

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

²Інститут біології клітини НАН України, Львів

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ МЕТАБОЛІЗМУ АРГІНІНУ І ПОЛІАМІНІВ НА ПОВЕРХНЕВИЙ ЕЛЕКТРИЧНИЙ ЗАРЯД КЛІТИН КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ LEWIS (LLC) *IN VIVO* ТА НА ЇХ ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ У КУЛЬТУРІ



Ю.В. Яніш¹, М.В. Гончар²,
С.В. Гоголь¹, О.О. Кленов¹,
В.В. Бентрад¹

Адреса:

Яніш Юрій Вадимович
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
Тел.: (044) 259-91-95

Ключові слова: карцинома, нораргінін, аргіназа, аргініндезіміназа, поверхневий електричний заряд.

Показано, що інгібітор аргінази — нораргінін — знижує від'ємний поверхневий заряд клітин карциноми легені Lewis *in vivo*, а α -дифторметилорнітин та метилглюксаль-біс-гуанілгідразон діють на нього у взаємно протилежних напрямках. Цитостатична дія α -дифторметилорнітину у культурі клітин карциноми легені Lewis вірогідно потенціюється аргіназою чи аргініндезіміназою.

ВСТУП

Поліаміни — важливий чинник у процесах проліферації клітин, особливо злоякісно трансформованих. Попередником їх синтезу є аргінін, з якого, за участі аргінази, утворюється орнітин, з орнітину — під дією орнітиндекарбоксілази (ОДК) — путресцин і надалі, із залученням відповідних ферментів, — інші поліаміни. Вони мають позитивний електричний заряд, який впливає на зміни сумарного поверхневого заряду клітини у випадку експресії на її поверхні в результаті різноманітних впливів.

Значення і знак сумарного поверхневого заряду пухлинних клітин відіграють певну роль у генералізації злоякісного процесу, зокрема — у метастазуванні пухлин, і позначаються на ефективності неспецифічного захисту організму та клітинного імунітету, впливаючи на успішність взаємодії клітин-мішеней і клітин-ефекторів [1].

В експериментальних дослідженнях нами були використані інгібітори рівня поліамінів — α -дифторметилорнітин (α -ДФМО) та метилглюксаль-біс-гуанілгідразон (МГБГ). Перша сполука пригнічує активність ОДК, друга — активність S-аденозилметіонін-декарбоксілази (S-АМДК) — ферменту, відповідального за утворення декарбоксільованого S-аденозилметіоніну, аміногрупи якого надалі використовуються клітиною для побудови спермідину та сперміну на основі путресцину.

Нораргінін є інгібітором аргінази, за участю якої відбувається утворення попередника синтезу поліамінів — орнітину.

Фермент аргініндезіміназа також впливає на перебіг обміну поліамінів, каталізуючи утворення цитруліну з надлишків аргініну, який не був безпосередньо використаний у синтезі орнітину. Надалі цитрулін за допомогою аргінінсуццинатсинтетази (ASS) та аргінінсуццинатліази (ASL) — через стадію аргінінсуццинату — знову перетворюється на аргінін, циклічно поновлюючи його резерв у клітині.

Метою роботи було дослідження впливу блокування синтезу поліамінів та інгібування аргінази на: 1) ζ -потенціал і сумарний поверхневий заряд клітин карциноми легені Lewis (LLC) в експериментах *in vivo*; 2) ріст культури клітин лінії LLC *in vitro*.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використано мишей-саміць лінії C57Bl/6 розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Тваринам з масою тіла 20–22 г вводили у м'язи гомілки по 0,2 мл ізотонічного розчину NaCl, що містив 3×10^5 клітин LLC, життєздатність яких тестували з використанням суправітального барвника трипанового синього (0,1%).

На 7-му добу росту пухлин почали щоденні ін'єкції досліджуваних препаратів протягом 5 днів поспіль. Речовини вводили в червну порожнину, також в ізотонічному розчині NaCl, в об'ємі 0,2 мл.

Мишам контрольної групи («хворий контроль») паралельно з експеримен-

тальними тваринами вводили плацебо — по 0,2 мл чистого фізіологічного розчину.

Як модулятори метаболізму аргініну і поліамінів використані, зокрема, α -ДФМО та рекомбінантні аргіназа і аргініндезіміназа, люб'язно надані нам доктором біологічних наук, професором М.В. Гончаром (Інститут біології клітини НАН України, Львів).

Нораргінін вводили в дозі 40 мг на мишу, α -ДФМО — в дозі 800 мг/кг, МГБГ — по 40 мкг на мишу під час кожної ін'єкції.

У випадку сумісного використання досліджуваної речовини вводили окремі ін'єкції.

На 13-ту добу після перещеплення пухлин тварини були виведені з експерименту з дотриманням вимог біологічної етики, а вилучені пухлини піддані глибокому заморожуванню в рідкому азоті. Надалі, в разі необхідності, зразки повільно розморожували, спочатку у морозильній камері протягом 1 год, після чого відбирали потрібні фрагменти і піддавали їх механічній дезінтеграції у гомогенізаторі Поттера. Клітини тричі відмивали центрифугуванням (1500 об./хв) у холодному буфері для електрофорезу (рН 7,4) і проводили виміри їх електрокінетичних параметрів, як описано в [1–3].

Електрокінетичний, або ζ -потенціал, обчислювали, виходячи з рівняння М. Смолуховського. У нього підставляли значення лінійної швидкості руху клітин в електричному полі, градієнт напруженості якого становив 20 В/см [1, 2].

Напрямок руху клітин у бік катода чи анода давав можливість визначити знак сумарного заряду клітин; його поверхневу щільність (q) обчислювали згідно з рівнянням Квінке — Гельмгольца:

$$q\delta = \xi\epsilon_a,$$

де δ — товщина подвійного електричного шару; ϵ_a — абсолютна діелектрична проникність [3].

Моношарову культуру клітин лінії LLC вирощували у скляних флаконах під герметичними гумовими пробками при 37 °С. Інокулюм вносили у кількості $1,0 \times 10^6$ клітин на флакон з площею дна 20 см². Використовували живильне середовище RPMI 1640 («Biowest», США) з додаванням 10% (v/v) інактивованої нагріванням телячої сироватки (Foetal Bovine Serum heat inactivated, «Gibco»). Відомо, що фазу логарифмічного росту культура клітин лінії LLC проходить після 16–18 год культивування. Саме в цей період доцільно починати впливати на неї досліджуваними сполуками. Проте, з огляду на певну модифікацію методики культивування, а саме — не в пластикових матрацах у CO₂-інкубаторі, а у скляних флаконах під герметичними пробками, було визначено інший термін введення зовнішніх чинників. Досліджувані речовини вводили на 2-гу добу

росту культури, під час чергової заміни живильного середовища, після чого культуру вирощували без його оновлення ще 3 доби. Таким чином, моношар клітин для подальших процедур знімали на 5-ту добу.

В експериментах *in vitro* з культурою клітин лінії LLC аргіназу і аргініндезіміназу використовували в концентрації 0,2 од./мл, α -ДФМО — 5,0 мМ; в окремому експерименті аргініндезіміназу — в концентрації 0,125–1,0 од./мл. У випадках комбінованого впливу і ферменти, і α -ДФМО були застосовані в тих самих кінцевих концентраціях.

Після закінчення інкубації клітинний моношар знімали механічним способом, клітини тричі відмивали центрифугуванням (400 г, 5 хв) у 0,14 М розчині NaCl, після чого ресуспендували в буфері для електрофорезу (рН 7,4), якщо вони призначалися для оцінки біофізичних параметрів, або визначали продуктивність клітинного моношару за допомогою рахункової камери Горяєва одразу після першого відмивання ізотонічним NaCl.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідів представлено в табл. 1–3. Як свідчать дані табл. 1, в дисперсійному середовищі зі значенням рН 7,4 клітини LLC мають від'ємний сумарний поверхневий заряд. Ін'єкції нораргініну хворим тваринам знижують його майже на 15%, причому різниця

показників має вірогідний характер ($p < 0,05$).

З огляду на те, що аргіназа залучена до процесів утворення позитивно заряджених поліамінів, дію її інгібітору нораргініну важко пояснити прямою експресією полікатіонів на клітинній поверхні. Швидше за все, таким чином проявляється деякий дефіцит від'ємно заряджених молекул орнітину, який виникає внаслідок пригнічення активності аргінази порівняно з її активністю в пухлинних клітинах, які не піддавалися впливу нораргініну.

За даними табл. 1, дія інгібіторів рівня поліамінів, а саме — α -ДФМО та МГБГ, вплинула на досліджувані показники клітин LLC у взаємно протилежних напрямках. Так, α -ДФМО підвищив від'ємний сумарний поверхневий заряд на 54%, тоді як МГБГ зменшив його на 34%.

Дію α -ДФМО можна пояснити тим, що він блокує прямиий синтез поліамінів з орнітину, безпосередньо інгібуючи ОДК. Таким чином, у пухлинній клітині утворюється надлишок поліаніонів і помітний дефіцит позитивно заряджених молекул поліамінів.

Вірогідне зменшення від'ємного заряду під впливом МГБГ можна пояснити саме блокуванням утворення декарбоксільованого S-аденозилметіоніну і накопиченням певного надлишку власне S-аденозилметіоніну, який частково компенсує сумарний поверх-

Таблиця 1. Вплив інгібіторів/модуляторів метаболізму аргініну і поліамінів на електрокінетичні властивості клітин LLC в експериментах *in vivo*

Група	Електрокінетичний потенціал ζ , мВ	Щільність сумарного поверхнього заряду q , $\times 10^{-2}$ Кл/м ²	Індекс модуляції Δ , %
Контроль	10,21±0,71	-7,32±0,51	-
Нораргінін	8,68±0,40	-6,22±0,29	-14,98
α -ДФМО	15,74±1,04	-11,29±0,75	54,16
МГБГ	6,71±0,40	-4,81±0,29	-34,20
Нораргінін + α -ДФМО	11,97±0,54	-8,58±0,39	17,24
Нораргінін + α -ДФМО + МГБГ	9,72±0,56	-6,96±0,40	-4,80

Таблиця 2. Вплив аргініндезімінази на ріст культури клітин лінії LLC *in vitro*

Досліджені варіанти	Продуктивність моношару, $\times 10^3$ клітин/см ²	Індекс модуляції Δ , %
Контроль	112,5±8,0	-
Аргініндезіміназа, од./мл:		
0,125	93,7±6,4	-16,7
0,5	60,3±9,6	-46,4
1,0	65,6±7,2	-41,7

Таблиця 3. Вплив аргінази, аргініндезімінази, α -ДФМО та їх комбінації на ріст культури клітин лінії LLC *in vitro*

Чинники	Продуктивність моношару, $\times 10^3$ клітин/см ²	Індекс модуляції Δ , %
Контроль	60,6±4,8	-
Аргіназа:		
0,2 од./мл	33,1±4,6	-45,4
Аргініндезіміназа:		
0,2 од./мл	31,9±2,4	-47,4
α -ДФМО:		
5,0 мМ	47,5±3,6	-21,6
Аргіназа + α -ДФМО:		
0,2 од./мл + 5,0 мМ	21,5±4,0	-64,5
Аргініндезіміназа + α -ДФМО:		
0,2 од./мл + 5,0 мМ	22,5±6,2	-62,9

невий заряд пухлинних клітин (див. табл. 1).

Сумісна дія нораргініну і α -ДФМО спричинила потужне нівелювання ефекту останнього саме за рахунок дефіциту поліаніонів, як це описано вище для випадку з чистим нораргініном.

Спільне використання нораргініну, α -ДФМО і МГБГ повернуло значення як сумарного поверхневого заряду, так і прямо пропорційно пов'язаного з ним ζ -потенціалу до контрольного рівня, оскільки отримані відмінності не є вірогідними. Зазначену обставину слід мати на увазі при плануванні експериментів, оскільки не можна виключити конкурентних механізмів дії ДФМО і МГБГ.

Дані, представлені у табл. 2, ілюструють результати експериментів, проведених з метою підбору оптимальної концентрації аргініндезімінази для подальшого вивчення її впливу на ріст культури LLC і деяких біохімічних досліджень.

З огляду на отримані результати в подальшій роботі ми зупинилися на концентрації 0,2 од./мл. За цих її значень ми будемо мати вірогідне пригнічення росту пухлинних клітин *in vitro*, але цитостатична дія ферменту не буде занадто жорсткою. Затримка проліферації клітин LLC під впливом аргініндезімінази може бути пояснена тим, що, будучи привнесеною ззовні, вона швидко виснажує невідновний у культурі резерв аргініну, перешкоджаючи утворенню орнітину під впливом власної аргінази пухлинних клітин і надалі — синтезу поліамінів, необхідних для їх розмноження.

Власне результати впливу аргінази і аргініндезімінази, причетних до постачання клітини попередником синтезу поліамінів орнітином, а також впливу інгібітору прямого синтезу поліамінів α -ДФМО подано в табл. 3.

Самі по собі ферменти аргінази й аргініндезімінази пригнічують ріст культури клітин LLC майже вдвічі сильніше, ніж ін-

гібітор синтезу поліамінів α -ДФМО. Проте їх сполучена дія виявляється ще ефективнішою, сягаючи у випадку з аргіназою 64,5%, а у випадку з аргініндезіміназою — 62,9% відносно інтактного контролю (див. табл. 3).

ВИСНОВКИ

В експериментах *in vivo* показано, що інгібітор аргінази — нораргінін — у дисперсійному середовищі зі значенням рН 7,4 знижує від'ємний сумарний заряд клітин епідермоїдної метастазуючої аденокарциноми легень мишей LLC (Lewis).

Швидше за все таким чином проявляється деякий дефіцит від'ємно заряджених молекул орнітину, який виникає внаслідок пригнічення активності аргінази порівняно з її активністю в пухлинних клітинах, які не піддавалися впливу нораргініну.

Проте дія інгібіторів рівня поліамінів, а саме — α -ДФМО та МГБГ, позначилася на досліджуваних показниках клітин LLC зі значенням рН 7,4 у взаємно протилежних напрямках. Так, α -ДФМО підвищив від'ємний сумарний поверхневий заряд на 54%, тоді як МГБГ зменшив його на 34%.

Ефект α -ДФМО можна пояснити тим, що він блокує прямий синтез поліамінів з орнітину, безпосередньо інгібуючи фермент ОДК. Таким чином, у пухлинній клітині утворюється надлишок поліаніонів і помітний дефіцит позитивно заряджених молекул поліамінів. Вплив МГБГ, імовірно, свідчить про накопичення надлишку полікатіонів, зокрема S-аденозилметіоніну (SAM), внаслідок блокування його декарбоксілювання за рахунок пригнічення активності ферменту S-аденозилметіонін-декарбоксілази (S-АМДК).

Спільна дія нораргініну і α -ДФМО викликала нівелювання ефекту останнього саме за рахунок дефіциту поліаніонів, як це описано вище для випадку з чистим нораргініном. Проте комбіноване

використання нораргініну, α -ДФМО і МГБГ повернуло значення як сумарного поверхневого заряду, так і прямо пропорційно пов'язаного з ним ζ -потенціалу до контрольного рівня, оскільки отримані відмінності не є вірогідними.

Усе вищезазначене дає теоретичне підґрунтя для тестування ефекту вказаних сполук, зокрема за їхнім впливом на електрокінетичні характеристики пухлинної клітини.

Експериментально визначено концентрацію ферментів, що метаболізують аргінін, яку доцільно використовувати в подальших дослідженнях. Вона становить 0,2 од./мл.

Продемонстровано, що цитостатична дія α -ДФМО більше ніж на 30% потенціюється у випадку його сумісного застосування з аргіназою чи аргініндезіміназою. Цей факт слід взяти до уваги при клінічному використанні цього інгібітору синтезу поліамінів.

Отримані дані мають перспективне значення в плані використання аргінази та аргініндезімінази разом з α -ДФМО для пригнічення росту клітин аденокарциноми легень.

ПОДЯКА

Висловлюємо глибоку подяку доктору фізико-математичних наук Г.І. Солянник, кандидату біологічних наук О.М. Пясковській та кандидату біологічних наук Д.Л. Колеснику за люб'язно надану культуру клітин лінії LLC та дружню підтримку в роботі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Garmanchouk L.V., Pyascovskaya O.N., Yanish Yu. et al. (2005) Influence of aconitine-containing herbal extract BC 1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells. *Exp. Oncol.*, 27(4): 262–266.
2. Олішевський С.В., Яніш Ю.В., Козак В.В., Шляховенко В.О. (2005) Вплив бактеріальної CpG-ДНК на електрокінетичний потенціал імунної системи мишей. *Доповіді НАНУ*; (11): 178–182.
3. Yanish Yu.V., Artamonova A.B., Shlyakhovenko V.A. (2013) Glycopeptide vaccine on DNA-histone carrier and its impact on ζ -potential of effector cells during experimental treatment of lymphoblastic leukemia. *Exp. Oncol.*, 35(3): 198–201.

Влияние модуляторов метаболизма аргинина и полиаминов на поверхностный электрический заряд клеток карциномы легкого Lewis (LLC) *in vivo* и на их пролиферативную активность в культуре

Ю.В. Яниш¹, М.В. Гончар², С.В. Гоголь¹, О.А. Кленов¹, В.В. Бентрад¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

²Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

Резюме. Показано, что ингибитор аргиназы — нораргинин — снижает отрицательный поверхностный заряд клеток карциномы легкого Lewis *in vivo*, а α -диформетилорнитин и метилглиоксаль-бис-гуанилгидразон действуют на него во взаимно противоположных направлениях. Цитостатическое действие α -диформетилорнитина в культуре клеток карциномы легкого Lewis достоверно потенцируется аргиназой или аргининдезиминой.

Ключевые слова: карцинома, нораргинин, аргиназа, аргининдезиминая, поверхностный электрический заряд.

Influence of arginine and polyamines metabolism modulators on the surface electric charge of Lewis lung carcinoma (LLC) cells *in vivo* and their proliferative activity in the culture

Yu.V. Yanish¹, M.V. Gonchar², S.V. Gogol¹, O.A. Klenov¹, V.V. Bentrad¹

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Lviv

Summary. It was shown that an inhibitor of arginase — norarginin — reduces the cell negative surface charge of lung carcinoma Lewis (LLC) *in vivo*, and α -DFMO and MGBG act on it in opposite directions. Cytostatic effect of α -DFMO in culture of LLC cells was significantly potentiated by arginase or arginindeiminase.

Key words: carcinoma, norarginin, arginase, arginindeiminase, surface electric charge.