutic benefit in experimental heatstroke: role of Th1/Th2 cytokine balance. *Nitric Oxide*, 2006, v. 15, p. 408–416.

74. Chattopadhyay S., Das T., Sa G., Ray P.K. Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich's ascites carcinoma through a nitric oxide-dependent pathway. *Apoptosis*, 2002, v. 7 (1), p. 49–57.

75. Chang C.I., Liao J.C., Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res.*, 2001, v. 61, p. 1100–1106.

76. Chang C.I., Zoghi B., Liao J.C., Kuo L. The involvement of tyrosine kinases cyclic AMP/protein kinase A, and p38 mitogen-activated protein kinase in IL-13-mediated arginase I induction in macrophages: its implications in IL-13-inhibited nitric oxide production. *J. Immunol.*, 2000, v. 165, p. 2134–2141.

77. Chen, K., Northington, F. J., Martin, L. J. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Struct. Funct.*, 2010, v. 214 (2-3), p. 219–234.

78. Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M., Tsui S.M., Cheng A.W., Lo W.H., Leung Y.C. Pegylated recombinant human arginase (rhArg-peg5000 mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res.*, 2007, v. 67 (1), p. 309–317.

79. Choi B.S., Martinez-Falero I.C., Corset C., Munder M., Modolell M., Muller I. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. *J. Leukocyte Biol.*, 2009, v. 85, p. 268–277.

80. Chomczynski P, Sacchi N., Classen A., Lloberas J., Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods Mol. Biol.*, 2009, v. 531, p. 29–43.

81. Closs E.I., Simon A., Vekony N., Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J. Nutr.*, 2004, v. 134, 2752S–2759S.

82. Coleman C.S., Hu G., Pegg A.E. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem. J.*, 2004, v. 379, p. 849–855.

83. Corraliza I.M., Soler G., Eichmann K., Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, v. 206, p. 667–673.
84. Das P., Lahiri Am., Lahiri Ay., Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLOSpathogens*, 2010, v. 6 (6), p. 1–7.
85. de Boniface J., Mao Y., Schmidt-Mende J., Kiessling R., Poschke I. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase 1 in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. *Oncoimmunol.*, 2012, v. 1 (8), p. 1305–1312.
86. Deepa M., Sureshkumar T., Satheeshkumar P.K., Priya S. Antioxidant rich *Morus alba* leaf extract induces apoptosis in human colon and breast cancer cells by the downregulation of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase. *Nutr. Cancer*. 2013, v. 65 (2), p. 305–310.
87. Deignan J.L., Livesay J.C., Shantz L.M., Pegg A.E., O'Brien W.E., Iyer R.K. Polyamine homeostasis in arginase knockout mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, v. 293, C1296–C1301.
88. Delage B., Fennell D.A., Nicholson L., McNeish I., Lemoine N.R., Crook T. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int. J. Cancer* 2010, v. 126, p. 2762–2772.
89. Delwing D., Cornélio A.R., Wajner M., Wannmacher C.M., Wyse A.T. Arginine administration reduces creatine kinase activity in rat cerebellum. *Metab. Brain Dis.*, 2007, v. 22 (1), p. 13–23.
90. Demicheli V., Quijano C., Alvarez B., Radi R. Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, v. 42 (9), p.1359–1368.
91. De Santo C., Serafini P., Marigo I., Dolcetti L., Bolla M., Del Soldato P. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2005, v. 102, p. 4185–4190.
92. Diaz-Montero C.M., Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage,

metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, v. 58 (1), p. 49–59.

93. Dillon B.J., Prieto V.G., Curley S.A., Ensor C.M., Holtsberg F.W., Bomalaski J.S., Clark M.A. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer*, 2004, v. 100 (4), p. 826–833.

94. Dillon B., Holtsberg F., Ensor M., Bomalaski J., Clark M. Biochemical characterization of the arginine degrading enzymes and arginine deaminase and their effect on nitric oxide production. *Med. Sci. Monit.*, 2002, v. 8, N 7, p. 248–253.

95. Dolder M., Walzel B., Speer O., Schlattner U., Wallimann T. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates: requirement for microcompartmentation. *J. Biol. Chem.*, 2003, v. 278, (20), p.17760–17766.

96. de Boniface J., Mao Y., Schmidt-Mende J., Kiessling R., Poschke I. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase 1 in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. *Oncoimmunol.*, 2012, v. 1 (8), p. 1305–1312.

97. El-Gayar S., Thuring-Nahler H., Pfeilschifter J., Rollinghoff M., Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J. Immunol.*, 2003, v. 171, p. 4561–4568.

98. Evans Jr., Doyle J., Evans D.G. *Escherichia Coli*. *Med. Microbiol.*, 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 2007.

99. Feun L.G., You M., Wu C., Kuo M.T., Waugpaichitr M., Spector S., Savaraj N. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer. *Curr. Pharm. Design.*, 2008, v. 14, p. 1049–1057.

100. Fiore N., Green S., Williamson B., Carswell E., Old L.J., Hlinka, J. Tumor necrosis factor: Further studies," *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1975, v. 16, p. 125–131.

101. Foxton R.H., Land J.M., Heals S.J.R. Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. *Neurochem. Res.*, 2007, v. 32 (4-5), p. 751–756.

102. Freestone P.P., Williams P.H., Haigh R.D., Maggs A.F., Neal C.P., Lyte M. Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory



factor in trauma-induced sepsis. *Shock*, 2002, v. 18, p. 465–470.

103. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, v. 9 (3), p. 162–174.

104. Gagnon C., Leblond F.A., Filep J.G. Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes, lymphocytes challenged by lipopolysaccharide. *FEBS Lett.*, 1998, v. 431, N 1, p. 107–110.

105. Gallardo-Soler A., Gómez-Nieto C., Campo M.L., Marathe C., Tontonoz P., Castrillo A., Corraliza I. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol. Endocrinol.* 2008. V. 22 (6). p. 1394–1402.

106. Gallina G., Dolcetti L., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Colombo M.P., Basso G., Brombacher F., Borrello I. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T-cells. *J. Clin. Invest.*, 2006, v. 116, p. 2777–2790.

107. Gambashidze K., Khorava P., Azaladze T., Kalandarishvili K., Jaiani E., Lasareishvil B., Azaladze A., Tediashvili M. Antitumor and adjuvant effects of phagelysates of *E.coli* in mice with Ehrlich carcinoma. *Exp. Oncol.*, 2012, v. 34 (2), p. 107–111.

108. Gamble L.D., Hogarty M.D., Liu X., Ziegler D.S., Marshall G., Norris M.D., Haber M. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma. *Front Oncol.* 2012, v. 2, 162, p.1-10.

109. Gao Y.T., Panda S.P., Roman L.J., Matrasek P. Oxygen metabolism by neuronal nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 2007, v. 282 (11), p. 7921–1929.

110. Gardini G., Cravanzola C., Autelli R., Testore G., Cesa R., Morando L., Solinas S.P., Muzio G., Grillo M.A., Colombatto S. Agmatine inhibits the proliferation of rat hepatoma cells by modulation of polyamine metabolism. *J. Hepatol.*, 2003, v. 39 (5), p. 793-799.

111. Gaston B.M., Carver J., Doctor, A. Palmer L.A. S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv.*, 2003, v. 3, p. 253–263.

112. Gerritsen W.B., van Boven W.-J.P., Boss D.S. Malondialdehyde in plasma, a biomarker of global oxidative stress during mini-CABG compared to on- end off-pump CABG surgery: a pilot study. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surgery*, 2006, v. 5, p. 27–31.

113. Gibbs S.M. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol. Neurobiol.*, 2003, v. 27, N 2, p. 107–120.
114. Gobert A.P., Cheng Y., Wang J.Y., Boucher J.I., Iyer R.K. Helicobacter pylori induces macrophages apoptosis by activation of arginase II. *J. Immunol.*, 2002, v. 168, p. 4692–4700.
115. Gonon A.T., Jung C., Katz A., Westerblad H., Shemyakin A. Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PLoS ONE*, 2012, 7 (7), e42038.
116. Gorren A.C.F., Mayer B. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase (review). *Curr. Drug Metab.*, 2002, v. 3, p. 135–157.
117. Gotoh T., Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J. Cell Biol.*, 1999, 144 (3), p. 427–434.
118. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Kothe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerd S. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th 2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*, 2006, v. 211, p. 473–486.
119. Grenham S., Clarke G., Cryan J.F., Dinan T.G. Brain–gut–microbe communication in health and disease *Front. Physiol.*, 2011, v. 2, p. 1–15.
120. Gutowski M., Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim. Pol.*, 2013, v. 60, p. 2–16.
121. Halaris A., Plietz J. Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS drugs*, 2007, v. 21, 11, p. 885–900.
122. Hamburger A.W., Dunn F.E., White C.P. Percoll density gradient separation of cells from human malignant effusions. *Br. J. Cancer*, 1985, v. 51 (2), p. 253–258.
123. Hatano E., Tanaka A., Kanazawa A., Tsuyuki S., Tsunekawa S., Iwata S., Takahashi R., Chance B., Yamaoka Y. Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *Liver Int.*, 2004, v. 24 (4), p. 384–393.
124. Haines R.J., Pendleton L.C., Eichler D.C. Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2011, v. 2 (1), p. 8–23.
125. Hao G., Xie L., Gross SS. Argininosuccinate synthetase is reversibly inactivated by S-

nitrosylation *in vitro* and *in vivo*. J. Biol. Chem., 2004, v. 279, p. 36192–36200.

126. Hayes M.P., Wang J., Norcross M.A. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. Blood, 1995, v. 86 (2), p. 646–650.

127. Hering H., Lin C.C., Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. J. Neurosci., 2003, v. 23 (8), p. 3262–3271.

128. Herranz S., Través P.G., Luque A., Hortelano S. Role of the tumor suppressor ARF in macrophage polarization. Enhancement of the M2 phenotype in ARF-deficient mice. OncoImmunology, 2012, v. 1 (8), p. 1227–1238.

129. Herrero C., Hu X., Li W.P., Samuels S., Sharif M.N., Kotenko S., Ivashkiv .LB. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. J Immunol., 2003, v. 171 (10), p. 5034–5041.

130. Hesse M., Modolell M., La Flamme A.C., Schito M., Fuentes J.M., Cheever A.W., Pearce E.J., Wynn T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. J Immunol., 2001, v. 167, p. 6533–6544.

131. Hoption Cann S.A., van Netten J.P., van Netten C. Dr. William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. Postgrad. Med. J., 2003, v. 79, p. 672–680.

132. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., Garshell J., Neyman N., Altekruse S.F., Kosary C.L., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Cho H., Mariotto A., Lewis D.R., Chen H.S., Feuer E.J., Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/), based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.

133. Hudault S., Guignot J., Servin A.L. (July 2001). «*Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection». Gut, 2001, v. 49 (1), p. 47–55.

134. Hsueh E.C., Knebell S.M., Lo W.-H., Leung Y.-C., Cheng P. N.-M., Hsueh C.-T. Deprivation of arginine by recombinant human arginase in prostate cancer cells. J. Hematol. Oncol., 2012, v. 5, p. 17–23.

135. Inoue M., Sato E.F., Park A.M., Nishikawa M., Kasahara E., Miyoshi M., Ochi A., Utsumi K. Cross-talk between NO and oxyradicals, a supersystem that regulates energy metabolism and survival of animals. *Free Radic. Res., Free Rad. Res.*, 2000, v. 33, N 6, p. 757–770.
136. Isome M., Lortie M.J., Murakami Y., Parisi E., Matsufuji S., Satriano J. The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, v. 293 (2), C705-C711.
137. Iyamu E.W., Asakura T., Woods G.W. A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of arginase activity *in vitro*. *Anal. Biochem.*, 2008, v. 383 (2), p. 332–334.
138. Iyer R.K., Yoo P.K., Kern R.M., Rozengurt N., Tsoa R., O'Brien W.E., Yu H., Grody W.W., Cederbaum S.D. Mouse model for human arginase deficiency. *Mol. Cell Biol.*, 2002, v. 22, p. 4491–4498.
139. Jacobsen L.C., Theilgaard-Mönch K., Christensen E.I., Borregaard N. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood* 2007, v. 109, p. 3084–3087.
140. Jankord, R., Solomon, M. B., Albertz, J., Flak, J. N., Zhang, R., Herman, J. P. Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology*, 2011, v. 152 (2), p. 629–638.
141. Jenkins D.C, Charles I.G, Thomsen L.L, Moss D.W, Holmes L.S, Baylis S.A, Rhodes P., Westmore K., Emson P.C, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1995, v. 92 (10), p. 4392–4396.
142. Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D. Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 1996, v. 114, N 1, p. 107–132.
143. Jiao Z.-J., Gao J.-J., Hua S.-H., Chen D.-Y., Wang W.-H., Wang H., Wang X.-H., Xu H.-X. Correlation between circulating myeloid-derived suppressor cells and Th17 cells in esophageal cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2012, v. 18 (38), p. 5454–5461.
144. Joerink M., Ribeiro C.M., Stet R.J., Hermsen T., Savelkoul H.F., Wiegertjes G.F. Head kidney-derived macrophages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show plasticity and functional polarization upon differential stimulation. *J. Immunol.*, 2006, 177 (1), p. 61-69.
145. Kanner J., Harel S., Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991,

v. 289 (1), p. 130-136.

146. Kohli R., Meininger C.J., Haynes T.E., Yan W., Self J.T., Wu G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Nutr.*, 2004, v. 134, p. 600–608.

147. Kozłowska K, Cichorek M, Zarzeczna M. Estimation of macrophage IL-10 and NO secretion in the cytotoxicity against transplantable melanomas in relation to the progression of these tumors. *Folia Morphol (Warsz)*, 2002, v. 61 (3), p. 127–131.

148. Kusmartsev S., Gabrilovich D.I. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: The role of reactive oxygen species. *J. Leukoc. Biol.* 2003, v. 74 (2), p. 186–196.

149. Kusmartsev S., Nefedova Y., Yoder D., Gabrilovich D.I. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol.*, 2004, v. 172, p. 989–999.

150. Kusmartsev S., Nagaraj S., Gabrilovich D.I. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* 2005;175:4583–4592.

151. Lam T.L., Wong G.K., Chow H.Y., Chong H.C., Chow T.L., Kwok S.Y., Cheng P.N., Wheatley D.N., Lo W.H., Leung Y.C. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment. Cell Melanoma Res.*, 2010, v. 24 (2), p. 366–376.

152. Lenz H., Schmidt M., Welge V., Kueper T., Schlattner U., Wallimann T., Elsässer H.P., Wittern K.P., Wenck H., Staeb F., Blatt T. Inhibition of cytosolic and mitochondrial creatine kinase by siRNA in HaCaT- and HeLaS3-cells affects cell viability and mitochondrial morphology. *Mol. Cell Biochem.*, 2007, v. 306 (1-2), p. 153–162.

153. Lepique A.P., Daghasanli K.R., Cuccovia I.M., Villa L.L. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin. Cancer Res.*, 2009; v. 15, p. 4391–4400.

154. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.*, 2006, v. 66, p. 605–612.

155. Li J., Billiar T.R. The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin. Perinatol.*, 2000, v. 24 (1), p. 46–50.

156. Li Y., Huang T. T., Carlson E. J., Melov S., Ursell P. C., Olson J. L., Noble L. J., Yoshimura

- M. P., Berger C., Chan P. H. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.*, 1995, v. 11, p. 376–381.
157. Lim H.K., Lim H.K., Ryoo S., Benjo A., Shuleri K., Miriel V. Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007, v. 293, H3317–H3324.
158. Lin W.C., Tsai P.S., Huang C.J. Catecholamines' enhancement of inducible nitric oxide synthase-induced nitric oxide biosynthesis involves CAT-1 and CAT-2A. *Anesth. Analg.*, 2005, v. 101, p. 226–32.
159. Lind D.S. Arginine and cancer. *J. Nutr.*, 2004, v. 134 (10 Suppl), p. 2837S–2841S.
160. Liu Y, Van Ginderachter JA, Brys L., De Baetselier P, Raes G, Geldhof AB. Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells. *J. Immunol.*, 2003, v. 170 (10), p. 5064–5074.
161. Lodinová-Zádníková R., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years)". *Inter. Arch. Allerg. Immunol.*, 2003, v. 131 (3), p. 209–211.
162. Lowenstein, C. J., Padalko, E. iNOS (NOS2) at a glance. *J. Cell Sci.*, 2004, v. 117, p. 2865–2867.
163. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265–275.
164. Lu C., Chan S.L., Fu W., Mattson M.P. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal facilitates opening of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in neurons by increasing protein tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2002, v. 277 (27), p. 24368–24375.
165. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 2002, v. 23, p. 549–555.
166. Marathe C., Bradley M.N., Hong C., Lopez F., Ruiz de Galarreta C.M., Tontonoz P., Castrillo A. The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *J Biol Chem.* 2006, v. 281, p. 32197–32206.
167. Massi D., Marconi C., Franchi A., Bianchini F., Paglierani M., Ketabchi S., Miracco C.,

Santucci M., Calorini L. Arginine metabolism in tumor-associated macrophages in cutaneous malignant melanoma: evidence from human and experimental tumors. *Hum. Pathol.*, 2007, v. 38 (10), p. 1516–1525.

168. Matthiesen S., Lindemann D., Warnken M., Juergens U.R., Racké K. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, v. 579 (1-3), p. 403–410.

169. Mauldin J.P., Zeinali I., Kleypas K., Woo J.H., Blackwood R.S., Jo C.-H., Stone E.M., Georgiou G., Frankel A.E. Recombinant human arginase toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation. *Transl. Oncol.*, 2012, v. 5, p. 26–31.

170. Mazumder U.K., Gupta M., Maiti S., Mukherjee M. Antitumor activity of *Hygrophilaspinosa* on Ehrlich ascites carcinoma and sarcoma-180 induced mice. *Indian J. Exp. Biol.*, 1997, v. 35, p. 473–477.

171. McKee E.E., Ferguson M., Bentley A.T., Marks T.A. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidones. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 2006, v. 50, N 6, p. 2042-2049.

172. Meyer L.E., Machado L.B., Santiago A.P., da-Silva W.S., Felice F.G., Holub O., Oliveira M.F., Galina A. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinases-dependent ADP re-cycling activity. *J. Biol. Chem.*, 2006, v. 281, p. 37361–37371.

173. Ming X-F., Rajapakse A.G., Yepuri G., Xiong Y., Carvas J.M., Ruffieux J., Scerri I., Wu Z., Popp K. Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis. *J. Am. Heart Assoc.* 2012, 1:e000992 doi: 10.1161/JAHA.112.000992.

174. Mesmer U.K. Reimer D.M., Reed J.C., Brune B. Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett.*, 1996, v. 384(2), p. 162-166.

175. Miyazaki K., Takaku H., Umeda M., Fujita T., Huang W.D., Kimura T., Yamashita ., Horio T. Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a Mycoplasma-infected cell line. *Cancer Res.*, 1990, v. 50 (15), p. 4522–

4527.

176. Modolell M., Corraliza I.M., Link F., Soler G., Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.*, 1995, v. 25 (4), p. 1101-1104.

177. Moeslinger T., Friedl R., Volf I., Brunner M., Baran H., Koller E., Spieckermann P.G. Urea induces macrophages proliferation by inhibition of inducible nitric oxide synthesis. *Kidney Int.*, 1999, v. 56 (2), p. 581–588.

178. Moore R.B., Kauffman N.J. Simultaneous determination of citrulline and urea using diacetylmonoxime. *Anal. Biochem.*, 1970, v. 33 (2), p. 263–272.

179. Morbidelli L., Donnini S., Siche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. *Cancer Treat. Res.*, 2004, v. 117, p. 155–157.

180. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.*, 2007, v. 137, p. 1616S–1620S.

181. Morris S.M.Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.*, 2004, v. 134 (10), p. 2743S-2747S.

182. Morris S.M.Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.*, 2007, v. 137, 1602S–1609S.

183. Morris S.M.Jr. Arginases and arginine deficiency syndromes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2012, v. 15 (1), p. 64–70.

184. Morrow K, Hernandez CP, Raber P, Valle LD, Wilk AM, Majumdar S, Wyczechowska D, Reiss K, Rodriguez PC. Anti-leukemic mechanisms of pegylated arginase I in acute lymphoblastic T cell leukemia. *Leukemia*, 2013, v. 27 (3), p. 569–577.

185. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, v. 8, p. 958–969.

186. Mumenthaler S.M., Rozengurt N., Livesay J.C., Sabaghian A., Cederbaum S.D., Grody W.W. Disruption of arginase II alters prostate tumor formation in TRAMP mice. *Prostate*, 2008, v. 68, p. 1561–1569.

187. Mumenthaler S.M., Yu H., Tze S., Cederbaum S.D., Pegg A.E., Seligson D.B., Grody W.W. Expression of arginase II in prostate cancer. *Int. J. Oncol.*, 2008, 32 (2), p. 357–365.



188. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British J. Pharmacol.*, 2009, v. 158, p. 638–651.
189. Munder M., Mollinedo F., Calafat J., Canchado J., Gil-Lamaignere C., Fuentes J.M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 2005, v. 105, p. 2549–2556.
190. Murphy M.P. Nitric oxide and cell death. *Biochem. Biophys. Acta.* 1999, v. 1411, p. 401–414.
191. Nelin L.D., Wang X., Zhao Q., Chicoine L.G., Young T.L., Hatch D.M., English B.K., Liu Y. MKP-1 switches arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase following endotoxin challenge. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, v. 293 (2), C632–C640.
192. Nishikawa M., Chang B., Inoue M. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells, but enhances the growth of solid tumors. *Carcinogenesis*, 2004, v. 25 (11), p. 2101–2105.
193. Nussler A.K., Liu Z.Z., Hatakeyama K., Geller D.A., Billiar T.R., Morris S.M.Jr. A cohort of supporting metabolic enzymes is coinduced with nitric oxide synthase in human tumor cell lines. *Cancer Lett.*, 1996, v. 103 (1), p. 79–84.
194. Obermajer N., Wong J.L., Edwards R.P., Odunsi K., Moysich K., Kalinski P. PGE(2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-derived suppressor cells. *Immunol. Invest.*, 2012, v. 41 (6-7), p. 635–657.
195. Oberley T., Schultz S., Li N. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, v. 19, p. 53–65.
196. Ochoa A.C., Zea A.H., Hernandez C., Rodriguez P.C. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2007, v. 13, p. 721s–726s.
197. Ogino K., Takahashi N., Takigawa T. Association of serum arginase I with oxidative stress in a healthy population. *Free Radic. Res.*, 2011, v. 45, p. 147–155.
198. Ohira Y., Ishine S., Inoue N., Yunoki K. Reduced growth of Ehrlich ascites tumor cells in creatine-depleted mice fed beta-guanidinopropionic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, v. 1097 (2), p. 117–122.
199. Ohtsuki S. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the

- central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, v. 27, p. 1489–1496.
200. O'Mahony S. M., Hyland N. P., Dinan T. G., Cryan J. F. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2011, v. 214, p. 71–88.
201. Orlando G.F., Wolf G., Engelmann M. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. *Amino Acids*, 2008, v. 35, N 1, p. 17–27.
202. Ozaslan M., Karagöz I.D., Guldur M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *African J. Biotechnol.*, 2011, v. 10 (13), p. 2375–2378.
203. Pajak B., Wojewódzka U., Gajkowska B., Orzechowski A. Lipid rafts in anticancer therapy: Theory and practice (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2008, v. 1 (2), p. 167–172.
204. Paravicini T.M., Touyz R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 2008, v. 31 (Suppl 2), S170–S180.
205. Parihar M.S., Parihar A., Villamena F.A., Vaccaro P.S., Ghafourifar P. Inactivation of mitochondrial respiratory chain complex I leads of mitochondrial nitric oxide synthase to become pro-oxidative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, v. 367, N 4, p. 761–767.
206. Patra S., Ghosh A., Roy S.S., Bera S., Das M., Talukdar D., Ray S., Wallimann T., Ray M. A short review on creatine-creatine kinase system in relation to cancer and some experimental results on creatine as adjuvant in cancer therapy. *Amino Acids*, 2012, v. 42 (6), p. 2319–2330.
207. **Patyar S., Joshi R., Byrav P., Prakash A., Medhi B., Das B.K.** Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J. Biomed. Sci.*, 2010, v. **17**, p. 21–34.
208. Popovic P.J., Zeh III H.J., Ochoa J.B. Arginine and immunity. *J. Nutr.*, 2007, v. 137, 1681S–1686S.
209. Qian X.L., Li Y.Q., Gu .F, Liu F.F., Li W.D., Zhang X.M., Fu L. Overexpression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase (uMtCK) accelerates tumor growth by inhibiting apoptosis of breast cancer cells and is associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2012, v. 427 (1), p. 60–66.
210. Raber P., Ochoa A.C., Rodríguez P.C. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives.

Immunol. Invest. 2012, v. 41 (6-7), p. 614–634.

211. Rega A., Terlizzi M., Luciano A., Forte G., Crother T.R., Arra C., Arditi M., Pinto A., Sorrentino R. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in tumor progression in Lipopolysaccharide-stimulated lung tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 2013, 190 (5), v. 2391–2402.

212. Regunathan S., Reis D.J. Characterization of arginine decarboxylase in rat brain and liver: distinction from ornithine decarboxylase. *J. Neurochem.*, 2000, v. 74 (5), p. 2201-2208.

213. Rhee S.H., Pothoulakis C., Mayer E.A. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, v. 6, p. 306–314.

214. Rodriguez P.C., Hernandez C.P., Quiceno D., Dubinett S.M., Zabaleta J., Ochoa J.B. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J. Exp. Med.*, 2005, v. 202, p. 931–939.

215. Rodriguez P.C., Ochoa A.C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.*, 2008, v. 222, p. 180–191.

216. Salimuddin, Nagasaki A, Gotoh T, Isobe H, Mori M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 1999, v. 277, E110–E117.

217. Santhanam L., Lim H.K., Lim H.K., Miriel V., Brown T., Patel M., Balanson S., Ryoo S., Anderson M., Irani K., Khanday F., Di Costanzo L., Nyhan D., Hare J.M., Christianson D.W., Rivers R., Shoukas A., Berkowitz D.E. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ. Res.*, 2007, 101 (7), p. 692–702.

218. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11:173–186.

219. Schimmel L., Khandekar V.S., Martin K.J., Riera T., Honan C. The synthetic phosphagen cyclocreatine phosphate inhibits the growth of a broad spectrum of solid tumors. *Anticancer. Res.*, 1996, v. 16, p. 375–380.

220. Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T. Metabolite channeling: creatine kinase

microcompartments. In: Lennarz W.J. and Lane D.W. (eds) Encyclopedia of biological chemistry. Elsevier, 2011.

221. Schmidt H.H.H.W., Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: Feelisch M., Stamler J.S., eds. Methods in Nitric Oxide Research. Wiley, Chichester; 1996, p. 491–497.

222. Schmielau J., Finn O.J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.*, 2001, v. 61 (12), p. 4756–4760.

223. Schnyder T., Rojo M., Furter R., Wallimann T. The structure of mitochondrial creatine kinase and its membrane binding properties. *Mol. Cell Biochem.*, 1994, v. 133–134, p. 115–123.

224. Serafini P., Meckel K., Kelso M., Noonan K., Califano J., Koch W. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.*, 2006, v. 203, p. 2691–2702.

225. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G: Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.*, 2000, v. 60, p. 3305–3312.

226. Sinha P., Clements V.K., Miller S., Ostrand-Rosenberg S. Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, v. 54, p. 1137–1142.

227. Sonoki T., Nagasaki A., Gotoh T., Takiguchi M., Takeya M., Matsuzaki H., Mori M. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues *in vivo* by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 1997, v. 272, p. 3689–3693.

228. Soroida Y., Ohkawa R., Nakagawa H., Satoh Y., Yoshida., Kinoshita H., Tateishi R., Masuzaki R., Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. *J. Hepatol.* 2012, 57 (2), p. 330–336.

229. Sorrells D.L., Friend C., Koltuksuk U., Courcoulas A., Boyle P., Garrett M. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge *in vivo*. *Arch. Surg.*, 1996, v. 131, p. 1155–1163.

230. Sosroseno W., Musa M., Ravichandran M., Fikri I.M., Bird P.S., Seymour G.J. Arginase activity in a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2006, v. 21 (3), p. 145–150.
231. Speer O., Bäck N., Buerklen T., Brdiczka D., Koretsky A., Wallimann T., Eriksson O. Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem. J.*, 2005, v. 385 (Pt 2), p. 115–123.
232. Stechmiller, J. K., Childress, B., Porter, T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am. J. Crit. Care*, 2004, v. 13, p. 17–23.
233. Stefano G.B., Coumon Y., Bilfinger T.V. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog. Neurobiol.*, 2000, v. 60, p. 513–530.
234. Stockler S., Schutz P. W., Salomons G. S. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell. Biochem.*, 2007, v. 46, p. 149–166.
235. Stoermer K.A., Burrack A., Oko L., Montgomery S.A., Borst L.B., Gill R.G., Morrison T.E. Genetic ablation of Arginase 1 in macrophages and neutrophils enhances clearance of an arthritogenic alpha-virus. *J. Immunol.*, 2012, v. 189 (8), p. 4047–4059.
236. Stolarek R., Kula P., Kurmanowska Z., Novak D. Effect of various agonists on nitric oxide generation by human polymorphonuclear leucocytes. *Int. Clin. Lab. Res.*, 1998, v. 28 (2), p. 104–109.
237. Streijger F., Oerlemans F., Ellenbroek B.A., Jost C.R., Wieringa B. Van der Zee C.E. Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinases BCK and UbCKmit. *Behav. Brain Res.*, 2005, v. 157, p. 219–234.
238. Szlosarek P.W., Grimshaw M.J., Wilbanks G.D., Hagemann T., Wilson J.L., Burke F., Stamp G., Balkwill F.R. Aberrant regulation of argininosuccinate synthetase by TNF-alpha in human epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 2007, v., 121, p. 6–11.
239. Szuster-Ciesielska A., Hryciuk-Umer E., Stepulak A., Kupisz K., Kandefor-Szerszen M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol.*, 2004, v. 43, p. 252–258.
240. Tachikawa M., Fukaya M., Terasaki T., Ohtsuki S., Watanabe M. Distinct cellular

expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, 20 (1), p. 144-160.

241. Takagi Y., Yasuhara T., Gomi K. Creatine kinase and its isozymes. *Rinsho Byori*, 2001, suppl. v. 116, p. 52–61.

242. Tate D.J. Jr., Patterson J.R., Velasco-Gonzalez C., Carrol E.N., Trinh J. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, v. 8 (8), p. 1109–1120.

243. Tate D.J. Jr., Vonderhaar D.J., Caldas Y.A., Metoyer T., Patterson J.R., Aviles D.H., Zea A.H.. Effect of arginase II on L-arginine depletion and cell growth in murine cell lines of renal cell carcinoma. *J. Hematol. Oncol.*, 2008, v. 1, p. 14–19.

244. Thompson R.W., Pesce J.T., Ramalingam T., Wilson M.S., White S. Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog.*, 2008, v. 4 (3), p. 1-17.

245. Tobacman J.K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ. Health Perspect.*, 2001, v. 109 (10), p. 983-994.

246. Tong B.C., Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2004, v. 4, p. 823–832.

247. Tokarska-Schlattner M., Epand R.F., Meiler F., Zandomenighi G., Neumann D. Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS ONE*, 2012, v. 7 (8), e43178.

248. Torok N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res.*, 2002, v. 62, p. 1648–1653.

249. Tracey W.R., Linden J., Peach M.J., Johns R.A. Comparison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: non-specificity of the diazotization reaction for NO and failure to detect EDRF. *J. Farm. Exp. Ther.*, 1989, v. 252 (3), p. 922–928.

250. Tsai A. How does NO activate hemepeptides? *FEBS Lett.*, 1994, V. 341 (1), p. 141-145.

251. Tsang J.P., Poon W.L., Luk H.M., Fung C.W., Ching C.K., Mak C.M., Lam C.W., Siu T.S.,

- Tam S., Wong V.C. Arginase deficiency with new phenotype and a novel mutation: contemporary summary. *Pediatr. Neurol.*, 2012, v. 47 (4), p. 263–269.
252. Turpaev K., Bouton C., Diet A., Glatigny A., Drapier J.C. Analysis of differentially expressed genes in nitric oxide-exposed human monocytic cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, v. 38, p. 1392–1400.
253. Valdez L.B., Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, a voltage-dependent enzyme, is responsible for nitric oxide diffusion to cytosol. *Front. Biosci.*, 2007, v. 12, p. 1210–1219.
254. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, v. 160 (1), p. 1–40.
255. Vega-Agapito V., Almeida A., Hatzoglou M., Bolanos J.P. Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system y (+) in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J. Biol. Chem.*, 2002, v. 277, N 33, p. 29753–29759.
256. Verrey F., Closs E.I., Wagner C.A., Palacin M., Endou H., Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.*, 2004, v. 447, p. 532–542.
257. Vukosavljevic N., Jaron D., Barbee K.A., Buerk D.G. Quantifying the L-arginine paradox in vivo. *Microvasc Res.*, 2006, v. 71, N 1, p. 48–54.
258. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*, 2011, v. 40, p. 1271–1296.
259. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.*, 2006, v. 5, p. 14–16.
260. Wheatley D.N. Arginine deprivation and metabolomics: important aspects of intermediary metabolism in relation to the differential sensitivity of normal and tumour cells. *Semin. Cancer Biol.*, 2005, v. 15 (4), p. 247–253.
261. Wheatley D.N., Lo W.H., Leung Y.C. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment. Cell Melanoma Res.*, 2010, v. 24 (2), p. 366–376.
262. Wheatley D.N., Philip R., Campbell E. Arginine deprivation and tumor cell death: arginase and its inhibition. *Mol. Cell Biochem.*, 2003, v. 244 (1-2), p.177–185.
263. Wolf C., Brüss M., Hänisch B., Göthert M., von Kügelgen I., Molderings G.J. Molecular

basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic, and neuronal origin. *Mol. Pharmacol.*, 2007, v. 71 (1), p. 276-283.

264. Wolosker H., Panizzutti R., Engelender S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett.*, 1996, v. 392 (3), p. 274-276.

265. Wu G., Jaeger L.A., Bazer F.W., Rhoads J.M. Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, v. 15 (8), p. 442–451.

266. Wu G., Morris S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 1998, v. 336, p. 1–17.

267. Xia Y., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H., Zweier J.L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, v. 93, p. 6770–6774.

268. Yang J., Wu L.J., Tashino S., Onodera S., Ikejima T. Protein tyrosine kinase pathway-derived ROS/NO productions contribute to G2/M cell cycle arrest in evodiamine-treated human cervix carcinoma HeLa cells. *Free Radic. Res.*, 2010, v. 44 (7), p. 792–802.

269. Yeramian A., Martin L., Serrat N., Arpa L., Soler C., Bertran J. Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J. Immunol.*, 2006, v. 176, p. 5918–5924.

270. Yu H., Yoo P.K., Aguirre C. C., Tsoa R.W., Kern R.M., Grody W.W., Cederbaum S.D., Iyer R.K. Widespread expression of arginase I in mouse tissues. Biochemical and physiological implications. *J. Histochem. Cytochem.*, 2003, v. 51, p. 1151–1160.

271. Zajac A., Poprzecki S., Zebrowska A., Chalimoniuk M., Langfort J. Arginine and ornithine supplementation increases growth hormone and insulin-like growth factor-1 serum levels after heavy-resistance exercise in strength-trained athletes. *J. Strength Cond. Res.*, 2010, v. 24(4), p. 1082-1090.

272. Zea A.H., Rodriguez P.C., Atkins M.B., Hernandez C., Signoretti S., Zabaleta J. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.*, 2005, v. 65, p. 3044–3048.



**Приложение**  
**Описание бактериологического исследования**

**День 1-й.** Исследуемый материал (кал здорового человека) (дата взятия анализа 26.03. 2011 г) был засеян на дифференциальную среду Эндо, инкубирован 20 ч при 37° С.

**День 2-й.** Получен рост красных колоний (лактозоположительных). Нет роста слизистых колоний М0. 10 колоний со среды Эндо были испытаны с поливалентной диагностической эшерихиозной ОК сывороткой (действующим началом сывороток являются специфические К и О агглютинины против антигенов эшерихий патогенных ОК групп) широкого спектра действия - ОКА, и иммуноглобулинами ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ. Результат оказался отрицательным. Затем пересеяли часть данных колоний на трехсахарный агар Олькеницкого. Инкубация 20 ч при 37° С.

**День 3-й.** Получен рост на среде Олькеницкого: глюкоза (kr), сахароза (+), лактоза (+), нет H<sub>2</sub>S, нет утилизации мочевины. Устанавливаем принадлежность данных штаммов к роду *Escherichia*, используя основные биохимические свойства *E. coli*, пересевая на слабощелочной кривой агар

**День 4-й.** Получены следующие результаты

Тест	Результат	Тест	Результат
Цитрат Симонса	-	Маннит	+
Мочевина	-	Седонит	-
Малонат натрия	-	Аргининдегидролаза	+
Сероводород	-	Инозит	-
фенилаланиндезаминаза	-	Лактоза	+
Ацетат натрия	+	Сахароза	+
Подвижность	+	Глюкоза	+ газ +
Индол	+	MR	+
лизиндекарбоксилаза	-	VP	-

Пересеваем штамм с косоугольного агар на 5% кровяной агар (эритроциты барана).  
Инкубация 20 ч при 37° С.

**День 5-й.** Получен рост на кровяном агаре – нет зоны гемолиза.

При заражении животных данным штаммом не наблюдался внутриклеточный рост *Escherichia* в паренхиматозных органах, печени, селезенке, в крови и лимфоидных образованиях, не было признаков интоксикации: озноба, повышения ректальной температуры, выпадения шерсти, падения веса.

Штамм *E. coli* N 177 не является генетически модифицированным штаммом, он не слизистый, не инвазивный, не гемолитический и не токсигенный.

Штамм *E. coli* N 177 относится к микроорганизмам, непатогенным для человека согласно классификации микроорганизмов, приведенных в Санитарных правилах СП 1.2. 731-99. Работа с этим штаммом не требует специальных мер предосторожности.

Литературные ссылки:

Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. М., 1984.

Методические рекомендации по определению грамотрицательных потенциально-патогенных бактерий возбудителей внутрибольничных инфекций. М., 1986.

Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Маркеры вирулентности условно-патогенных энтеробактерий. // Актуальные проблемы нозокомиальных инфекций и лекарственной устойчивости микроорганизмов. Минск. 1986. с.33-34.

Глушанова Н.А., Блинов А.И. Эшерихии и эшерихиозы (этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика) // Учебное пособие для врачей-бактериологов. Новокузнецк, 2013, 27 с.